

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires de régulation de l'activité du récepteur  
A des peptides natriurétiques**

Par  
Simon Joubert

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
En Pharmacologie

Mai 2006

©, Simon Joubert, 2006



W

4

U58

2007

V. 032

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes moléculaires de régulation de l'activité du récepteur  
A des peptides natriurétiques**

présentée par :  
Simon Joubert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Gauchat, président-rapporteur  
Dr. André De Léan, directeur de recherche  
Dre. Audrey Claing, membre du jury  
Dre. Louise Larose, examinatrice externe  
Dr. Réjean Couture, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le récepteur NPR-A est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions dans divers tissus, menant à une réduction globale de la pression sanguine. Il est également impliqué dans l'inhibition de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose ventriculaire. Enfin, le NPR-A est un activateur de la lipolyse dans les adipocytes humains. Le NPR-A est une protéine transmembranaire contenant trois domaines : 1) Un domaine N-terminal extracellulaire de liaison aux peptides natriurétiques. 2) Un domaine KHD intracellulaire. 3) Un domaine C-terminal guanylate cyclase chargé de produire le second messager GMPc en réponse à la liaison de peptides natriurétiques sur le domaine extracellulaire. Malgré les rôles importants du NPR-A, les mécanismes intracellulaires régulateurs de son activité sont encore peu étudiés. L'objectif du projet était donc de caractériser ces mécanismes moléculaires de régulation de l'activité du NPR-A incluant : 1) La régulation par la phosphorylation. 2) La régulation par l'ATP. 3) La régulation du fonctionnement catalytique du domaine GC. Des études antérieures avaient démontré que le NPR-A peut être désensibilisé par une exposition à l'ANP. Cette désensibilisation est corrélée à la déphosphorylation du domaine KHD du NPR-A. Ici, nous avons montré que cette déphosphorylation est due à la perte de l'activité d'une ou de plusieurs protéines kinases associées au KHD. L'activité phosphatase, elle, reste constante. Nous n'avons pas été en mesure d'identifier cette ou ces kinases, mais des évidences indiquent qu'il ne s'agit pas de la PKG, ni de l'AMPK. Dans un deuxième temps, nous avons émis l'hypothèse que l'ATP est un important régulateur allostérique de l'activité du NPR-A, et qu'il se lie directement au domaine KHD de la protéine. Nous avons démontré qu'un analogue photoactivable de l'ATP se lie de façon covalente et ANP-dépendante sur le KHD. De plus, l'ATP inhibe la liaison du peptide ANP au domaine extracellulaire, mais fait augmenter l'activité GC C-terminale. Le KHD semble réguler ces deux phénomènes de façon indépendante. La liaison ANP-dépendante de l'analogue d'ATP au KHD est spécifique et nos résultats suggèrent qu'elle se fait de façon coopérative. Finalement, nous avons voulu étudier le mécanisme catalytique du domaine guanylate cyclase du NPR-A. En effet, cette cyclase est différente puisqu'elle fonctionne sous forme d'un dimère avec deux sous-unités identiques. De plus, nous voulions déterminer si les analogues d'ATP nommé « P-site inhibitors », utilisés comme inhibiteurs de l'adénylyl cyclase, pourraient être utiles comme inhibiteurs de la guanylate cyclase particulière, après conversion du groupement adénine de l'inhibiteur en groupement guanine. Nous avons déterminé que le 2'd3'GMP est un inhibiteur mixte efficace de notre GC avec un  $K_i$  de  $\sim 70 \mu\text{M}$ . De plus, la présence du co-produit pyrophosphate augmente fortement l'inhibition par le 2'd3'GMP, et produit une perte de la coopérativité de la cinétique enzymatique. Nous expliquons ces résultats avec un modèle allostérique pour une enzyme sous forme de dimère pour laquelle il y a coopérativité positive autant pour le substrat que pour l'inhibiteur. Le pyrophosphate stabilise l'enzyme dans un état non coopératif et permet une meilleure inhibition compétitive par le 2'd3'GMP.

**Mots-clés :** Guanylate cyclase, kinase, phosphorylation, désensibilisation, inhibiteur, catalyse, photomarquage, liaison, dimère

## Abstract

The receptor protein NPR-A is involved in the regulation of many different physiological functions in many tissues, leading to overall reduction of blood pressure. The NPR-A pathway is also important in mediating inhibition of heart hypertrophy and ventricular fibrosis. Finally, NPR-A activates the lipolytic pathway in human adipocytes. NPR-A is a single transmembrane protein containing three protein domains : 1) The N-terminal extracellular domain that binds natriuretic peptides. 2) The intracellular KHD domain. 3) A C-terminal guanylate cyclase domain which produces cGMP in response to natriuretic peptide binding to the extracellular domain. Despite all the important roles of this protein, the intracellular mechanisms regulating NPR-A activity are still poorly understood. The objective of this project was to characterize the molecular mechanisms involved in regulating NPR-A activity. These include : 1) Regulation via phosphorylation. 2) Regulation via ATP. 3) Regulation of the catalytic mechanism of the GC domain. Firstly, it has been demonstrated that NPR-A can be desensitized following exposure to ANP. This desensitization was correlated with the dephosphorylation of the intracellular KHD domain of the NPR-A. We found that this dephosphorylation occurs because of reduced NPR-A-associated kinase activity, whereas phosphatase activity remains constant. However, we were unable to identify a kinase that phosphorylates the KHD, although we have gathered evidence that PKG and AMPK are not involved in this process. Secondly, we hypothesized that ATP is an allosteric regulator of NPR-A activity, and that it binds directly to the KHD domain of the protein. We demonstrated that a photolabeling analog of ATP binds covalently and in an ANP-dependent fashion to the KHD. In addition, ATP inhibits ANP binding to the extracellular domain, but increases the C-terminal guanylate cyclase activity. The KHD seems to regulate these two events independently. The ANP-dependent binding of the ATP analog is specific, and our results suggest that ATP binding on the KHD is a cooperative process. Finally, we aimed to study the catalytic mechanism of the NPR-A guanylate cyclase domain. This cyclase is quite different from others cyclases in that it is a dimer composed of identical subunits. In addition, we wanted to determine if ATP analogs described as P-site inhibitors and used as adenylyl cyclase inhibitors could be converted to contain a guanine instead of an adenine and become useful as GC inhibitors. We found that 2'd3'GMP is a potent mixed GC inhibitor with a  $K_i$  of  $\sim 70 \mu\text{M}$ . Furthermore, the presence of the by-product pyrophosphate potentiates 2'd3'GMP inhibition, and causes a loss of positive cooperativity kinetics. These results are best explained by an allosteric dimer model with positive cooperativity for both the substrate and inhibitors. Pyrophosphate stabilizes the enzyme in a non-cooperative state and allows improved competitive inhibition by 2'd3'GMP.

**Keywords** : Guanylate cyclase, kinase, phosphorylation, desensitization, P-site inhibitor, nucleotide, catalysis, photolabeling, binding, dimer

## Table des matières

Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations .....	xiv
Remerciements .....	xvii
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	19
Introduction et historique.....	20
CHAPITRE 1 : Les peptides natriurétiques .....	22
Introduction aux peptides natriurétiques et peptides analogues .....	23
1.1 Le peptide natriurétique de type A .....	26
1.1.1 Biosynthèse et structure.....	26
1.1.2 Expression tissulaire et génique .....	28
1.1.3 Catabolisme .....	31
1.2 Le peptide natriurétique de type B .....	32
1.2.1 Biosynthèse et structure.....	32
1.2.2 Expression tissulaire et génique .....	32
1.2.3 Catabolisme .....	34
1.3 Le peptide natriurétique de type C .....	34
1.3.1 Biosynthèse et structure.....	34
1.3.2 Expression tissulaire et génique .....	34
1.3.3 Catabolisme .....	35
CHAPITRE 2 : La famille des guanylates cyclases .....	36
Introduction .....	37
2.1 La guanylate cyclase soluble .....	38
2.2 Les guanylates cyclases particulières .....	40
Introduction .....	40
Historique des récepteurs aux peptides natriurétiques.....	42
2.2.1 Le récepteur A des peptides natriurétiques ou GC-A .....	43
2.2.2 Le récepteur B des peptides natriurétiques ou GC-B .....	61
2.2.3 Le récepteur de clairance des peptides natriurétiques (NPR-C).....	64
2.2.4 La guanylate cyclase C .....	69
2.2.5 La guanylate cyclase D.....	71
2.2.6 Les guanylate cyclases E et F .....	71

2.2.7 La guanylate cyclase G.....	73
CHAPITRE 3 : Effets physiologiques des peptides natriurétiques .....	74
Introduction .....	75
3.1 Les effecteurs du GMPc .....	77
3.1.1 La protéine kinase G.....	77
3.1.2 Les canaux ioniques sensibles au GMPc.....	79
3.1.3 Les phosphodiesterases.....	79
3.2 Effets du système ANP / NPR-A sur la pression sanguine .....	80
3.3 Effets du système ANP / NPR-A sur la perméabilité de l'endothélium et le volume intravasculaire.....	81
3.4 Effets de l'ANP et du BNP sur l'hypertrophie cardiaque et la fibrose.....	82
3.5 Effets de l'ANP sur la natriurèse et la diurèse.....	84
3.6 Effets de l'ANP et du CNP sur la relaxation vasculaire et le remodelage ..	85
3.7 Effets des peptides natriurétiques dans le poumon.....	88
3.8 Inhibition du système rénine-aldostérone par l'ANP .....	88
3.9 Effets de l'ANP sur le métabolisme des lipides .....	90
3.10 Effets neurologiques des peptides natriurétiques .....	92
3.11 Effets des peptides natriurétiques sur le système immunitaire.....	94
3.12 Le système CNP / NPR-B et la croissance osseuse.....	95
CHAPITRE 4 : Applications thérapeutiques des peptides natriurétiques .....	97
DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES ARTICLES.....	100
CHAPITRE 5 : Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor.....	101
Abstract.....	102
Introduction .....	104
Experimental Procedures.....	107
Cell Culture.....	107
Membrane Preparations.....	107
Western blotting, Immunodetection, and Immunoprecipitation.....	107
ANP-Induced Dephosphorylation Experiment.....	108
<sup>32</sup> P Incorporation and Pulse-Chase Experiments.....	108
[ <sup>35</sup> S]ATPγS Incorporation Studies.....	109
Statistical Analysis .....	109
Results .....	110
WT and NPR-AC423S Receptors Detection by Western Blot Analysis.....	110



NPR-AC423S Is Dephosphorylated at Basal State in Whole Cells .....	111
Inhibition of rNPR-A Phosphorylation by Amiloride .....	111
ANP-Induced NPR-A Dephosphorylation Is Not Mediated by an Increase in the Activity of the NPR-A Phosphatase .....	112
NPR-A Kinase Is Unable To Phosphorylate the NPR-AC423S Dimer in Vitro .....	113
rANP-Desensitized rNPR-A Is Not Phosphorylated by the NPR-A Kinase ...	114
Discussion.....	116
Acknowledgments .....	120
References .....	121
CHAPITRE 6 : Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A .....	
Introduction .....	134
Results .....	136
Effect of ATP on NPR-A GC activity .....	136
Effect of ATP on <sup>125</sup> I-labeled ANP binding .....	136
8-Azido-3'-biotinyl-ATP inhibition of NPR-A GC activity .....	137
Effect of 8-azido-ATP-B on binding of <sup>125</sup> I-labeled ANP to NPR-A-ΔGC ....	137
8-azido-ATP-B labeling of NPR-A-ΔGC.....	138
Competition of photoaffinity labeling of ΔGC by ATP .....	139
Discussion.....	140
Experimental procedures .....	145
Materials .....	145
Expression vectors.....	145
Cell culture and transient or stable expression in HEK293 cells.....	145
Membrane preparations .....	145
Immunoblot analysis.....	146
Synthesis of 8-azido-3'-biotinyl-ATP .....	146
Photolabeling procedure .....	147
Receptor binding assays .....	147
Guanylyl cyclase activity.....	147
Data analysis and statistics .....	148
Acknowledgments .....	148
References .....	149

CHAPITRE 7 : Biochemical and pharmacological characterization of P-site inhibitors on homodimeric guanylyl cyclase domain from natriuretic peptide receptor-A .....	161
Abstract.....	162
Introduction .....	164
Materials and methods.....	166
Materials .....	166
Plasmid constructs and site-directed mutagenesis.....	166
Transfection of Sf9 insect cells and titration of recombinant baculovirus by protein expression.....	167
Expression of guanylyl cyclase in Sf9 cells .....	167
Purification of guanylyl cyclases.....	168
Steric exclusion HPLC .....	168
Immunoblot analysis.....	169
Guanylyl cyclase activity.....	169
Statistical analysis.....	170
Results .....	171
Purified guanylyl cyclase domain of pGC (GC-A) is fully active.....	171
Positive cooperativity in GC-WT domain .....	172
Structure-activity profile of P-site inhibition of GC-WT by nucleosides.....	173
2'd3'GMP P-site mixed inhibition requires only one active site .....	174
Discussion.....	175
Acknowledgements .....	179
References .....	179
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	190
Discussion.....	191
I – Régulation du NPR-A par la phosphorylation .....	191
II – Régulation du NPR-A par l'ATP .....	198
III – Production de GMPc par le domaine guanylate cyclase du NPR-A .....	205
Conclusion.....	215
Bibliographie .....	218

## Liste des tableaux

Table 5.1 : $^{32}\text{P}$ Content of Dimeric and Monomeric rNPR-AC423S Relative to WT rNPR-A <sup>a</sup> .....	124
Table 5.2 : $^{35}\text{S}$ Content of Each Mutant Receptor Form as Percentage of the Content of WT rNPR-A <sup>a</sup> .....	125
Table 7.1 : Kinetic parameters of GC-WT compared to mutated proteins D849A, N968S, and GC-HET.....	183
Table 7.2 : Inhibition of particulate guanylyl cyclase domain by nucleosides and inorganic pyrophosphate.....	184

## Liste des figures

Figure 1.1 : Alignement de séquences des membres de la famille des peptides natriurétiques. ....	24
Figure 1.2 : Étapes de transcription et traduction des peptides natriurétiques. .	27
Figure 1.3 : Séquences et structures des peptides natriurétiques humains.....	28
Figure 1.4 : Représentation schématique du promoteur du gène de l'ANP humain (Nppa).....	30
Figure 1.5 : Régions régulatrices en amont du promoteur du gène du BNP humain. ....	33
Figure 2.1 : Structure et activation de la GCs. ....	38
Figure 2.2 : Mécanisme catalytique de la guanylate cyclase. ....	40
Figure 2.3 : Topologie générale des guanylates cyclases particulières.....	41
Figure 2.4 : Récepteurs des peptides natriurétiques et spécificité de liaison des peptides.....	43
Figure 2.5 : Structure du gène codant pour le NPR-A.....	44
Figure 2.6 : Promoteur du gène codant pour le NPR-A. ....	45
Figure 2.7 : Structure en « V » du dimère de l'ECD du NPR-A proposée par van den Akker et collaborateurs en 2000.....	48
Figure 2.8 : Structure en « A » du dimère de l'ECD du NPR-A contenant ou non, un peptide ANP tronqué. ....	50
Figure 2.9 : Mécanisme de rotation et déplacement du domaine ECD du NPR-A induit par la liaison de l'ANP. ....	51
Figure 2.10 : Structure en « A » modélisée sans et avec le BNP de 28 résidus suggérée par Jossart et coll. en 2005.....	52
Figure 2.11 : Structure modélisée du domaine KHD. ....	53

Figure 2.12 : Hélices impliquées dans la dimérisation de la GC-E (retGC1)....	54
Figure 2.13 : Structure modélisée du domaine guanylate cyclase de la guanylate cyclase membranaire.....	55
Figure 2.14 : Sites de phosphorylation dans le KHD du NPR-A. ....	56
Figure 2.15 : Modèle de l'activation et désensibilisation du NPR-A.....	60
Figure 2.16 : Structure du gène codant pour le NPR-B humain.....	61
Figure 2.17 : Sites de phosphorylation dans le KHD du NPR-B. ....	63
Figure 2.18 : Structure du domaine ECD du NPR-C à l'état de base et avec le ligand CNP.....	66
Figure 2.19 : Structure de l'ECD du NPR-C montrant le rapprochement du domaine proximal d'environ 20 Angströms induit par le ligand. ....	67
Figure 2.20 : Régulation de la sécrétion intestinale par les entérotoxines bactériennes et la GC-C. ....	70
Figure 2.21 : Rôle des guanylates cyclases E et F dans la phototransduction au niveau de la rétine. ....	72
Figure 3.1 : Les actions biologiques bien documentées du système ANP / BNP / NPR-A. ....	76
Figure 3.2 : Les effecteurs du GMPc.....	78
Figure 3.3 : Effets de l'ANP sur le rein.....	84
Figure 3.4 : Relaxation du muscle lisse induite par les peptides natriurétiques. ....	86
Figure 3.5 : Contrôle par l'ANP de la régulation de la production d'aldostérone dans la surrénale.....	90
Figure 3.6 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain. ....	91
Figure 3.7 : Conséquences physiologiques de l'activation du NPR-A.....	94

Figure 5.1 : Western blot analysis of WT rNPR-A and rNPR-AC423S. ....	126
Figure 5.2 : Basal state <sup>32</sup> P incorporation in WT and C423S rNPR-A.....	127
Figure 5.3 : Effect of amiloride on WT rNPR-A <sup>32</sup> P incorporation. ....	128
Figure 5.4 : Effect of rANP on rNPR-A dephosphorylation. ....	129
Figure 5.5 : Thiophosphorylation of the rNPR-AC423S.....	130
Figure 5.6 : Thiophosphorylation of the rANP-treated WT rNPR-A.....	131
Figure 6.1 : Desensitization of wild-type natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) and the effect of ATP on membrane guanylyl cyclase activity. ....	153
Figure 6.2 : Inhibition of <sup>125</sup> I-labeled atrial natriuretic peptide (ANP) binding by ATP.....	154
Figure 6.3 : Inhibition of guanylyl cyclase activity by azido-containing nucleotides. ....	155
Figure 6.4 : The effect of ATP and azido analogues on the binding of <sup>125</sup> I-labeled atrial natriuretic peptide (ANP) to NPR-A-ΔGC. ....	156
Figure 6.5 : Concentration dependence and photoaffinity labeling of the natriuretic peptide receptor-A (NPR-A)-ΔGC. ....	157
Figure 6.6 : Specificity of Δguanylyl cyclase (ΔGC) photoaffinity labeling. .	158
Figure 6.7 : Inhibition of 8-azido-3'-biotinyl-ATP-B (8-azido-ATP-B) photoaffinity labeling of Δguanylyl cyclase (ΔGC) by ATP.....	160
Figure 7.1 : SDS-PAGE analysis of purified pGC constructs.....	185
Figure 7.2 : Kinetic analysis of GC-WT and GC-HET. ....	186
Figure 7.3 : Structure-activity relationships for the inhibition of pGC. ....	187
Figure 7.4 : Kinetic analysis of inhibition by 2'd3'GMP.....	188

Figure 7.5 : Inhibition of GC-WT and GC-HET by 2',3'-GMP and pyrophosphate.....	189
Figure 8.1 : Alignement de séquence du NPR-A humain avec les substrats connus de l'AMPK. ....	195
Figure 8.2 : Modèle schématique du processus d'activation du NPR-A.....	199
Figure 8.3 : Modèle actuel de l'activation du NPR-A.....	204
Figure 8.4 : Transformation cellulaire du 2',5'-dd-3'-AMP-bis(t-Bu-SATE) en 2',5'-dd-3'-ATP, inhibiteur de l'adénylyl cyclase.....	209
Figure 8.5 : Dérivé méthylantraniloyle (MANT) du GTP $\gamma$ S, et dérivé TNP. .	210
Figure 8.6 : Structure chimique de stimulateurs de la GCs.....	213

## Liste des abréviations

AC	Adénylyl cyclase
ACTH :	Adrenocorticotrop hormone
ADP :	Adénosine diphosphate
ADP $\gamma$ S :	Adénosine gamma thiodiphosphate
AGNE :	Acides gras non estérifiés
AMP :	Adénosine monophosphate
AMPK	Adenosine monophosphate activated protein kinase
AMPPNP	Adenylylimidodiphosphate
Ang II :	Angiotensine 2
ANP :	Atrial natriuretic peptide
AP-1 :	Activator protein 1
APP(NH)P :	Adenylylimidodiphosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
ATP $\gamma$ S :	Adénosine gamma thiotriphosphate
BNP :	Brain natriuretic peptide
CaM :	Calmoduline
C-ANP :	Rat ANP (4-23)
CFTR :	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO :	Chinese hamster ovary cell
CNG :	Cyclic nucleotide gated non selective cation channel
CNP :	C-type natriuretic peptide
CO :	Carbon monoxyde
COS :	African green monkey transformed kidney cell
COX :	Cyclooxygénase
CRE :	cAMP response element transcription factor
CREB :	cAMP response element binding protein
DNP :	Dendroaspis natriuretic peptide
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECD :	Extracellular domain
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF :	Epidermal growth factor
ERK :	Extracellular signal regulated kinase



ET :	Endothéline
FGF :	Fibroblast growth factor
GC	Guanylate cyclase
GCAP :	Guanylate cyclase activating protein
GCp :	Guanylate cyclase particulaire
GCs :	Guanylate cyclase soluble
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GTP :	Guanosine triphosphate
HCK :	Hematopoietic cell kinase
HEK :	Human epithelial kidney cell
HIF-1 :	Hypoxia inducible factor 1
HRE :	Hypoxia responsive element
HSP :	Heat shock protein
ICC :	Insuffisance cardiaque congestive
IL :	Interleukine
iNOS :	Inducible nitric oxide synthase
IP3 :	Inositol-1,4,5-triphosphate
IRS :	Insulin receptor substrate
IV :	Intraveineuse
KHD :	Kinase homology domain
LDL :	Low density lipoprotein
LHS :	Lipase hormono sensible
LMG :	Lipase des monoglycérides
MANT	N-méthylanthraniloyl
MCAT :	Muscle CAT-like factor
MAPK :	Mitogen activated protein kinase
MEK :	MAP kinase / ERK kinase
MMP :	Matrix metalloprotéinase
NEP :	Neutral endopeptidase
NF- $\kappa$ B :	Nuclear factor kappa B
NGF :	Neural growth factor
NO :	Nitric oxide
NPR :	Natriuretic peptide receptor
NRSE :	Neuron restrictive silencer element
PC12 :	Pheochromocytoma adrenal cells

PDE :	Phosphodiesterase
PDGF :	Platelet-derived growth factor
PiP <sub>2</sub> :	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate
PKA :	cAMP-dependent protein kinase
PKB :	Protein kinase B
PKC :	Protein kinase C
PKG :	cGMP-dependent protein kinase
PLC :	Phospholipase C
PMA :	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PP5 :	Protein phosphatase 5
PSIs	P-site inhibitors
Rec :	Recoverine
RGC :	Receptor guanylate cyclase
Rh :	Rhodopsine
SRAA :	Système rénine angiotensine-aldostérone
SRE :	Serum response element
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SSRE :	Shear stress response element
ST :	Stable enterotoxin
STAT :	Signal transducer and activator of transcription
TBE :	T-box element
TEF :	Transcription enhancer factor
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$ :	Tumor necrosis factor alpha
TNP	Trinitrophénylé
TR :	Transducine
TSF1 :	TGF-beta stimulated factor 1
VEGF :	Vasoactive endothelial growth factor

## Remerciements

Mes premiers remerciements sont dédiés à mon directeur de recherche, Dr. André De Léan, qui m'a appris ce qu'est la recherche. En effet, ce qui se retrouve dans cette thèse ne représente qu'une fraction du temps investi dans mes projets. La majorité du temps, un projet de recherche ne se déroule pas comme prévu. Les obstacles sont nombreux et il faut faire preuve de persévérance et contourner les problèmes pour arriver à l'objectif fixé. C'est pourquoi je ressens une certaine fierté de mentionner que mon projet initial de doctorat n'a jamais fourni les résultats escomptés. Presque trois années de dur labeur et aucun résultat utile. Malgré cela j'ai entamé d'autres projets intéressants qui m'ont permis de l'espérer de fournir des contributions significatives au domaine d'étude. Malgré tous ces déboires, mon directeur de recherche s'est tenu à mes côtés et m'a toujours fourni de précieux conseils. Je lui transmets donc toute ma gratitude pour ses efforts et son souci de faire de moi un meilleur scientifique.

Sincères remerciements également à tous les autres étudiants du laboratoire, et un merci particulier à Normand McNicoll, avec qui il est toujours agréable de travailler et de discuter de multiples sujets. Je suis content d'avoir été en mesure de profiter de sa longue expérience dans le domaine et de son esprit critique aiguisé.

Je voudrais ensuite remercier mes parents. Merci pour vos encouragements et votre soutien pendant mes longues années d'étude. Vous avez su reconnaître mon désir d'en apprendre plus, vous m'avez appris la persévérance, ainsi que la nécessité de faire des sacrifices pour arriver à un objectif. Je me compte vraiment chanceux de vous avoir pour parents et cette thèse vous est dédiée. Merci à ma sœur et à mon frère pour vos encouragements. Merci de vous montrer intéressés à ce que je fais, même si vous ne comprenez rien quand je parle de mes recherches... Merci à Marie pour ton soutien, tes encouragements et ta complicité. Je suis bien heureux que tu aies un jour décidé de traverser l'atlantique pour venir étudier ici ...

Merci également aux membres du jury de cette thèse pour avoir accepté de la lire ainsi que pour vos commentaires constructifs.

Finalement, j'aimerais souligner le support financier du Fonds de la recherche en santé du Québec, de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, du département de Pharmacologie, ainsi que de la fondation J.A. De Sève.

**PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA**  
**LITTÉRATURE**

## Introduction et historique

On peut retracer les premiers indices de la présence des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs au milieu des années 50. Il avait alors été démontré que l'oreillette cardiaque peut sentir la détresse du système cardiovasculaire et produire des changements dans l'excrétion rénale de sel et d'eau. Ces changements étaient nécessaires pour maintenir un volume de sang constant (Henry et al., 1956; Henry and Pearce, 1956). Cependant, les auteurs de ces études avaient expliqué ces changements par une inhibition réflexe de la sécrétion de l'hormone antidiurétique. La même année, un autre chercheur avait révélé que les cellules cardiaques de l'oreillette, contrairement aux cellules du ventricule, contenaient un appareil de Golgi très développé (Kisch, 1956). Ceci était un indice de la présence dans ces cellules d'un système de sécrétion. Il fallut attendre 25 années pour identifier le facteur responsable, un peptide circulant appelé peptide natriurétique de l'oreillette (ANP), relâché par le cœur suite à un étirement mécanique de l'oreillette (de Bold et al., 1981; Flynn et al., 1983). Son récepteur membranaire, nommé NPR-A, fut identifié quelques années plus tard (Chinkers et al., 1989; Lowe et al., 1989). Le NPR-A contient un domaine catalytique guanylate cyclase intracellulaire qui produit du GMPc lorsque l'ANP se lie au récepteur. Depuis ce temps, d'autres peptides et récepteurs analogues ont été identifiés.

Depuis le début des années 80, plusieurs études ont mis en évidence un rôle important du système ANP / NPR-A dans le contrôle de la pression sanguine et du système cardiovasculaire en général. Surtout, ce système tend à contrebalancer, directement ou indirectement, les effets du système rénine-angiotensine-aldostérone. Le SRAA est depuis longtemps une cible de choix pour le contrôle de l'hypertension et le traitement d'autres maladies cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité à travers les pays industrialisés du monde entier. Il est présentement impossible de réparer ou renverser des formes sévères de dérèglements cardiaques ou le remodelage caractéristique d'un cœur en détresse. Pour maintenir sa force d'éjection, le myocarde subit une phase de croissance hypertrophique, en réponse à l'hypertension, à la maladie ischémique, à une insuffisance vasculaire, ou à d'autres maladies du myocarde (Lorell and Carabello, 2000). Le développement

de cette hypertrophie, avec les années, mène souvent à des complications plus sérieuses comme une insuffisance cardiaque sévère et à la mort des patients (Levy et al., 1990). Bien que le système ANP / NPR-A agisse dans ce contexte comme un inhibiteur direct de cette réponse hypertrophique, il faut imaginer que sa capacité à limiter l'hypertrophie est réduite, puisque l'hypertrophie se développe quand même avec le temps (Holtwick et al., 2003;Molkentin, 2003).

Au début des années 90, il a été démontré que la capacité de production de GMPc du NPR-A est réduite lorsque celui-ci est mis en présence de fortes concentrations de l'agoniste ANP (Potter and Garbers, 1992). Cette désensibilisation est corrélée avec l'état de phosphorylation du NPR-A. En effet, le NPR-A, phosphorylé à l'état de base, perd ses résidus phosphates lorsque hyperstimulé avec l'agoniste ANP (Potter and Garbers, 1992). Il est d'ailleurs possible de sensibiliser et désensibiliser le NPR-A *in vitro*, en jouant avec l'état de phosphorylation du NPR-A (Foster and Garbers, 1998). Le NPR-A est aussi régulé *in vitro* par l'ATP sous forme non hydrolysable (Kurose et al., 1987). Le mécanisme par lequel le NPR-A se désensibilise est important puisqu'il permettrait peut-être d'expliquer le fait que le système ANP / NPR-A ne parvient pas à contrebalancer les mécanismes promoteurs de l'hypertrophie cardiaque (Molkentin, 2003).

Cette thèse a pour but d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Nous nous sommes intéressés au processus de désensibilisation du NPR-A, à la régulation de l'activité par l'ATP, ainsi qu'au mode de fonctionnement catalytique du domaine guanylate cyclase du NPR-A. Afin de comprendre les hypothèses de nos travaux, nous allons discuter en détail, dans la revue de la littérature, de la famille des peptides natriurétiques, de la structure de la protéine NPR-A et des guanylates cyclases, ainsi que des effets physiologiques médiés par ces protéines. Nous concluons cette section avec un aperçu des applications thérapeutiques des peptides natriurétiques.

# **CHAPITRE 1 : Les peptides natriurétiques**



## **Introduction aux peptides natriurétiques et peptides analogues**

Les travaux de De Bold et collaborateurs en 1981 ont initié la découverte des peptides natriurétiques et de peptides analogues (de Bold et al., 1981). Ils ont trouvé que l'injection IV d'homogénats de l'oreillette chez le rat induisait une forte baisse de pression sanguine, accompagnée par une excrétion rénale de sodium et d'eau. Suite à cette observation capitale, plusieurs chercheurs ont purifié des peptides de différentes tailles à partir du tissu de l'oreillette (Flynn et al., 1983;Currie et al., 1984;Kangawa et al., 1984;Misono et al., 1984b). Ces peptides avaient tous un effet natriurétique et une capacité de dilatation du muscle lisse. Plusieurs noms ont été donnés pour ces molécules : Facteur atrial natriurétique, cardionatine, atriopeptine, et peptide natriurétique de l'oreillette (ANP). Ce dernier nom est le plus utilisé aujourd'hui.

Quelques années plus tard, deux autres peptides, analogues de l'ANP, ont été purifiés à partir d'extraits de cerveaux de porc (Sudoh et al., 1988;Sudoh et al., 1990). Ils avaient, eux aussi, la capacité d'induire une relaxation du muscle lisse. Pour suivre l'ordre alphabétique, on les désigna comme BNP et CNP, bien que le CNP ne stimule pas la natriurèse au niveau physiologique. Les trois peptides ANP, BNP, et CNP sont maintenant aussi désignés type A, type B et type C, pour respecter le fait qu'ils sont chacun sécrétés dans divers tissus.

Une attention particulière sera accordée aux peptides natriurétiques traditionnels (ANP, BNP, et CNP) dans les prochaines sections, puisque ce sont les ligands physiologiques bien définis des récepteurs des peptides natriurétiques. Cependant, il existe d'autres peptides inclus dans cette famille : L'urodilatine, le DNP, la guanyline et l'uroguanyline. Il est important de préciser que ces peptides agissent sur des récepteurs distincts des récepteurs aux peptides natriurétiques, sauf peut-être pour le DNP.

### Autres peptides analogues :

L'urodilatine est un peptide natriurétique rénal très semblable à l'ANP. Il est d'ailleurs produit à partir du même gène et du même précurseur que l'ANP, lui laissant 4 acides aminés supplémentaires en N-terminal (**Figure 1.1**) (Schulz-Knappe et al., 1988). La protéase impliquée dans ce clivage n'est pas connue. Il est synthétisé uniquement par les cellules tubulaires rénales et sécrété au niveau luminal. Ce peptide lie le récepteur NPR-A présent sur la paroi luminale du tubule collecteur et induit une inhibition GMPc-dépendante de la réabsorption du sodium (Forssmann et al., 2001). Son rôle serait de contrôler la natriurèse rénale de façon autocrine. Il est présentement considéré pour une utilisation thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë, puisqu'il semble plus résistant à la dégradation enzymatique que l'ANP (Gagelmann et al., 1988;Forssmann et al., 2001).

<b>ANP:</b>	SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGGLGCNSFRY
<b>BNP:</b>	SPKMVQSGGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH
<b>CNP:</b>	GLSKGCFGLKLDRI G SMSGLGC
<b>DNP:</b>	EVKYDPCFGHKIDRINHVSNLGCPSLRDPRPNAPSTSA
<b>Urodilatine:</b>	TAPRSLRRSSCFGGRMDRIGAQSGGLGCNSFRY
<b>Guanyline:</b>	PGTCEICAYAACTGC
<b>Uroguanyline:</b>	MDDCELCVNVACTGCL
<b>ST (E.coli):</b>	MSSNYCCELC CNPACTGCT

**Figure 1.1 :** Alignement de séquences des membres de la famille des peptides natriurétiques.

La séquence GC conservée en C-terminal chez tous les membres de la famille est indiquée en ombrage. Les cystéines formant un ou plusieurs ponts disulfures dans les peptides sont indiquées en ombrage foncé.

Le peptide natriurétique dendroaspis (DNP) est un peptide de 38 résidus présent dans le venin de certains serpents et ayant une séquence similaire aux peptides natriurétiques humains (ANP, BNP, CNP) (**Figure 1.1**) (Parkes et al., 1988;Collins et al., 2000). Une molécule très similaire au DNP a été détectée dans l'oreillette cardiaque humaine et dans le plasma. Cette molécule est plus abondante dans le plasma de patients avec ICC (Insuffisance cardiaque congestive) (Schirger et al., 1999). Ce peptide a aussi été retrouvé dans le plasma

et l'oreillette du chien, et l'administration IV de DNP chez le chien produit une natriurèse importante (Lisy et al., 1999). Les effets marqués du DNP sur le rein suggèrent un potentiel intéressant pour son utilisation dans le traitement de maladies cardiovasculaires comme l'ICC. Les études avec le DNP indiquent que, comme l'ANP, celui-ci produit de la natriurèse, induit une relaxation de l'aorte chez le rongeur et des artères coronaires chez le chien, et augmente la formation de GMPc dans les cellules endothéliales aortiques (Schweitz et al., 1992; Collins et al., 2000). Des études sont présentement en cours pour confirmer la présence de DNP chez l'humain et pour préciser son rôle physiologique.

La guanyline (Currie et al., 1992) et l'uroguanyline (Hamra et al., 1993) sont des peptides peu similaires en séquence aux peptides natriurétiques. Ils ont en commun une séquence Gly-Cys conservée en C-terminal, ainsi que la présence de ponts disulfures (**Figure 1.1**). La découverte de ces peptides vient d'études des mécanismes cellulaires responsables d'une forme de diarrhée sécrétoire causée par des bactéries (Hughes et al., 1978; Field et al., 1978). En fait, la guanyline, l'uroguanyline, ainsi que les peptides ST résistants à la chaleur sécrétés par certaines bactéries activent tous un récepteur apical intestinal (guanylate cyclase C). La production de GMPc par ce récepteur induit une augmentation de la sécrétion intestinale de chlore et de bicarbonate (Forte, 2004). Le peptide ST de E.coli est résistant à la chaleur de par la présence de 3 ponts disulfure pour un peptide de 19 résidus (**Figure 1.1**). La guanyline et l'uroguanyline sont des peptides endogènes qui ont un rôle physiologique de régulation des cellules épithéliales de l'intestin et de modulation des taux de sodium par des effets sur le rein (Forte, 2004). Dans les dernières années, ces trois peptides ont été identifiés comme des agents thérapeutiques intéressants. L'uroguanyline montre des actions anti-tumeur intéressantes chez un modèle animal de cancer du colon (Steinbrecher et al., 2000; Shailubhai et al., 2000; Shailubhai, 2002; Mann et al., 2005). Les peptides ST eux peuvent être utilisés comme agents diagnostiques pour détecter des cancers du colon secondaires en utilisant une technique d'imagerie qui permet de localiser des formes métastatiques de cancer du côlon (Wolfe et al., 2002; Giblin et al., 2004). La famille des peptides guanyline pourrait aussi être utile dans le traitement d'autres pathologies : Syndrome du colon irritable, haute pression sanguine, régénération et réparation du foie, et maladies respiratoires comme l'asthme (Forte, 2004). De plus, le design d'inhibiteurs pharmacologiques

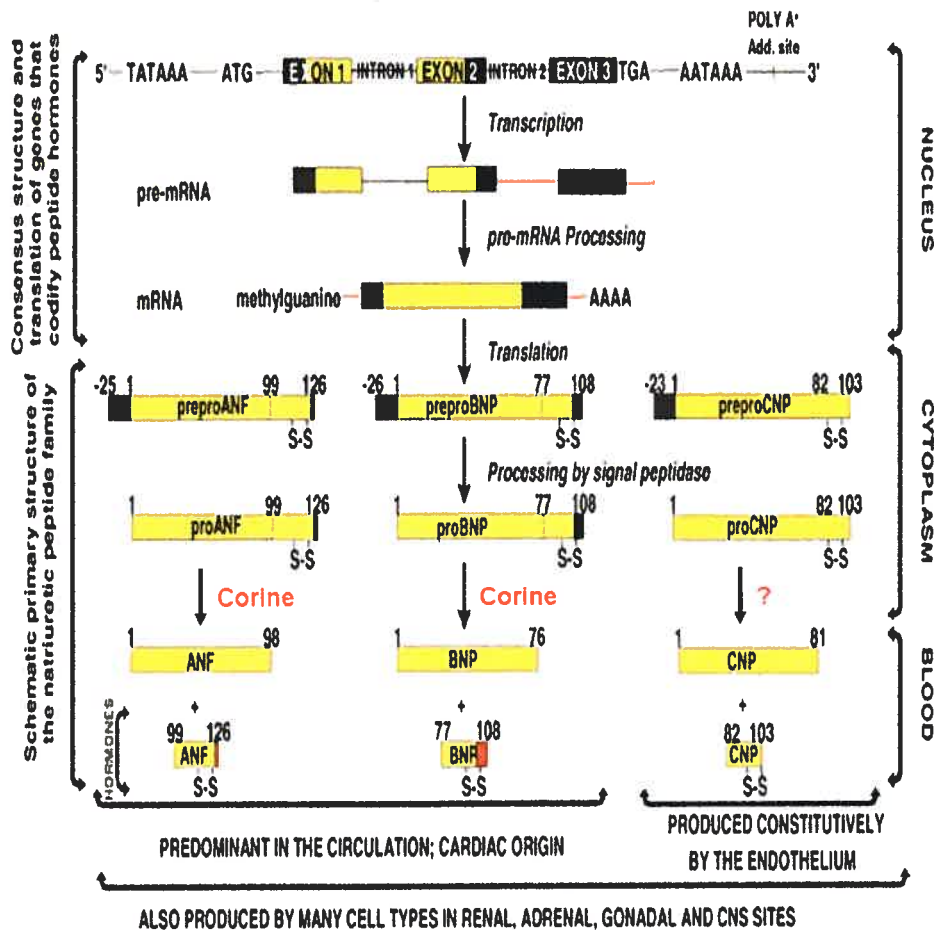
compétitifs des peptides ST pourrait servir à traiter les diarrhées sévères causées par certaines bactéries présentes dans la diète (Forte, 2004).

## **1.1 Le peptide natriurétique de type A**

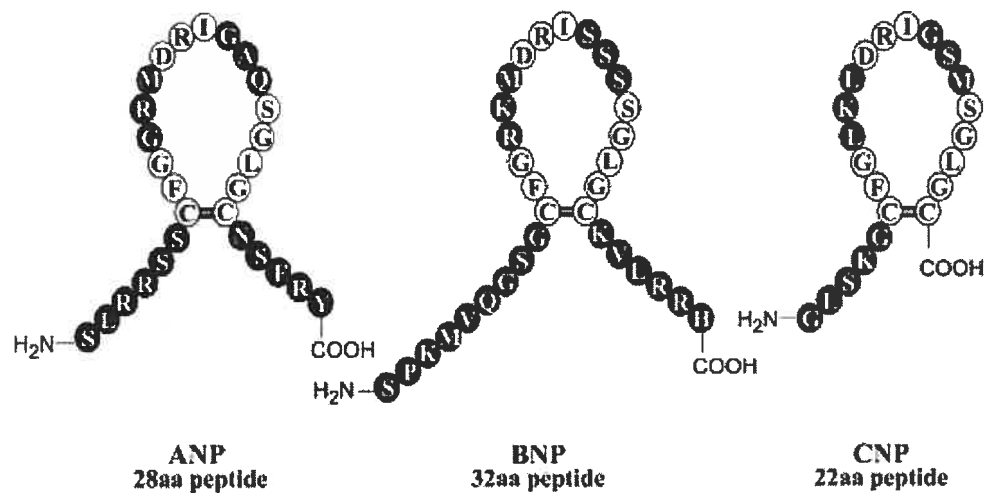
### ***1.1.1 Biosynthèse et structure***

Tous les peptides natriurétiques sont synthétisés sous forme de préprohormones (**Figure 1.2**). Le preproANP humain contient 151 acides aminés. La séquence signal en N-terminal est d'abord clivée, ce qui génère le proANP de 126 acides aminés (**Figure 1.2**). Ce peptide est ensuite transporté dans le réseau de Golgi et entreposé dans des granules de sécrétion dans les cellules de l'oreillette. Lorsqu'il est relâché dans la circulation, il est rapidement clivé par une sérine protéase membranaire de type deux appelée corine pour former le peptide biologiquement actif de 28 acides aminés (Yan et al., 2000; Wu et al., 2002). Il a d'ailleurs été démontré que la délétion de l'expression de corine chez les souris induit une hypertension et aucun ANP circulant n'est détecté (Chan et al., 2005). La corine aurait aussi pour rôle de cliver le proBNP (Yan et al., 2000). Cependant la protéase de conversion du proCNP reste inconnue puisque les animaux sans corine exprimée produisent des niveaux normaux de CNP mature (Chan et al., 2005).

La structure en boucle de 17 résidus, maintenue par un pont disulfure entre 2 résidus cystéines, est nécessaire à l'activité biologique de l'ANP (**Figure 1.3**) (Misono et al., 1984a). La modification de la région N-terminale de l'ANP n'a pas d'effet majeur sur l'activité biologique du peptide, et n'affecte pas significativement son affinité pour le récepteur. Cependant, la délétion ou l'ajout de résidus arginine en C-terminal réduit considérablement l'affinité ainsi que l'activité physiologique du peptide (Garcia et al., 1985; De Lean et al., 1985).



**Figure 1.2 :** Étapes de transcription et traduction des peptides natriurétiques. Représentation schématique de la structure et des événements de transcription et traduction des gènes codant pour les peptides natriurétiques, ainsi que les étapes de modification impliquées dans la production des peptides ANP, BNP, et CNP circulants. Modifié de (McGrath and de Bold, 2005)



**Figure 1.3 :** Séquences et structures des peptides natriurétiques humains. La boucle de 17 acides aminés formée entre les deux résidus cystéines est essentielle à leur activité biologique. Les résidus conservés sont en blanc. Tiré de (Scotland et al., 2005a).

### *1.1.2 Expression tissulaire et génique*

L'ANP est surtout exprimé et entreposé dans l'oreillette, bien qu'il soit aussi présent en faibles concentrations dans d'autres tissus comme les ventricules, la glande pituitaire, les poumons, l'hypothalamus, et le rein. Le stimulant principal pour la sécrétion de l'ANP est l'étirement de la paroi de l'oreillette suite à une augmentation du volume intravasculaire (de Bold et al., 1986; Edwards et al., 1988). Plusieurs hormones, comme l'endothéline (Stasch et al., 1989), l'angiotensine (Soualmia et al., 1997), et l'arginine-vasopressine (Lachance et al., 1986), stimulent la relâche de l'ANP. Certaines situations physiologiques peuvent aussi stimuler la relâche d'ANP. Ainsi, s'immerger dans l'eau (Ogihara et al., 1986), prendre une position couchée ou ingérer beaucoup de sel (Hollister et al., 1986), ou faire un exercice physique induit une augmentation des niveaux d'ANP dans le plasma (Evrard et al., 1999). On considère que la sécrétion d'ANP adopte un mode semi-constitutif, puisque 60% de l'ANP nouvellement synthétisé est entreposé alors que 40% est sécrété en absence de stimulation (Iida and Shibata, 1994). Normalement, la concentration plasmatique d'ANP est environ 10

fmol/mL (10 pM), mais augmente de 10 à 30 fois chez des patients avec ICC (Cody et al., 1986; Mukoyama et al., 1991).

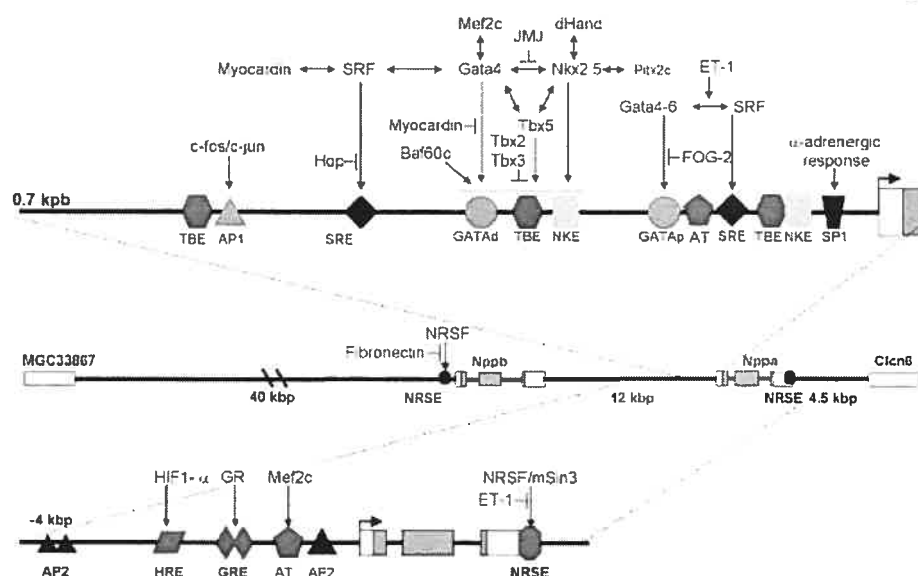
Le gène humain codant pour l'ANP, nommé *Nppa*, est situé sur le chromosome 1p36.2 et contient 3 exons séparés par 2 introns (**Figure 1.2**). La délétion de ce gène chez la souris induit une hypertension (John et al., 1996), alors que la surexpression du gène induit une hypotension artérielle (Steinhilber et al., 1990). Un niveau important de contrôle de l'expression de l'ANP se produit au niveau du promoteur du gène codant pour l'ANP (**Figure 1.4**). Ainsi, une séquence de 2.4 kilobases en 5' du gène est suffisante pour avoir une transcription spécifique d'un gène rapporteur, alors que l'activité du gène est fortement réduite lorsque la région en 5' est réduite à 700 paires de bases (Seidman et al., 1988).

Le promoteur du gène de l'ANP a été très utilisé comme modèle pour identifier les voies de régulation de la transcription impliquées dans le contrôle des gènes cardiaques. Son schéma de régulation est complexe et seuls les principaux régulateurs seront décrits ci-après (**Figure 1.4**).

Deux éléments de réponse au sérum (SRE) sont présents à moins de 700 pb du gène. *Srf* est un facteur de transcription exprimé dans les cellules musculaires lisses cardiaques et squelettiques. Il est capable d'activer différents promoteurs en s'associant avec des cofacteurs (*Nkx2.5*, *Gata4-6*, et *myocardine*) (Houweling et al., 2005).

*Nkx2.5* est un membre de la famille de gènes NK homeobox. Il joue un rôle critique dans le développement cardiaque. Des mutations dans le gène codant pour *Nkx2.5* induisent des problèmes de conduction atrioventriculaire (Hatcher et al., 2000), et une délétion du gène chez la souris entraîne un arrêt de développement cardiaque et la mort des souris (Lyons et al., 1995; Tanaka et al., 1999).

Le promoteur proximal contient 2 sites de liaison pour les facteurs de transcription GATA. Les sites peuvent lier GATA 4 et 6. GATA4 peut agir en synergie avec d'autres éléments (*MEF2c*, *Tbx5*, *Srf*, et *Nkx2.5*). Il est inhibé par le facteur de transcription JMJ et par FOG-2. Le facteur GATA4 est un facteur important dans la différenciation des cardiomyocytes (Grepin et al., 1997).



**Figure 1.4 :** Représentation schématique du promoteur du gène de l'ANP humain (Nppa).

Les interactions connues entre les facteurs de transcription régulateurs et leurs éléments de réponse sont indiquées. Tiré de (Houweling et al., 2005)

Les facteurs de transcription T-box (Tbx2, 3, 5, et 20) se lient aux éléments de liaison T-box (TBE). 3 TBE sont présents dans le promoteur de l'ANP. Tbx5 est un activateur important du gène. Il se lie sur ces sites et peut s'associer avec Nkx2.5 pour activer le promoteur de façon synergique. Le rôle de Tbx20 n'est pas encore bien défini alors que Tbx2 et 3 sont des répresseurs du promoteur et inhibent Tbx5 et Nkx2.5 (Houweling et al., 2005).

L'hétérodimère c-fos/c-jun est impliqué dans la liaison à l'élément AP-1 lors de la réponse hypertrophique ventriculaire (Rosenzweig et al., 1991). La présence de 2 éléments de réponse aux glucocorticoïdes va de pair avec le fait que la dexaméthasone induit une augmentation de production d'ANP similaire à une hypertrophie ventriculaire (Day et al., 1987).

La stimulation adrénergique induite par la phényléphrine passerait par l'activation des éléments AP-1, SP-1, et SRE (Houweling et al., 2005). La stimulation de myocytes cardiaques en culture avec l'isoprotérénol est aussi bien documentée et passe spécifiquement par l'activation du récepteur  $\beta_1$  (Morisco et al., 2001).



Le gène de l'ANP est stimulé rapidement lorsqu'il y a ischémie. Le manque d'oxygène active en effet un facteur de transcription induit par l'hypoxie, le HIF-1. Celui-ci se lie sur l'élément HRE situé en position -2307 sur le promoteur et active la transcription (Chun et al., 2003).

L'endothéline-1 produit une hypertrophie des cellules atriales et ventriculaires *in vitro*, et active le gène de l'ANP (Shubeita et al., 1990). D'ailleurs, la production d'ET-1 est augmentée dans le cœur défaillant. L'inhibition de l'ET-1 améliore la survie de rats avec insuffisance cardiaque et prévient l'hypertrophie (Sakai et al., 1996). La réponse à ET-1 passe par l'activation des sites SRE et GATA positionnés tout près du gène (Morin et al., 2001).

### ***1.1.3 Catabolisme***

Deux mécanismes sont responsables de l'élimination de l'ANP circulant : L'internalisation par le récepteur NPR-C, ainsi que le clivage protéolytique par l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP). Le NPR-C présente une homologie de séquence en acides aminés de 30% par rapport au NPR-A, mais est nettement plus exprimé que ce dernier (McGrath and de Bold, 2005). Son domaine intracellulaire ne contient que 37 acides aminés, présents aussi dans d'autres protéines impliquées dans la clairance de peptides ou de protéines. L'ANP est rapidement internalisé et dégradé dans les lysosomes (Cohen et al., 1996), puisque l'affinité de l'ANP pour le NPR-C est plus élevée que pour le CNP ou le BNP (Suga et al., 1992a). La NEP inactive l'ANP en clivant ses résidus hydrophiles (Erdos and Skidgel, 1989). L'ANP est surtout clivé entre les résidus 7 et 8 (Cys-Phe) (Kenny et al., 1993; Yandle, 1994). Cette métalloprotéase à zinc est retrouvée surtout dans le tubule rénal proximal du rein, mais aussi à travers l'endothélium vasculaire, dans le poumon, et dans le cœur (Skidgel et al., 1984). La NEP est non saturable et contribue à l'élimination rapide de l'ANP au rein (Skidgel et al., 1984; Hashimoto et al., 1994). La demi-vie plasmatique de l'ANP est ainsi d'environ 2 à 5 minutes (McGrath and de Bold, 2005).

## **1.2 Le peptide natriurétique de type B**

### ***1.2.1 Biosynthèse et structure***

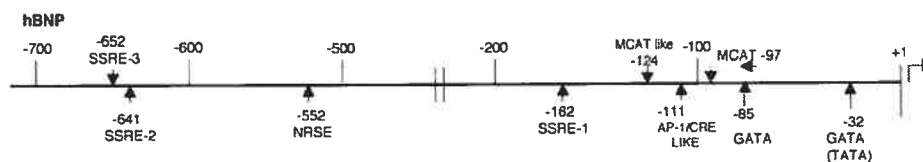
Le BNP humain est synthétisé sous forme de préprohormone de 134 résidus contenant une séquence signal qui est clivée pour former une prohormone de 108 acides aminés (**Figure 1.2**). Une protéase, possiblement la corine (Yan et al., 2000), clive cette prohormone pour former le BNP de 32 acides aminés (**Figure 1.3**) et un fragment inactif de 76 résidus (Seilhamer et al., 1989).

### ***1.2.2 Expression tissulaire et génique***

Originellement purifié à partir de cerveau de porc, le BNP et son ARNm sont plus abondants dans l'oreillette que dans les ventricules. Cependant, si on prend en considération le poids des ventricules, le BNP est nettement plus abondant dans les ventricules cardiaques et constitue 70% du BNP cardiaque (Mukoyama et al., 1990; Mukoyama et al., 1991). Le BNP est aussi retrouvé en faibles quantités dans les poumons, les reins, et la glande surrénale (Gerbes et al., 1994). Dans l'oreillette, le BNP est entreposé avec l'ANP dans les granules de sécrétion. Mais dans les ventricules, le BNP n'est pas entreposé. La transcription du BNP par les myocytes du ventricule est principalement régulée par un étirement de la paroi tissulaire causée par une surcharge de volume sanguin. Ce processus est régulé finement par un facteur de transcription nucléaire nommé GATA4 (Thuerauf et al., 1994; Grepin et al., 1994). Normalement, la concentration plasmatique de BNP est environ 1 fmol/mL (1 pM), donc 10 fois moins que l'ANP, mais augmente de 200 à 300 fois chez des patients avec ICC. Cette différence énorme pour le BNP en fait un marqueur idéal pour mesurer le stress cardiaque (Mukoyama et al., 1991).

Le gène codant pour le BNP est placé en amont du gène de l'ANP sur le même chromosome, à 8 kb de distance. La délétion du gène de BNP chez la souris induit une fibrose cardiaque (Tamura et al., 2000), alors que la surexpression de ce gène produit une hypotension artérielle ainsi qu'une surcroissance osseuse (Ogawa et al., 1994; Suda et al., 1998). Le promoteur du gène BNP chez l'humain

contient plusieurs éléments de réponse (**Figure 1.5**). Un site GATA est localisé en position -85, 2 éléments MCAT en -97 et -124 sont séparés par un élément ressemblant à AP-1/CRE en position -111. Un autre site GATA, en position -32, agit comme boîte TATA (Ma et al., 2005). Les sites GATA lient les facteurs de transcription GATA4-6 présent dans le cœur (Molkentin and Olson, 1997). Les sites MCAT se lient à des membres de la famille TEF alors que le site analogue à AP-1/CRE est possiblement une cible pour les membres de la famille Jun/Fos/ATF. La régulation du gène hBNP implique donc plusieurs voies de signalisation. Certaines ciblent la région proximale (-124 à -80), alors que d'autres ciblent des éléments distaux. Les régions GATA, MCAT, et AP-1 sont plutôt impliquées dans une régulation basale et répondent à des signaux de croissance et pro-inflammatoires. L'élément GATA est activé par certains agonistes  $\beta$ -adrénergiques et par l'endothéline-1. L'élément MCAT lui est aussi activé par certains agonistes  $\beta$ -adrénergiques et par l'interleukine-1. Finalement, l'élément AP-1 est généralement activé par des facteurs de stress (Ma et al., 2005; LaPointe, 2005). La région proximale répond aussi à la présence d'une blessure ischémique. Les éléments plus distaux sont responsables de la réponse à l'étirement mécanique, à la phényléphrine, et à l'hormone thyroïdienne (LaPointe, 2005). Ces stimuli activent aussi le site GATA. Des éléments régulateurs plus distaux montrent aussi des sites de liaison pour Ets et Nkx2.5 (Pikkarainen et al., 2003). On retrouve aussi un site NRSE, d'abord identifié dans les neurones, possiblement ici ciblé par l'endothéline.



**Figure 1.5 :** Régions régulatrices en amont du promoteur du gène du BNP humain.

Les flèches indiquent le nom et l'emplacement des motifs régulateurs. SSRE = élément de réponse au stress, NRSE = élément de réponse restreint aux neurones.

Tiré de (LaPointe, 2005)

### ***1.2.3 Catabolisme***

Tout comme pour l'ANP, le BNP est retiré de la circulation par internalisation via le NPR-C et dégradé par la NEP. Cependant, la NEP est plus active sur le CNP et l'ANP que sur le BNP (Stoupakis and Klapholz, 2003). Le clivage se fait d'abord entre les résidus 4 et 5 du BNP (Met-Val), et ensuite entre les résidus 17 et 18 (Arg-Ile). De plus, l'affinité du BNP pour le NPR-C est plus faible que les autres peptides natriurétiques. Ceci explique la demi-vie plus longue du BNP (environ 20 minutes) comparé à l'ANP ou au CNP (environ 2 minutes) (Cauliez et al., 2005; Potter et al., 2006).

## **1.3 Le peptide natriurétique de type C**

### ***1.3.1 Biosynthèse et structure***

Le CNP est présent sous 2 versions chez l'humain et sa séquence est hautement conservée entre les espèces. Le proCNP humain contient 103 acides aminés (**Figure 1.2**). Ce peptide est clivé par une endoprotéase intracellulaire nommée furine pour libérer un CNP de 53 acides aminés (Wu et al., 2003). Ce peptide peut ensuite être clivé par une protéase inconnue pour produire un CNP de 22 résidus (**Figure 1.3**). Le CNP-53 et le CNP-22 semblent avoir des effets identiques mais le CNP-22 est plus abondant *in vivo* (Yeung et al., 1996a). On attribue donc la majorité des effets physiologiques au CNP-22. Cependant leur expression varie d'un tissu à l'autre. Le CNP-53 est la forme majeure retrouvée dans le cerveau, dans les cellules endothéliales, et dans le cœur, alors que le CNP-22 est prédominant dans le plasma et dans le liquide cérébro-spinal (Potter et al., 2006). Les concentrations plasmatiques normales de CNP sous ces 2 formes sont d'environ 5-10 fmoles/mL (Stingo et al., 1992) et sont peu ou pas augmentées chez les patients avec ICC (Potter et al., 2006).

### ***1.3.2 Expression tissulaire et génique***

Le CNP est le peptide natriurétique le plus hautement exprimé dans le cerveau. On le retrouve en hautes concentrations dans les chondrocytes (Hagiwara

et al., 1994a;Hagiwara et al., 1994b) et dans les cellules endothéliales exposées aux cytokines (Suga et al., 1992b). Il n'est pas entreposé dans des granules de sécrétion et les forces de cisaillement augmentent la sécrétion de CNP de ces cellules (Chun et al., 1997). Dans les cellules endothéliales en culture, sa sécrétion est augmentée par la présence de TGF- $\beta$  (Suga et al., 1992b), de lipopolysaccharides, et de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 (Suga et al., 1993), mais diminuée par l'insuline (Igaki et al., 1996). Les LDL oxydés (Sugiyama et al., 1995) et le VEGF inhibent aussi sa production (Doi et al., 1996).

Le gène codant pour le CNP humain est situé sur le chromosome 2q24. La délétion de ce gène chez la souris ne produit aucun changement sur le système cardiovasculaire. Les souris ont par contre un déficit sévère de croissance osseuse et meurent rapidement (Chusho et al., 2001). Des études chez la souris ont démontré que la région de 4 kb précédant le gène codant pour CNP est nécessaire et suffisante pour l'expression correcte du gène (Gravel et al., 1998). Le gène contient un élément riche en GC, auquel le nouveau facteur de transcription TSF1 se lie. TSF1 est d'ailleurs nécessaire pour la transcription constitutive et TGF- $\beta$ -dépendante du gène (Ohta et al., 2000).

### ***1.3.3 Catabolisme***

Le CNP est aussi retiré de la circulation par le NPR-C. Il est le peptide natriurétique préféré de la NEP (Kenny et al., 1993). Il est donc rapidement hydrolysé par celle-ci. Sa demi-vie est semblable à celle de l'ANP, soit environ 2 minutes (Hunt et al., 1994).

## **CHAPITRE 2 : La famille des guanylates cyclases**

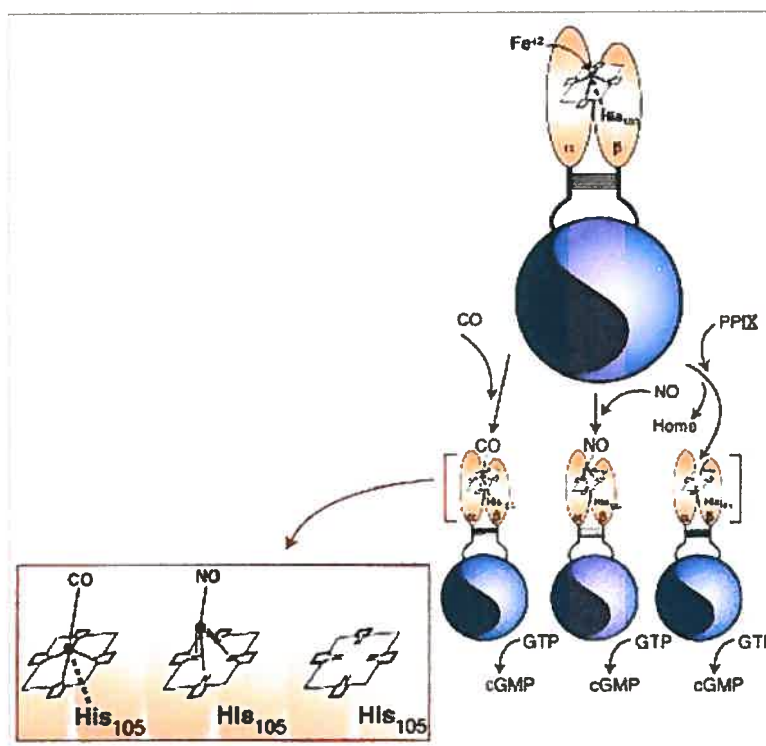
## Introduction

Les guanylates cyclases sont des enzymes qui synthétisent le GMPc en réponse à divers agents, comme l'oxyde nitrique, les ligands peptidiques, et le calcium intracellulaire. Dans les années 70, il a été démontré qu'une activité guanylate cyclase se retrouvait dans des fractions solubles et particulières de plusieurs cellules, et que ces activités étaient dues à des protéines différentes. La purification de la guanylate cyclase du compartiment soluble a révélé que cette forme est un hétérodimère composé d'une sous-unité  $\alpha$  de 72 à 82 kDa, et d'une sous-unité  $\beta$  de 70 kDa. Pour obtenir une activité guanylate cyclase dans un système d'expression hétérologue, il doit y avoir cotransfection des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , ce qui indique que l'assemblage des sous-unités est nécessaire pour avoir un site catalytique fonctionnel.

L'étude de l'activité guanylate cyclase particulière s'est d'abord effectuée en utilisant comme modèle l'oursin de mer. En effet, le sperme de l'oursin de mer est une source très riche de GCp. Dans ce système, les peptides sécrétés par les œufs activaient la GCp du sperme de façon très spécifique selon l'espèce (Ramarao and Garbers, 1985). De plus, ces peptides pouvaient être liés par réaction chimique à des protéines membranaires de la même taille que celles reconnues par un antisérum contre le domaine guanylate cyclase (Shimomura et al., 1986). Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que cette GCp sert aussi de récepteur aux ligands peptidiques. La première GCp a donc été clonée en 1988 à partir d'une librairie d'ADNc d'oursin de mer, en utilisant des sondes basées sur les fragments peptidiques issus du clivage protéolytique de l'enzyme purifiée (Singh et al., 1988). Ce clone fournira les sondes qui serviront ensuite au clonage des guanylates cyclases retrouvées dans les tissus des mammifères. Des études montreront ensuite que la guanylate cyclase particulière se retrouve sous forme d'homodimère ou d'homo-oligomère, où deux sous-unités identiques s'assemblent pour former le récepteur fonctionnel (Padayatti et al., 2004).

## 2.1 La guanylate cyclase soluble

Les guanylates cyclases solubles (GCs) sont des hétérodimères ubiquitaires activés de 100 à 300 fois par le NO (Padayatti et al., 2004). Elles sont impliquées dans la neurotransmission et dans les processus de vasodilatation. En ce sens elles ont été des cibles de choix dans la découverte de drogues pour traiter les maladies cardiovasculaires et les dysfonctions érectiles (Lincoln, 1989; Nakane, 2003). La GCs contrôle la relaxation du muscle lisse, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes, et elle module la transmission synaptique (Friebe and Koesling, 2003). L'hétérodimère GCs est composé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Chacune contient un domaine régulateur, un domaine en hélice, et un domaine cyclase (**Figure 2.1**).



**Figure 2.1 :** Structure et activation de la GCs.

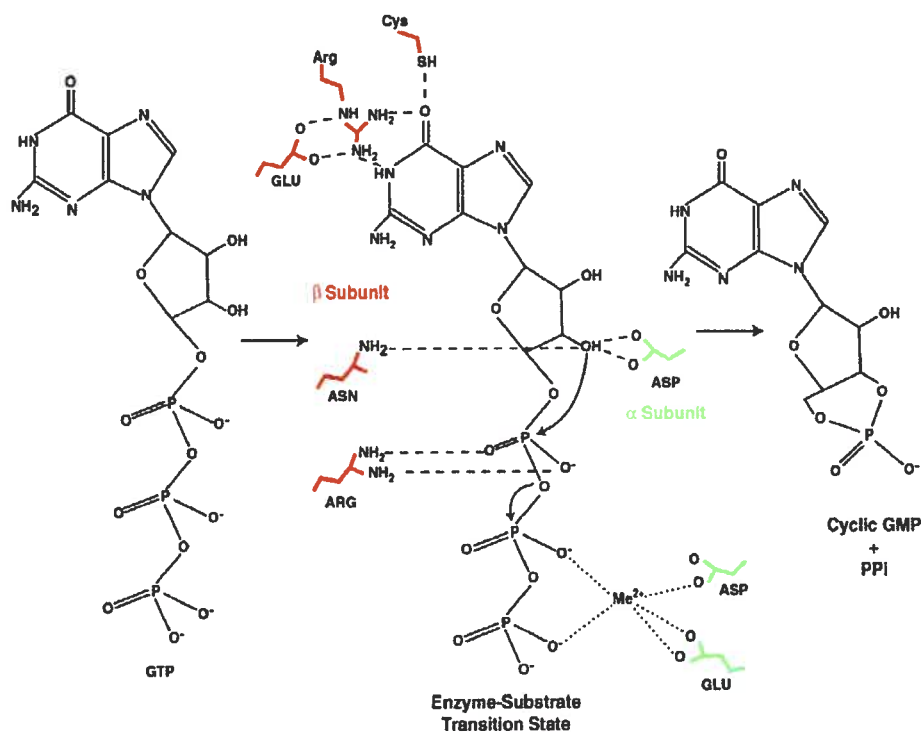
Tiré de (Lucas et al., 2000). Les GCs contiennent un groupement prosthétique hème avec un cœur ferreux pentavalent. Ce cœur est associé à une histidine en position 105. Le NO active la GCs en se liant à la position 6 du cœur ferreux. Ceci brise le lien fer-histidine et déplace le fer hors du plan du centre porphyrine. Ceci crée une structure qui ressemble à la protoporphyrine IX, un activateur puissant de



la GCs. Le monoxyde de carbone peut aussi lier le groupe hème de la GCs. Cela crée un complexe hexavalent dans lequel le noyau ferreux est associé à l'histidine et au CO en même temps. Le CO est un activateur moins puissant que le NO, mais il a une plus haute affinité que le NO pour la GCs (Lucas et al., 2000).

Il existe plusieurs isoformes d'hétérodimères. L'hétérodimère  $\alpha 1/\beta 1$  est le plus abondant, mais il existe aussi des hétérodimères avec  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ , ainsi que des versions d'épissage alternatif (Krumenacker et al., 2004). La sous-unité  $\alpha 2$  est particulière. Elle contient une région d'interaction PDZ qui positionne la GCs  $\alpha 2/\beta 1$  aux membranes synaptiques (Russwurm et al., 2001).

Les guanylates cyclases sont des enzymes qui catalysent la transformation du substrat GTP en GMP cyclique et pyrophosphate. Trois résidus sont chargés de déterminer la spécificité du substrat en interagissant avec la purine. Pour la guanylate cyclase soluble (**Figure 2.2**), ces résidus invariables sont Glu, Arg, et Cys dans la sous-unité  $\beta$ . Trois résidus sont aussi nécessaires pour avoir un centre catalytique. Un résidu Asp provenant d'une sous-unité  $\alpha$ , et une paire Asn/Arg provenant de la sous-unité  $\beta$  (**Figure 2.2**). Des résidus Asp et Glu de la sous-unité  $\alpha$  coordonnent le cation  $Mg^{2+}$  (Lucas et al., 2000). Les résidus chargés de la spécificité du substrat (Glu, Arg, Cys) sont retrouvés autant dans la sous-unité  $\alpha$  que dans la sous-unité  $\beta$ , mais les résidus impliqués dans le centre catalytique sont modifiés dans les sous-unités. Le résidu correspondant au résidu Asp de la sous-unité  $\alpha$  est plutôt un résidu Gly dans la sous-unité  $\beta$ . Également, les résidus Asn et Arg de la sous-unité  $\beta$  sont modifiés en Thr et Lys dans la sous-unité  $\alpha$ . Il y a donc un seul site catalytique dans la GCs, mais il y a possiblement deux sites de liaison du GTP. Des études récentes suggèrent que le site non catalytique de la GCs pourrait lier des nucléotides et réguler l'activité du site actif adjacent (Chang et al., 2005). Les résidus impliqués dans la catalyse de la GCs sont les mêmes dans la guanylate cyclase particulière, cependant dans le cas de la GCp les deux sous-unités sont identiques et s'assemblent en tête-à-queue pour former l'enzyme fonctionnelle. Puisque chaque sous-unité contient tous les acides aminés nécessaires à la catalyse ci-haut mentionnés, la GCp pourrait contenir deux sites catalytiques.



**Figure 2.2 :** Mécanisme catalytique de la guanylate cyclase.

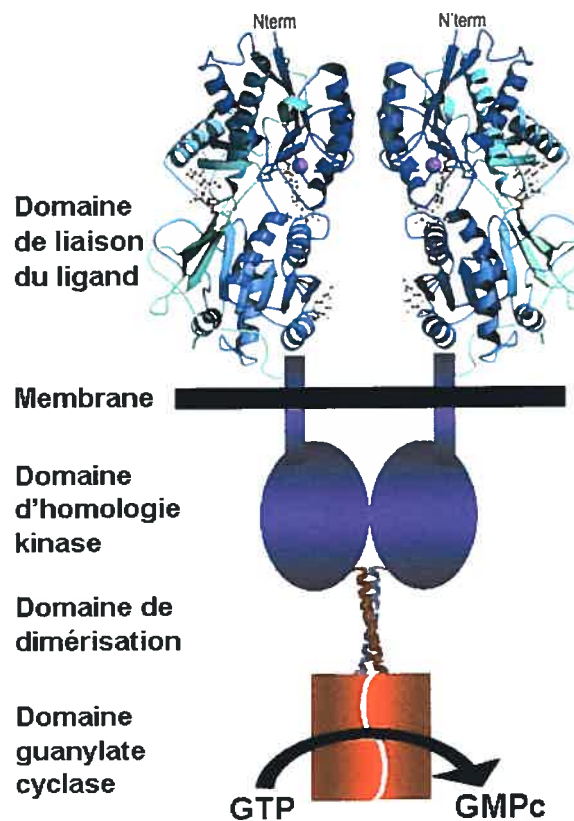
Ici, pour la guanylate cyclase soluble, le GTP se lie à un seul site catalytique. La purine est liée de façon spécifique à des résidus de la sous-unité  $\beta$  (en rouge). Le cation divalent ( $Me^{2+}$ ) stabilise les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide. Il se lie aussi à des résidus acides de la sous-unité  $\alpha$  (en vert). Chaque sous-unité fournit des résidus qui sont responsables du clivage du lien  $\alpha$ -phosphoanhydride par une réaction de déplacement. Tiré de (Lucas et al., 2000).

## 2.2 Les guanylates cyclases particulières

### Introduction

Pour les guanylates cyclases particulières, un unique passage transmembranaire divise la molécule en un domaine de liaison extracellulaire et une région intracellulaire contenant un domaine homologue aux protéines kinases, une région charnière de dimérisation, et un domaine guanylate cyclase (**Figure 2.3**). Il y a sept isoformes de GcP chez les mammifères, nommées GC-A à GC-G.

La GC-A et la GC-B sont en fait les récepteurs NPR-A et NPR-B. Ils sont donc classés à la fois dans la famille des guanylates cyclases et celle des récepteurs aux peptides natriurétiques. De plus, GC-A-B-C sont les seuls récepteurs qui ont des ligands connus. L'ANP et le BNP se lient sur la GC-A (NPR-A), le CNP se lie sur la GC-B (NPR-B), et la guanyline, l'uroguanyline, et les entérotoxines bactériennes se lient sur la GC-C. La GC-C ne fait pas officiellement partie des récepteurs aux peptides natriurétiques, bien que ses ligands, guanyline et uroguanyline, sont parfois considérés comme des membres de la famille des peptides natriurétiques. Les GC-D-E-F-G sont tous des récepteurs orphelins.

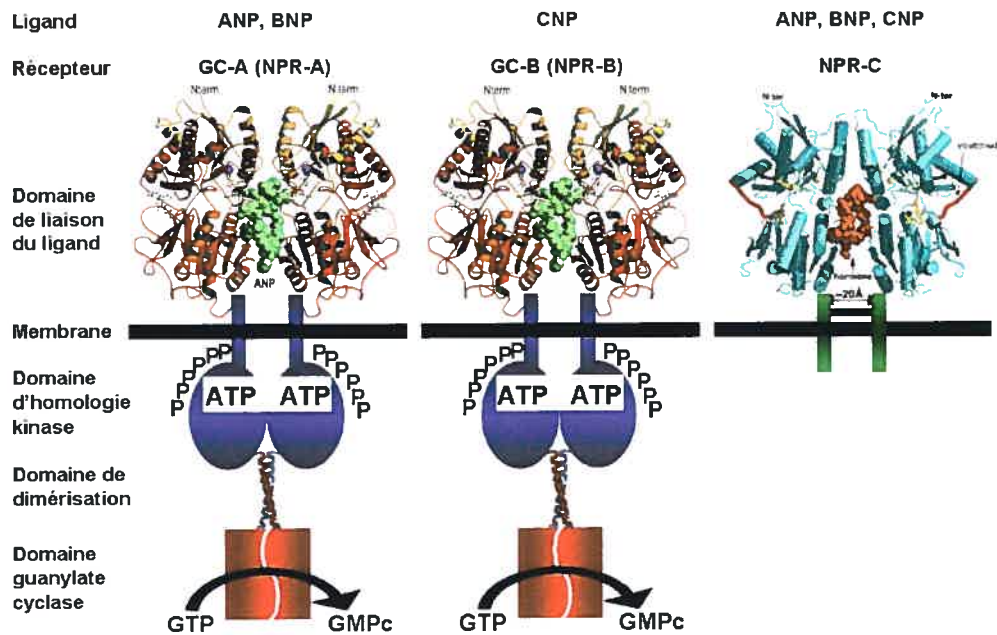


**Figure 2.3 :** Topologie générale des guanylates cyclases particulières.

Les prochaines sections exposeront en détail l'état des connaissances concernant les récepteurs aux peptides natriurétiques : NPR-A (GC-A), NPR-B (GC-B), et NPR-C (**Figure 2.4**). Nous discuterons ensuite de façon concise des autres guanylates cyclases C à G.

## Historique des récepteurs aux peptides natriurétiques

En 1984, des chercheurs de l'Institut de recherches cliniques de Montréal ont démontré que l'ANP faisait augmenter les concentrations de GMPc dans certains tissus de rat, dans l'urine, et dans des cultures primaires de cellules tubulaires rénales (Hamet et al., 1984). Au même moment, il a été démontré que l'ANP activait une guanylate cyclase particulière dans différents homogénats de tissus de rat (Waldman et al., 1984; Winquist et al., 1984). La GC soluble, elle, n'était pas activée par l'ANP. Pour identifier la protéine de liaison à l'ANP, des études de photomarquage et de liaison covalente chimique furent entreprises. Ces études permirent d'identifier des protéines de 60 et 120-140 kDa sur SDS-PAGE (Hirose et al., 1985; Yip et al., 1985; Vandlen et al., 1985; Misono et al., 1985). Après sa purification et le clonage de son ADNc, la petite protéine de 60 kDa fut décrite comme un récepteur homodimère contenant un pont disulfure interchaîne (Schenk et al., 1987; Fuller et al., 1988). Cette protéine, appelée NPR-C, a un domaine de liaison extracellulaire, un unique passage transmembranaire, et un petit domaine intracellulaire de 37 acides aminés (**Figure 2.4**). La purification de la plus grosse protéine révéla que la liaison de l'ANP accompagnait l'activité guanylate cyclase (Kuno et al., 1986; Meloche et al., 1988). Cette protéine, nommée NPR-A, ou GC-A, a été clonée en 1989 à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau de rat en utilisant une sonde issue du clonage de la GCp de l'oursin de mer. (Lowe et al., 1989; Chinkers et al., 1989). La séquence de cette protéine démontra que le site de liaison et le domaine guanylate cyclase étaient présents dans la même protéine. La même méthode de clonage permit d'identifier un autre récepteur, le NPR-B (Schulz et al., 1989; Chang et al., 1989). Avec les deux ADNc, il fut possible de transfecter des cellules et de déterminer la spécificité de liaison des peptides ANP, BNP, et CNP. L'ANP et le BNP stimulent le NPR-A, alors que le CNP stimule le NPR-B (**Figure 2.4**) (Koller et al., 1991; Suga et al., 1992a). Les 3 peptides peuvent lier le NPR-C, mais l'affinité de liaison de ceux-ci suit l'ordre suivant : ANP > CNP > BNP.



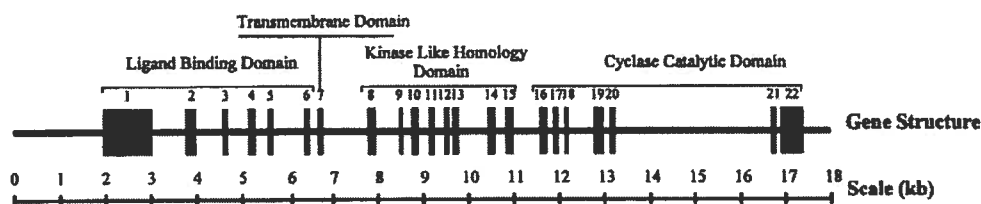
**Figure 2.4 :** Récepteurs des peptides natriurétiques et spécificité de liaison des peptides.

## 2.2.1 Le récepteur A des peptides natriurétiques ou GC-A

### 2.2.1.1 Expression tissulaire et génique

L'ARNm codant pour le NPR-A est présent dans plusieurs tissus, comme le rein, le tissu adipeux, l'aorte, les poumons, la glomérulosa des surrénales, la médulla des surrénales, la glande pituitaire, le cervelet, et dans les cellules endothéliales de l'endocarde (Wilcox et al., 1991;Potter et al., 2006). Des analyses par Western blot chez le rat ont indiqué des niveaux élevés de NPR-A dans les poumons, le rein, la surrénale, les testicules, et le foie (Goy et al., 2001;Muller et al., 2004).

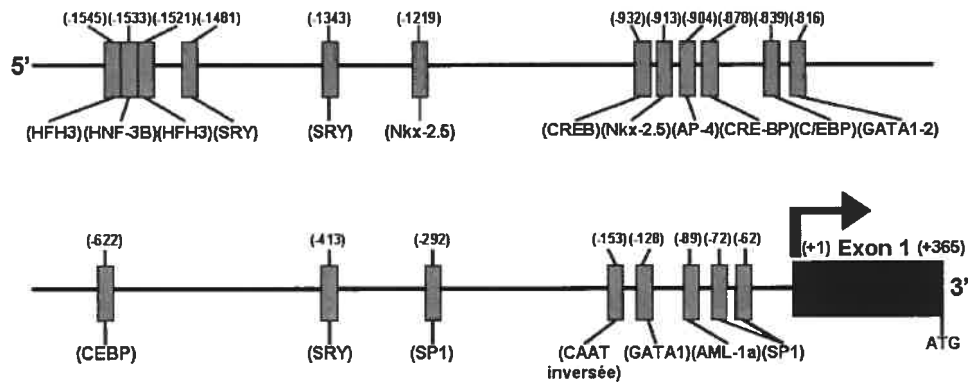
Le gène codant pour le NPR-A humain fait environ 16 kb, contient 22 exons et 21 introns, et se trouve sur le chromosome 1q21-22 (**Figure 2.5**) (Takahashi et al., 1998).



**Figure 2.5 :** Structure du gène codant pour le NPR-A.

Tiré de (Garg et al., 2002).

L'analyse de la séquence du promoteur du gène du NPR-A a identifié certains sites de liaison pour des facteurs de transcription connus, mais le rôle fonctionnel de ces sites reste à être élucidé. L'expression du NPR-A est régulée par son propre ligand au niveau transcriptionnel. Ainsi, le traitement de cellules en culture avec ANP ou le 8-bromo-GMPc (un analogue du GMPc perméable aux cellules) provoque une réduction des niveaux d'ARNm du NPR-A, qui a été corrélée avec une diminution dose-dépendante de l'activité du promoteur du NPR-A (Cao et al., 1995; Cao et al., 1998). L'élément de réponse au GMPc a par la suite été identifié dans la région -1372 à -1354 par rapport au site de départ de la transcription (Hum et al., 2004). L'angiotensine II a aussi été identifiée comme un régulateur du gène du NPR-A. Le traitement de cellules en culture avec AngII cause une inhibition dose et temps-dépendante de l'activité du promoteur du NPR-A. La région de réponse à Ang II a été ciblée dans la région -1346 à -916 (Garg and Pandey, 2003). Cette région contient un élément de réponse à l'AMPc, qui peut être reconnu par le facteur de transcription CREB. D'autres facteurs sont en étude. Par exemple, l'endothéline (Ye et al., 2003) et le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1 (Fujio et al., 1994; Agui et al., 1995) semblent faire diminuer les niveaux d'ARNm du NPR-A, alors que les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone ou le cortisol ont des effets différents selon le tissu utilisé (Yasunari et al., 1990; Lanier-Smith and Currie, 1991; Nuglozeh et al., 1997).



**Figure 2.6 :** Promoteur du gène codant pour le NPR-A.

Adapté de (Garg et al., 2002).

La région en 5' du gène contient 3 sites de liaison SP1 potentiels et une boîte CCAAT inversée, mais n'a aucune boîte TATA (**Figure 2.6**). Les sites de liaison de facteurs de transcription identifiés sont AP-2, MBF1, C-Myb, CAP, MyoD, et zeste. Il y a aussi 2 copies de l'élément de réponse au stress mécanique (SSRE), ainsi que des éléments régulateurs aussi présents dans le promoteur de la souris (LYF1, MZF-1, c-ETS, p300, et deltaEF1).

### 2.2.1.2 Structure du NPR-A

#### **A) Le domaine extracellulaire (ECD)**

Le NPR-A (ainsi que le NPR-B) a une topologie semblable au récepteur de facteur de croissance. Le domaine extracellulaire N-terminal de liaison du ligand (ECD) fait environ 450 résidus. Il y a ensuite un petit domaine transmembranaire hydrophobe d'une vingtaine de résidus, un domaine homologue aux kinases d'environ 250 acides aminés, un domaine de dimérisation en hélice d'environ 40 résidus, et finalement un domaine C-terminal guanylate cyclase d'environ 250 résidus. Bien que le NPR-A puisse lier les trois peptides natriurétiques, le CNP a une affinité nettement moins élevée que l'ANP ou le BNP. Le domaine extracellulaire du NPR-A contient trois ponts disulfure intrachaîne (Cys60-Cys86, Cys164-Cys-215, Cys423-Cys432) mais aucun pont interchaîne comme chez le NPR-C (Miyagi and Misono, 2000). Le domaine extracellulaire est aussi glycosylé sur plusieurs résidus asparagine. La glycosylation est de type complexe

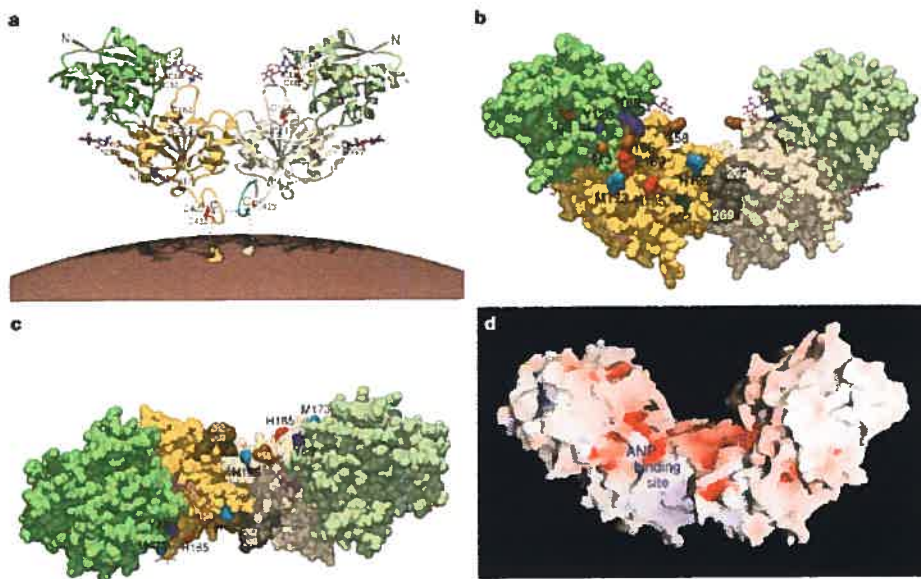
et à haut contenu en mannose. La taille du NPR-A en SDS-PAGE est d'ailleurs variable puisque la glycosylation semble varier selon le type cellulaire utilisé pour l'expression. Le NPR-A humain dans les cellules CHO est glycosylé sur les résidus Asn-2 et Asn-13 (Bennett et al., 1991), alors que le domaine extracellulaire du NPR-A de rat exprimé dans les cellules COS est glycosylé sur les Asn-13, Asn-180, Asn-306, Asn-347, et Asn-395 (Miyagi et al., 2000). Le rôle de cette glycosylation est encore controversé. Certaines études démontrent que le NPR-A doit être glycosylé pour lier l'ANP et être activé (Lowe and Fendly, 1992; Heim et al., 1996), alors que d'autres études indiquent que la glycosylation n'est pas nécessaire pour la liaison (Koller et al., 1993; Miyagi et al., 2000). Bien que la glycosylation ne soit pas directement impliquée dans la liaison de l'ANP, elle est probablement importante pour un repliement et une conformation appropriés de l'ECD (van den Akker, 2001).

Tel que mentionné auparavant, des études ont démontré que le NPR-A se retrouve à la surface cellulaire sous forme d'homodimère ou d'homo-oligomère préassocié de façon non-covalente (Meloche et al., 1987; Chinkers and Wilson, 1992; Lowe and Fendly, 1992). La présence de ligand n'est pas requise pour observer une dimérisation, mais la dimérisation est nécessaire à l'activation du NPR-A (Chinkers and Wilson, 1992). Une étude a ensuite suggéré pour la première fois la stoechiométrie de liaison de l'ANP sur le NPR-A. Cette stoechiométrie a été évaluée en comparant les valeurs de densité de récepteur obtenues par saturation du NPR-A avec ANP-<sup>125</sup>I avec les valeurs de quantité de récepteur obtenues par radioimmunoessai du NPR-A. Les résultats ont indiqué qu'une seule molécule d'ANP se lie sur un dimère de récepteur, tout comme pour le récepteur de l'hormone de croissance (Rondeau et al., 1995). Une étude a ensuite décrit deux régions d'interaction de l'ANP avec le NPR-A, en utilisant la technique de photomarquage par affinité (McNicoll et al., 1996). La portion N-terminale de l'ANP interagirait avec la section Met173-Phe188 du NPR-A, alors que la portion C-terminale de l'ANP serait en contact avec la région Asp191-Arg198. Ceci suggère que les portions amino et carboxy terminales de l'ANP touchent à des régions semblables du NPR-A, mais sur des sous-unités différentes. L'importance de la dimérisation, initiée par l'ECD, dans l'activation du NPR-A a été démontrée avec des dimères covalents. Des protéines mutées dans la région juxtamembranaire extracellulaire pour former un pont disulfure



intermoléculaire ont montré une activité constitutive (Labrecque et al., 1999; Labrecque et al., 2001). Ceci révéla pour la première fois l'importance de la région juxtamembranaire et de la distance intermonomère dans l'activation du NPR-A. Une autre étude a démontré que le domaine extracellulaire purifié sous forme soluble peut être dimérisé en ajoutant l'ANP, et proposé que la stoechiométrie de cette liaison est plutôt de deux molécules d'ANP par dimère de l'ECD (Misono et al., 1999).

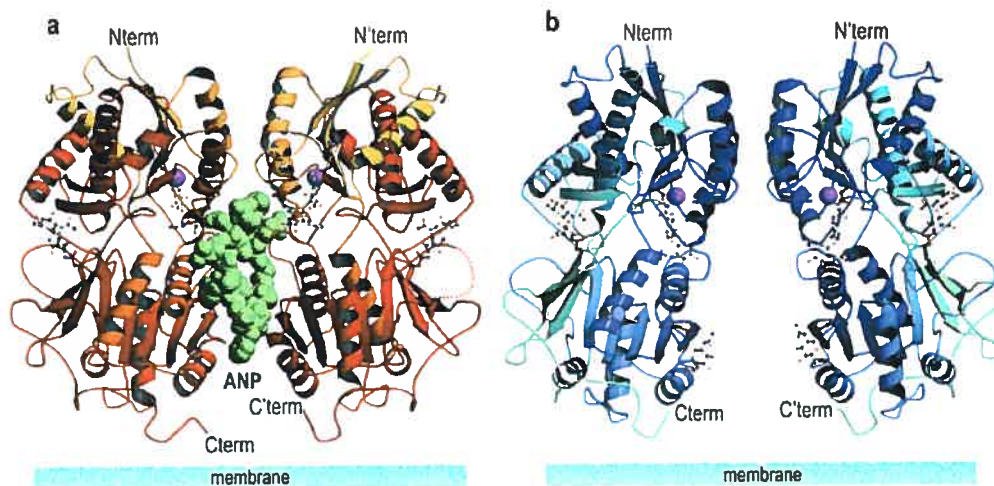
La structure cristalline du domaine extracellulaire du NPR-A de rat glycosylé a d'abord été décrite par van den Akker et collaborateurs (van den Akker et al., 2000). Cette structure ne contenait pas de ligand. Ils ont décrit que le monomère de l'ECD est constitué de 2 domaines interconnectés contenant chacun un feuillet  $\beta$  entouré d'hélices  $\alpha$ . Un ion chlore est présent, caché au centre de la structure dans les portions amino de chaque monomère. Sous cette forme le domaine extracellulaire adopte une forme en « V » et peut accommoder la liaison de 2 molécules d'ANP par dimère d'ECD (**Figure 2.7**). Cependant, il s'avéra que les études de cristallisation avaient fourni un autre cristal pour cette même protéine. Cette autre conformation du cristal, ayant plutôt une ressemblance avec le récepteur ionotropique du glutamate, avait une forme en « A » (van den Akker, 2001). Au même moment la structure du domaine ECD du récepteur homologue NPR-C en présence du ligand CNP est décrite et démontre qu'une seule molécule de CNP se lie par dimère de récepteur (He et al., 2001). Le dimère de NPR-C adopte une conformation en « A » avec une interface de dimérisation distal.



**Figure 2.7 :** Structure en « V » du dimère de l'ECD du NPR-A proposée par van den Akker et collaborateurs en 2000.

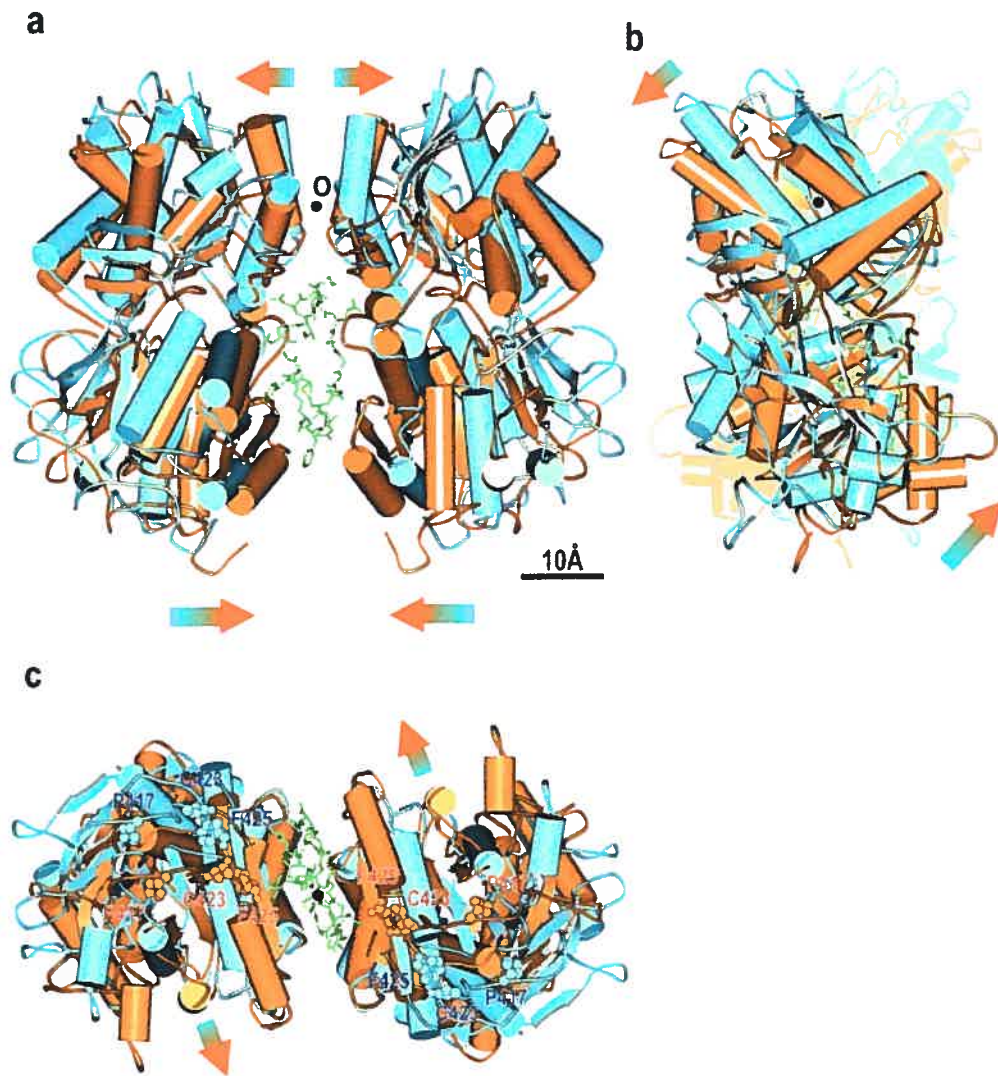
Une étude biochimique élégante portant sur l'interface de dimérisation indiquera que le domaine extracellulaire du NPR-A adopte bien aussi une structure dimérique en « A » et ne peut permettre la liaison que d'une seule molécule d'ANP (De Lean et al., 2003). En effet, la mutation en cystéine d'un résidu tryptophane présent en N-terminal du NPR-A a produit un NPR-A dimérique associé de façon covalente. De plus, les deux sous-unités se réassocient suite au clivage et à la réoxydation du pont disulfure. Bien que ce NPR-A W74C ne peut lier l'ANP, la réduction du pont disulfure et l'insertion de petits agents alkylants bifonctionnels permet à l'ANP de lier ce dimère et d'activer le NPR-A. Sous cette forme de dimère en « A », les deux Trp74 du dimère sont espacés d'environ 8 Angströms et non de 84 Angströms comme dans la forme en « V » initialement proposée. Le domaine ECD du NPR-A adopte donc une conformation où les domaines N-terminaux du dimère sont en interaction. Cette conformation en « A » peut difficilement accommoder la liaison de deux molécules d'ANP. Quelque temps après, deux publications viennent confirmer ces résultats. Tout d'abord, une étude sur la région N-terminale de l'ECD du NPR-A montre que la mutation des résidus W74 et D71 modifie l'activation du récepteur et que la mutation des résidus F96 et H99 inhibe la dimérisation de l'ECD. À

l'opposé, la mutation des résidus Y196 et L225 situés en C-terminal de l'ECD ne produit aucun effet (Qiu et al., 2004). Ensuite, la détermination de la structure cristalline de l'ECD viendra confirmer ces observations en montrant une seule molécule d'ANP entourée d'une structure en « A » (**Figure 2.8**) (Ogawa et al., 2004). La liaison du peptide induit un changement conformationnel qui rapproche les régions juxtamembranaires en C-terminal à 18 angströms. Ce mouvement serait responsable de transmettre le signal à travers la membrane. Un mécanisme de rotation a été détaillé pour expliquer la transmission du signal au domaine intracellulaire (**Figure 2.9**) (Misono et al., 2005). Ces études ont cependant été effectuées avec un peptide ANP tronqué n'ayant pas de région N-terminale. Le peptide ANP modifié contenait en effet tous les résidus de la boucle formée par le pont disulfure ainsi que 4 des 5 acides aminés en C-terminal. L'utilisation de ce peptide de 21 résidus (7 à 27) n'a donc pas pu fournir d'information sur l'interaction du peptide naturel avec le NPR-A, en particulier dans la région N-terminale du peptide. Des études récentes de photomarquage par affinité sur le NPR-A entier humain ont permis de définir les points de contact du peptide BNP de 28 acides aminés sur le NPR-A (Jossart et al., 2005). La région N-terminale du peptide interagit avec la région Asp177-Val183 du récepteur. L'arginine en position 3 du peptide interagit dans la zone de la Phe172 du NPR-A. La leucine 18 du peptide se lie dans la région de la valine 116. Finalement, la phénylalanine du peptide interagit tout près de l'histidine 195, et la tyrosine C-terminale du peptide se situe tout près de la méthionine 173 du NPR-A. Cette étude a aussi démontré que le N-terminal du peptide et la leucine 18 présente dans la boucle du peptide interagissent chacun avec une sous-unité différente du dimère de récepteur. Tous ces indices ont permis de créer un modèle par ordinateur de l'interaction de l'ECD avec le BNP (**Figure 2.10**).



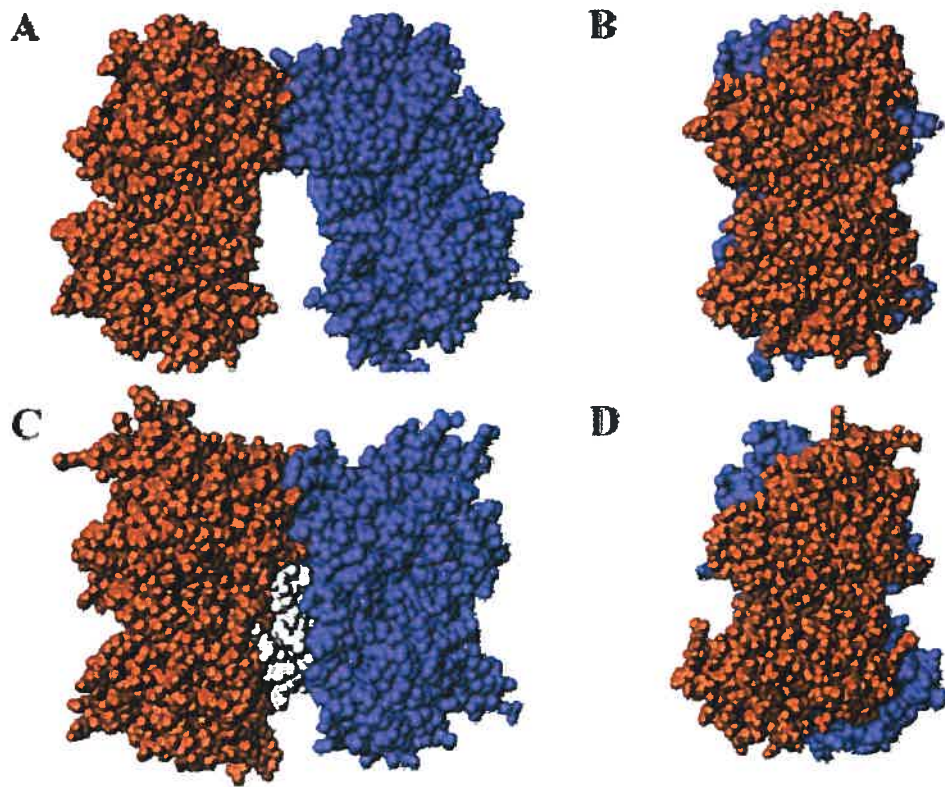
**Figure 2.8 :** Structure en « A » du dimère de l'ECD du NPR-A contenant (gauche) ou non (droite), un peptide ANP tronqué.

Tiré de (Ogawa et al., 2004).



**Figure 2.9 :** Mécanisme de rotation et déplacement du domaine ECD du NPR-A induit par la liaison de l'ANP.

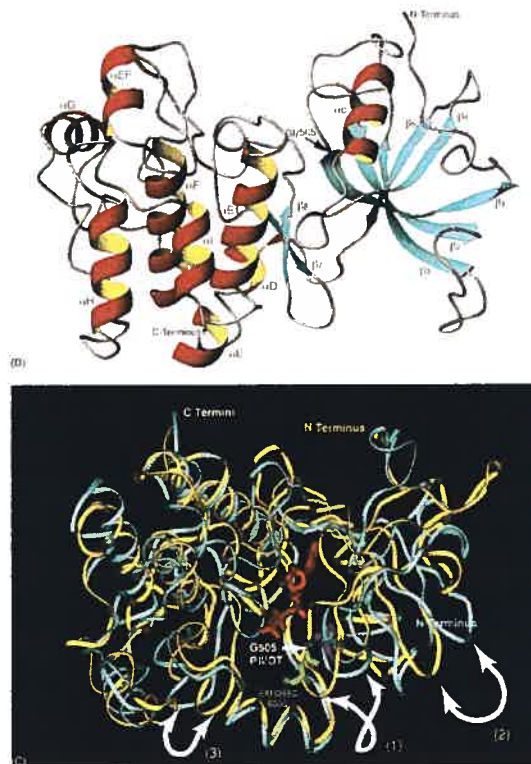
La structure de base est bleue alors que la structure avec ANP lié est orange. a = Vue de face, b = Vue de côté, c = Vue de dessous. Tiré de (Misono et al., 2005)



**Figure 2.10 :** Structure en « A » modélisée sans (A et B) et avec le BNP de 28 résidus (C et D) suggérée par Jossart et coll. en 2005.

## B) Le domaine homologue aux kinases (KHD)

Un modèle d'homologie a été créé pour le KHD, basé sur les structures connues du domaine tyrosine kinase du récepteur d'insuline et de la HCK (Duda et al., 2000). Le modèle prévoit une structure kinase typique en 2 lobes (**Figure 2.11**). Le lobe N-terminal, plus petit, est fait d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle en 4 brins et d'une hélice  $\alpha$ , alors que le lobe C-terminal, plus gros, est surtout fait d'hélices  $\alpha$  avec seulement 2 brins  $\beta$ . Ces 2 lobes forment un site de liaison d'ATP à l'interface. Bien que le modèle prévoit plusieurs changements de conformation suite à la liaison d'ATP, ces prédictions doivent être prouvées avec des structures expérimentales (Duda et al., 2005).

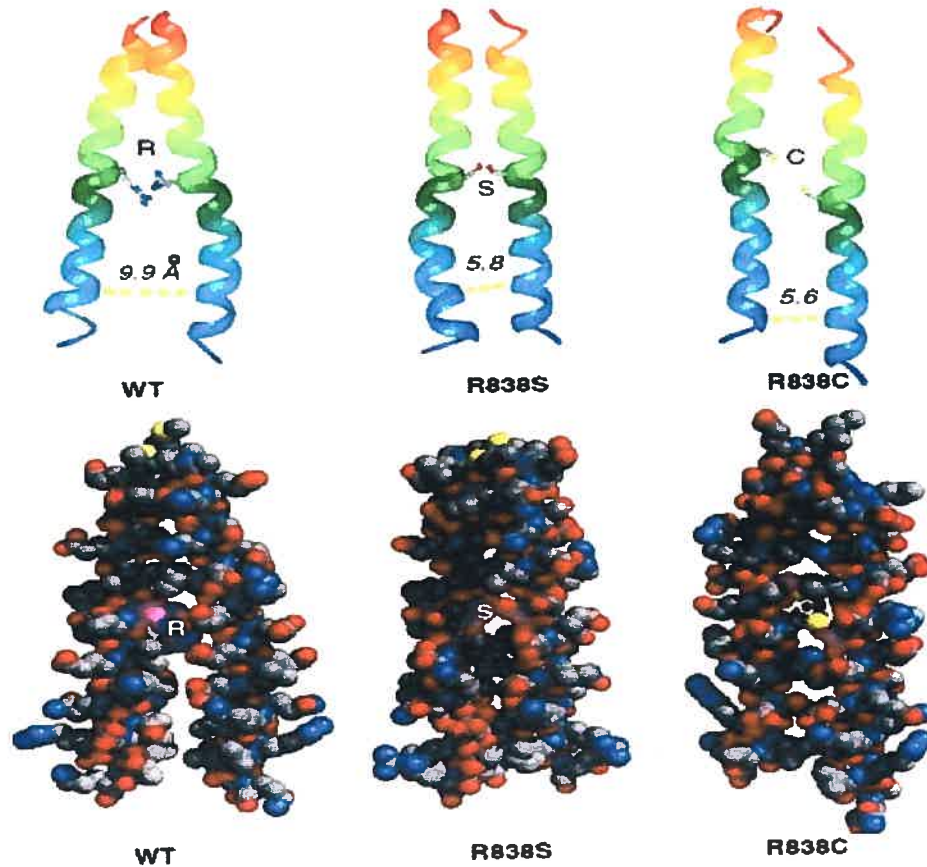


**Figure 2.11 :** Structure modélisée du domaine KHD.

Tiré de (Duda et al., 2005).

### C) Région de dimérisation

L'interaction des domaines en N-terminal de l'ECD serait responsable de l'homodimérisation du récepteur, mais seulement en partie. En effet, la région située entre le KHD et la guanylate cyclase dans la région intracellulaire formerait une structure en hélice enroulée chargée en partie de la dimérisation des sous-unités. Elle est du moins nécessaire à la dimérisation d'une forme soluble du domaine intracellulaire du NPR-A (Wilson and Chinkers, 1995). Pour la GC-E (retGC1), l'interaction entre les hélices de cette région est importante. En effet, il a été démontré que la mutation d'une arginine en position 838 dans cette région est impliquée dans une maladie dégénérative de la rétine. Cette arginine serait normalement impliquée dans un réseau de ponts salins. La mutation de cette arginine en sérine ou en cystéine produit un rapprochement des hélices d'environ 4.1 Angströms, ce qui active de façon constitutive et calcium-indépendante la région guanylate cyclase C-terminale (**Figure 2.12**) (Ramamurthy et al., 2001).



**Figure 2.12 :** Hélices impliquées dans la dimérisation de la GC-E (retGC1).

Tiré de (Ramamurthy et al., 2001).

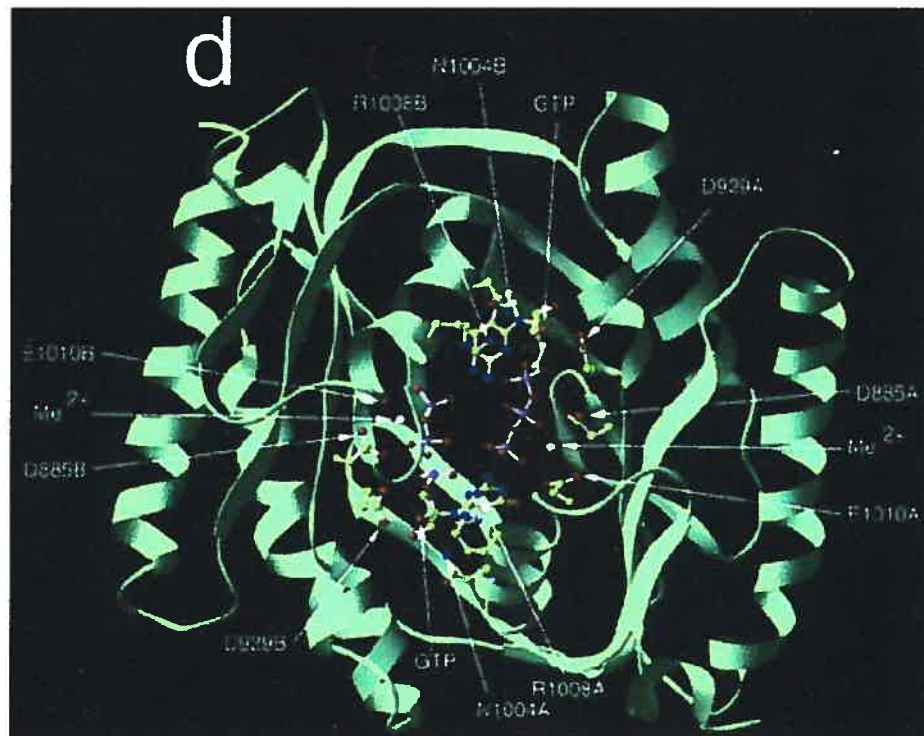
Ces résultats peuvent fournir une idée du mécanisme d'activation général de la guanylate cyclase dans cette région. En effet, il est possible d'imaginer que la liaison du ligand et le changement conformationnel du KHD induisent une rotation ou un déplacement vertical des hélices. Ce déplacement brise les interactions des ponts salins et permet un rapprochement des hélices. Le rapprochement des hélices amène un rapprochement des domaines guanylates cyclases qui sont maintenant en bonne conformation pour former une enzyme active (Ramamurthy et al., 2001).

#### **D) Le domaine guanylate cyclase (GC)**

La structure du domaine guanylate cyclase n'est pas connue. Cependant un modèle a été proposé. Ce modèle a été bâti à partir d'une structure cristalline du



domaine C2 catalytique de l'adénylyl cyclase formé en homodimère (Zhang et al., 1997). Cette structure est plutôt artificielle puisque l'adénylyl cyclase est normalement une seule protéine formée de deux domaines non identiques C1 et C2 qui s'assemblent pour former un centre catalytique asymétrique. Le modèle a donc été créé à partir de la séquence primaire de la région guanylate cyclase de la GC-E (retGC1). Ce modèle prévoit la liaison de deux molécules de GTP dans l'homodimère, et il présente les résidus impliqués dans la stabilisation du substrat (**Figure 2.13**) (Liu et al., 1997). Dans ce modèle, les molécules de GTP ne sont qu'à 3 Angströms l'une de l'autre, avec une interaction apparente entre le groupement adénine en position 2 de la guanine et le phosphate  $\gamma$  de l'autre molécule.



**Figure 2.13** : Structure modélisée du domaine guanylate cyclase de la guanylate cyclase membranaire.

Tiré de (Liu et al., 1997).

### 2.2.1.3 Régulation de l'activité

#### **A) Phosphorylation et désensibilisation homologue**

En condition basale, le NPR-A est phosphorylé sur six résidus dans une région de 17 acides aminés située en N-terminal du domaine d'homologie kinase. Quatre sérines (Ser-497, Ser-502, Ser-506, et Ser-510) et deux thréonines (Thr-500 et Thr-513) sont phosphorylées (**Figure 2.14**) (Potter and Hunter, 1999b).



**Figure 2.14** : Sites de phosphorylation dans le KHD du NPR-A.

La première sérine phosphorylée (497) se situe à 34 positions en aval du début du domaine intracellulaire (arginine 463).

Lorsque des cellules exprimant le NPR-A sont exposées à une dose saturante d'ANP, l'activité guanylate cyclase ainsi que le contenu en phosphate du NPR-A sont conjointement diminués (Potter and Garbers, 1992). La déphosphorylation forcée des résidus avec la protéine phosphatase 2A a le même effet. La conversion de n'importe quel résidu phosphorylé en alanine réduit le niveau de phosphorylation du récepteur et sa capacité à produire du GMPc suite à l'ajout d'ANP (Potter and Hunter, 1999b). Cependant la mutation de résidus environnants non phosphorylés réduit aussi la capacité d'activation du récepteur d'environ 25%, suggérant que la structure de cette région est aussi importante pour conserver une activation maximale (Potter and Hunter, 1999b). Malgré tout, la mutation de 5 des 6 sites de phosphorylation en alanine élimine totalement la capacité d'activation du NPR-A, alors que les mêmes 5 mutations en glutamate permettent de maintenir une activation du NPR-A, bien que 4 fois plus petite que celle du récepteur normal (Potter and Hunter, 1999a). Il a été proposé que la déphosphorylation du KHD produit une diminution de l'affinité du récepteur pour l'ANP, ce qui facilite la relâche de l'hormone au niveau de l'ECD (Potter and Hunter, 2001).

## **B) Désensibilisation hétérologue**

La désensibilisation hétérologue est définie comme tout processus, autre que l'exposition prolongée au ligand, qui réduit l'activité du récepteur. Les hormones vasoconstrictrices qui antagonisent les effets vasodilatateurs et/ou antiprolifération de l'ANP ou du BNP ont souvent un effet de désensibilisation hétérologue. Par exemple, l'arginine-vasopressine (Nambi et al., 1986), l'angiotensine II (Haneda et al., 1991), l'endothéline (Jaiswal, 1992) et l'histamine (Crook and Chang, 1997) inhibent tous le NPR-A. Tous ces facteurs lient des GPCR ou des récepteurs tyrosines kinases qui stimulent la phospholipase C (PLC). Cette enzyme produit du diacylglycérol et l'inositol triphosphate (IP3). Le diacylglycérol est un activateur de la PKC, et l'IP3 lie des récepteurs du réticulum sarcoplasmique qui font augmenter la concentration du calcium intracellulaire. Plusieurs études ont impliqué la PKC dans la désensibilisation hétérologue puisque le PMA, un activateur de la PKC, imite la capacité des hormones vasoconstrictrices à désensibiliser le NPR-A. Par exemple, les inhibiteurs de PKC bloquent la capacité de désensibilisation de l'angiotensine II sur le NPR-A (Haneda et al., 1991). La désensibilisation PMA-dépendante est corrélée à l'état de phosphorylation, mais cet effet est restreint à une déphosphorylation partielle du NPR-A (Potter and Garbers, 1994).

## **C) Régulation par l'ATP**

Le KHD du NPR-A n'a pas d'activité kinase, mais est très homologue aux protéines kinases connues, d'où son nom. En effet, les protéines kinases contiennent une séquence conservée His-Arg-Asp-Leu impliquée dans le transfert des phosphates. Le KHD contient plutôt une séquence His-Gly-Asn-Leu qui ne permet pas le transfert. Le KHD semble agir comme un élément régulateur négatif puisque sa délétion entraîne une activité constitutive du récepteur (Schulz et al., 1989; Chinkers and Garbers, 1989). Des expériences de délétion protéolytique ont confirmé ce rôle du KHD (Chen et al., 2001). De plus, la présence d'ATP semble requise pour avoir une activation maximale ANP-dépendante du NPR-A. Cet effet d'ATP est perdu lorsque le KHD n'est pas présent, ce qui suggère qu'une fonction importante du KHD est de lier l'ATP (Chinkers and Garbers, 1989; Chinkers et al., 1991). L'utilisation d'analogues non hydrolysable de l'ATP a confirmé que la

conversion de l'ATP en ADP ou comme substrat pour la phosphorylation n'est pas impliquée dans ce phénomène (Larose et al., 1991;Chinkers et al., 1991). Il a alors été suggéré que la liaison d'ANP à l'ECD induit un changement de conformation du KHD qui lève la répression de l'activité guanylate cyclase. Les analogues ATP $\gamma$ S, APP(NH)P, ADP $\gamma$ S, et ADP sont aussi capables d'augmenter l'activité du NPR-A, mais l'AMP n'a aucun effet (Marala et al., 1991;Larose et al., 1991;Chinkers et al., 1991). La façon par laquelle l'ATP active le NPR-A est encore un sujet de controverse. Une séquence riche en glycine du KHD, identifiée par mutagenèse, a été impliquée dans la liaison de l'ATP et l'activation du NPR-A (Duda et al., 2005). Cependant, la mutation de toutes les glycines en alanine produit un NPR-A toujours pleinement fonctionnel, sur lequel l'ATP est toujours activateur (Koller et al., 1993). Une étude a aussi démontré que le NPR-A purifié à homogénéité est toujours activé par l'ATP, ce qui indique que cette activation ne nécessite pas l'intervention d'une autre protéine (Wong et al., 1995).

#### **D) Internalisation**

Depuis plusieurs années, un groupe de recherche publie des résultats sur l'internalisation du NPR-A (Pandey, 2005). Ils ont démontré que le NPR-A, suite à la liaison de l'ANP, entre rapidement dans un processus d'endocytose. Le complexe ANP-NPR-A est internalisé dans les endosomes, et une majorité est fusionnée avec les lysosomes pour dégradation. Une minorité de récepteurs se dissocie du ligand dans les endosomes et revient à la surface. Le ligand est alors relâché dans le milieu de culture. Une séquence de 4 acides aminés du domaine cytoplasmique du NPR-A a été identifiée comme nécessaire à ce processus d'internalisation (Pandey et al., 2005). Ces résultats vont à l'encontre de résultats obtenus par plusieurs autres laboratoires, incluant le nôtre. En effet, plusieurs autres études n'ont pas observé d'internalisation du NPR-A suite à l'ajout d'ANP (Koh et al., 1992;Jewett et al., 1993;Vieira et al., 2001;Fan et al., 2005). Ces différences dans les résultats pourraient être expliquées par des différences de conditions expérimentales. L'internalisation du NPR-A est observée dans des conditions où les niveaux d'expression du récepteur sont environ 100 fois supérieurs à ce que l'on retrouve dans un tissu humain. Dans ces conditions, il est possible que le NPR-A soit endocyté de façon non spécifique et se retrouve dégradé dans les lysosomes. Au contraire, dans des conditions d'étude se

rapprochant des conditions d'expression physiologique du récepteur, aucune internalisation du NPR-A n'est observée.

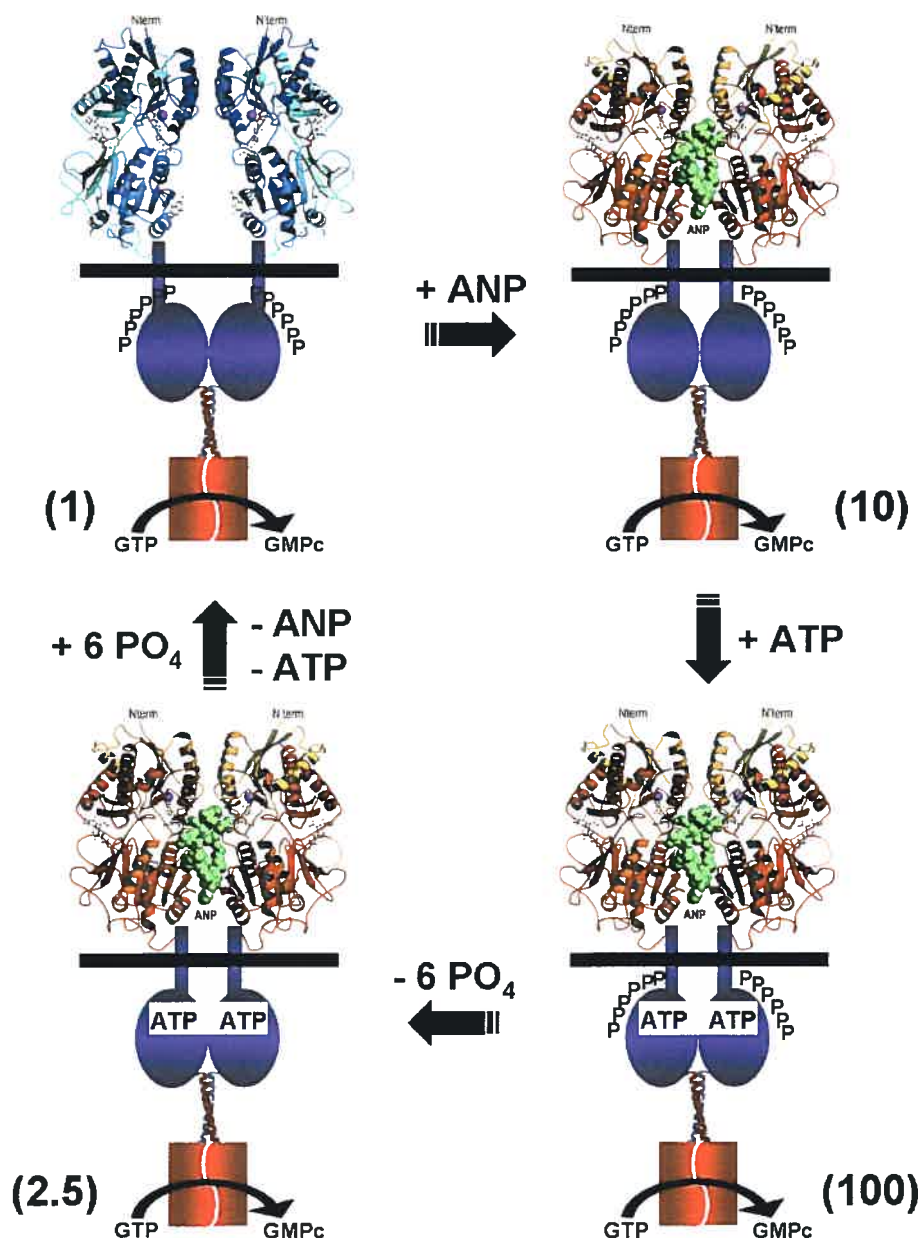
### **E) Protéines d'interaction**

Quelques protéines ont été identifiées comme interagissant avec le NPR-A. Par exemple, le NPR-A exprimé dans les cellules HEK293 interagit avec les protéines HSP90 et HSP70, des chaperones moléculaires requises pour le bon repliement et/ou acheminement des protéines (Kumar et al., 2001). HSP90 se lierait sur le KHD puisque la délétion du domaine intracellulaire ou du KHD inhibe l'interaction. De plus, l'inhibition de HSP90 fait diminuer la production de GMPc ANP-dépendante, possiblement parce que le NPR-A est moins bien stabilisé par HSP90 (Kumar et al., 2001).

Il a aussi été démontré que le KHD du NPR-A interagit avec la protéine phosphatase 5 (Chinkers, 1994) et avec la PKG-1 $\alpha$  (protéine kinase dépendante du GMPc) (Airhart et al., 2003). Ces interactions ont été identifiées en utilisant la technique d'hybridation chez la levure. Aucune démonstration d'interaction et de régulation du NPR-A par PP5 dans des cellules de mammifère n'a cependant été accomplie depuis. Il a toutefois été démontré que la PKG se positionne à la membrane suite à l'activation du NPR-A par l'ANP dans les cellules HEK293 et dans les myocytes cardiaques (Airhart et al., 2003). Aussi, la présence de cette PKG augmente le niveau d'activation du NPR-A. Ces effets n'ont cependant rien à voir avec le niveau de phosphorylation du NPR-A et seraient plutôt dus à un changement conformationnel du NPR-A lorsqu'il interagit avec la PKG (Bryan et al., 2006). Le positionnement de la PKG à la membrane créerait un microdomaine où l'activation de la PKG par le GMPc produit serait très efficace (Airhart et al., 2003).

#### **2.2.1.4 Mécanisme d'activation global**

À partir des études faites jusqu'à maintenant sur le NPR-A, il est possible de décrire un mécanisme général d'activation du NPR-A (**Figure 2.15**). Ce mécanisme implique toutes les étapes d'activation du récepteur, la désensibilisation, ainsi que la resensibilisation du NPR-A.



**Figure 2.15 :** Modèle de l'activation et désensibilisation du NPR-A. À l'état de base, le NPR-A est phosphorylé sur son KHD. La liaison de l'ANP au domaine extracellulaire produit un changement de conformation de tout le domaine intracellulaire qui active la guanylate cyclase d'environ 10 fois. Ce changement conformationnel permettrait la liaison de l'ATP sur le KHD. Ceci provoquerait un deuxième changement conformationnel activant la guanylate cyclase de 100 fois par rapport au niveau de base. Le domaine KHD est ensuite déphosphorylé, ce qui mène à un état désensibilisé très peu actif et qui ne répond plus à l'ajout d'ANP. La liaison d'ATP ferait augmenter la vitesse de dissociation

de l'ANP. Lorsque l'ANP est retiré, l'ATP se dissocie, et le KHD est phosphorylé pour resensibiliser le NPR-A.

## 2.2.2 Le récepteur B des peptides natriurétiques ou GC-B

### 2.2.2.1 Expression tissulaire et génique

L'ARNm codant pour le NPR-B est retrouvé dans les poumons, la glande pituitaire, le cervelet, la peau, le cerveau, les surrénales, le rein, l'utérus, et les ovaires (Schulz et al., 1989; Wilcox et al., 1991). Le NPR-B est aussi le récepteur des peptides natriurétiques le plus présent dans le cerveau (Herman et al., 1996). Il est aussi exprimé à des niveaux importants dans les fibroblastes (Chrisman and Garbers, 1999). Récemment, plusieurs formes alternatives de NPR-B ont été identifiées (Tamura and Garbers, 2003; Hirsch et al., 2003). Ces isoformes produites par épissage alternatif n'ont pas d'activité catalytique et peuvent agir comme dominants négatifs. Le rôle exact de ces protéines n'est pas encore connu. Une de ces formes a été décrite comme inhibitrice des canaux potassiques.

Le gène humain codant pour le NPR-B est semblable au gène du NPR-A et fait environ 16.5 kb, contient 22 exons, et est localisé sur le chromosome 9p21-12 (Figure 2.16) (Rehemudula et al., 1999).

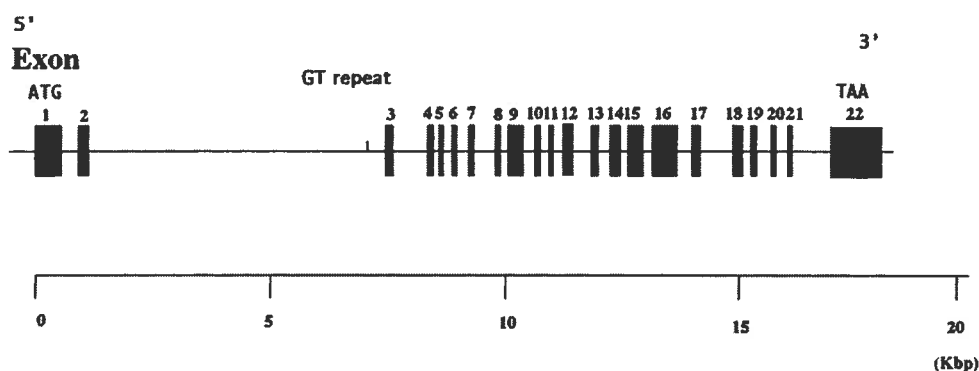


Figure 2.16 : Structure du gène codant pour le NPR-B humain.

Tout comme le NPR-A, le promoteur du NPR-B ne contient pas de boîte TATA mais contient plusieurs sites de liaison SP1. La délétion ou la modification

du gène codant pour le NPR-B a été investiguée dans 2 études. Lorsque la partie du gène correspondant à la région C-terminale du domaine extracellulaire du NPR-B a été supprimée, les souris avaient une forme sévère de nanisme et étaient stériles (Tamura et al., 2004). Lorsque le domaine guanylate cyclase a été inactivé par contre, les souris étaient naines mais n'étaient pas stériles (Tsuji and Kunieda, 2005). De plus, le taux de mortalité des souris avec la délétion extracellulaire était nettement plus élevé que celles ayant le domaine guanylate cyclase inactivé. Il y a donc probablement un rôle important joué par une forme d'épissage alternatif qui lie le CNP mais qui n'a pas d'activité guanylate cyclase. L'inactivation de cette forme particulière de NPR-B est probablement responsable du phénotype de stérilité. De plus, des mutations inactivatrices ont été identifiées pour ce gène chez des patients qui souffrent d'une forme rare de nanisme appelée dysplasie acromesomélisme de type Maroteaux (Bartels et al., 2004). Les mutations sont variables et se distribuent dans les différents domaines du NPR-B. Ces patients ne sont pas stériles.

#### **2.2.2.2 Structure**

La topologie du NPR-B est essentiellement la même que celle du NPR-A (**Figure 2.4**). Il lie de façon préférentielle le CNP avec une affinité 50 fois plus élevée que pour l'ANP (Koller et al., 1991; Suga et al., 1992a). La présence des ponts disulfure n'a pas été confirmée mais des analyses par mutagenèse suggèrent la présence de ces ponts entre les résidus Cys53-Cys79, Cys205-Cys314, et Cys417-426 (Langenickel et al., 2004). De plus, les sites de glycosylation n'ont pas été identifiés directement par digestion protéolytique, mais des études ont démontré par mutagenèse que 5 des 7 asparagines extracellulaires sont glycosylées (Fenrick et al., 1996; Fenrick et al., 1997). La mutation de Asn24 en acide aspartique produit une diminution de 90% de la liaison du peptide CNP. Ceci est probablement dû à un mauvais repliement ou à un problème de maturation (Fenrick et al., 1997). Aucune structure cristalline n'a été rapportée pour aucun des domaines du NPR-B. Cependant on peut s'attendre à une structure similaire au NPR-A. La séquence en acides aminés du NPR-B est 43% identique à la séquence du NPR-A pour ce qui est du domaine extracellulaire, 72% identique pour le domaine homologue aux kinases, et 91% identiques pour le domaine guanylate cyclase (Schulz et al., 1989).



### 2.2.2.3 Régulation de l'activité

#### **A) Phosphorylation, désensibilisation homologue, effet d'ATP et internalisation**

Le NPR-B est aussi phosphorylé, mais sur 5 résidus plutôt que 6 pour le NPR-A. Trois sérines (518, 523, et 526), et deux thréonines (513 et 516) sont phosphorylées sur le KHD à l'état de base (Figure 2.17).



**Figure 2.17** : Sites de phosphorylation dans le KHD du NPR-B.

Tout comme pour le NPR-A, la mutation de n'importe lequel de ces résidus en alanine fait diminuer l'activité hormone-dépendante du récepteur. Il y a aussi une corrélation entre l'état de phosphorylation et l'activité hormone-dépendante du NPR-B. Le traitement avec CNP fait diminuer le niveau de phosphorylation du NPR-B avec le temps (Potter and Hunter, 1998). Tout comme pour le NPR-A, la délétion du KHD du NPR-B produit une enzyme constitutivement active et insensible au ligand (Koller et al., 1992). L'ATP a aussi un effet activateur sur le NPR-B, et les domaines KHD du NPR-B et du NPR-A sont interchangeable, avec aucun effet sur la régulation, indiquant qu'ils ont le même mode d'action (Koller et al., 1992). Une seule étude s'est attardée à regarder les propriétés d'internalisation du NPR-B et aucun phénomène d'internalisation ou de recyclage n'a été observé (Fan et al., 2005).

#### **B) Désensibilisation hétérologue**

L'arginine-vasopressine (Abbey and Potter, 2002), l'endothéline (Yeung et al., 1996b; Tsang et al., 1997; Tokudome et al., 2004), l'hormone de relâche de la gonadotropine (McArdle et al., 1993), l'acide lysophosphatidique (Abbey and Potter, 2003), le sphingosine-1-phosphate (Chrisman et al., 2003; Abbey-Hosch et al., 2004), ainsi que le PDGF et le b-FGF (Chrisman and Garbers, 1999) sont

toutes des molécules qui inhibent l'activité du NPR-B. Comme pour le NPR-A, des inhibiteurs de PKC bloquent la désensibilisation endothéline-I-dépendante du NPR-B, indiquant que la PKC est impliquée dans ce processus. En effet, l'activation de la PKC par ce processus induit la déphosphorylation de la sérine 523, ce qui inactive partiellement le NPR-B (Potter and Hunter, 2000). La désensibilisation médiée par l'arginine-vasopressine passe par un mécanisme différent. La désensibilisation est bloquée par un chélateur de calcium et imitée par un ionophore à calcium (Abbey and Potter, 2002). L'arginine-vasopressine induit aussi un influx de calcium dans les cellules. Cet influx est bloqué par l'ajout de CNP. Le mécanisme exact de l'inhibition du NPR-B par le calcium n'est pas connu.

### ***2.2.3 Le récepteur de clairance des peptides natriurétiques (NPR-C)***

#### **2.2.3.1 Expression tissulaire et génique**

L'ARNm du NPR-C est retrouvé dans l'oreillette, dans le rein, les surrénales, le cœur, le cortex cérébral, le cervelet, le placenta, les poumons, et les veines (Porter et al., 1990; Wilcox et al., 1991; Nagase et al., 1997). Il est aussi présent dans les cellules de muscle lisse aortique et dans les cellules endothéliales aortiques. Les tissus utilisés pour la purification à homogénéité du NPR-C étaient les poumons de bœuf (Shimonaka et al., 1987) ainsi que les cellules musculaires lisses vasculaires (Schenk et al., 1987). La densité de ces récepteurs dans la plupart des tissus est supérieure à celle du NPR-A et du NPR-B. Par exemple, dans les cellules endothéliales, le NPR-C constitue 94% de tous les récepteurs à ANP présents (Leitman et al., 1986).

Le gène codant pour le NPR-C est situé sur le chromosome 5p14-p13, fait environ 65 kb, et est constitué de 8 exons et 7 introns (Rahmutula et al., 2002). Des études chez la souris comprenant l'inactivation du gène du NPR-C indiquent que la fonction principale du NPR-C est de retirer les peptides natriurétiques de la circulation ou du milieu extracellulaire par l'internalisation et la dégradation (Matsukawa et al., 1999; Jaubert et al., 1999). En effet, les animaux ont une demi-

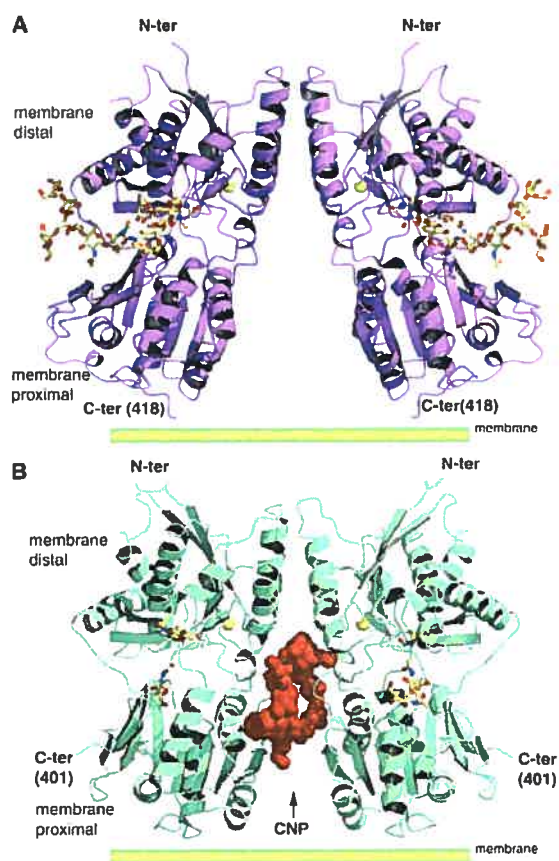
vie pour l'ANP presque 2 fois plus élevée, une réduction de la capacité à concentrer l'urine, et une surcroissance osseuse (Matsukawa et al., 1999). Cependant, les niveaux circulants des peptides ANP et BNP sont normaux, ce qui indique que la sécrétion des peptides est régulée. De plus, on a identifié, chez des souris montrant des surcroissances squelettiques, des anomalies dans le gène codant pour le NPR-C (Jaubert et al., 1999). Trois souches de souris ont été identifiées. Toutes les mutations étaient ciblées dans le domaine extracellulaire de liaison du ligand. La première souche avait une délétion de 12 acides aminés, la seconde avait un codon-stop en position 283, et la dernière avait une mutation Asp-His. Ces animaux montraient aussi une absence de dépôts lipidiques. Donc la délétion du NPR-C a simplement accentué la signalisation via le NPR-A et le NPR-B, puisque les phénotypes vont de pair avec une hyperactivité de ces 2 voies de signalisation. Ainsi ces études n'ont pas réussi à mettre en lumière une fonction de signalisation précise pour le NPR-C.

Le niveau d'expression du NPR-C peut être modulé par différents traitements. Plusieurs facteurs ou hormones font diminuer l'expression du NPR-C. L'arginine-vasopressine, l'endothéline-1, le FGF ou le PDGF, l'EGF, la noradrénaline, la forskoline, le fluorure de sodium, le 8-bromo-AMPC, et les suppléments en sel dans la diète sont tous des facteurs qui font diminuer l'expression du NPR-C (Anand-Srivastava, 2005). Seul le TGF- $\beta$  a été identifié comme un facteur d'augmentation de l'expression du NPR-C au niveau transcriptionnel.

### **2.2.3.2 Structure**

La séquence en acides aminés du domaine extracellulaire du NPR-C est environ 30% identique à celle du NPR-A ou du NPR-B (van den Akker, 2001). De plus, son domaine intracellulaire ne contient que 37 acides aminés et aucun domaine guanylate cyclase (**Figure 2.4**) (Fuller et al., 1988). Le domaine extracellulaire est glycosylé sur les asparagines 41, 248, et 349, et contient 2 ponts disulfure intramoléculaires entre Cys63 et Cys91, et entre Cys168 et Cys216 (Stults et al., 1994). Ces ponts sont équivalents à ceux retrouvés chez le NPR-A et le NPR-B. Le NPR-C contient par contre de façon naturelle un ou des ponts intermoléculaires. En effet, on retrouve un tel pont pour le NPR-C de bœuf au

niveau de la cystéine 469 (Itakura et al., 1994). Dans le NPR-C humain, il y a 2 ponts intermoléculaires pour les résidus Cys428 et Cys431 (Stults et al., 1994). Donc contrairement au NPR-A et NPR-B, le NPR-C est un homodimère lié de façon covalente par au moins un pont disulfure. Le NPR-C a été le premier récepteur des peptides natriurétiques à avoir été cristallisé en présence de ligand. La structure a indiqué une stoechiométrie ligand : récepteur de 1 pour 2 avec une interface de dimérisation distal formant une structure en « A » (**Figure 2.18**) (He et al., 2001). La liaison de l'hormone induit une fermeture de 20 angströms des domaines proximaux du dimère (**Figure 2.19**).

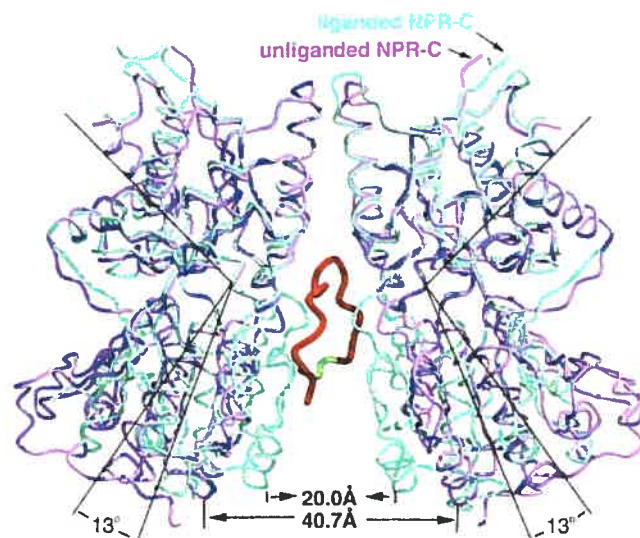


**Figure 2.18** : Structure du domaine ECD du NPR-C à l'état de base (A) et avec le ligand CNP (B).

Tiré de (He et al., 2001).

L'affinité du NPR-C pour les peptides ANP et CNP est presque identique, alors que le BNP lui a une affinité 10 fois moindre (Suga et al., 1992a). Ceci explique probablement en partie pourquoi le BNP a une demi-vie plus longue que l'ANP ou le CNP. Le NPR-C lie aussi un peptide synthétique C-ANP (ANP 4-

23), qui est en fait une molécule d'ANP sans queue C-terminale et ayant une délétion dans la boucle (Maack et al., 1987). Ainsi, des fonctions stimulées par le C-ANP sont généralement attribuées à l'activation du NPR-C. Cependant, le C-ANP active aussi les fonctions ANP ou BNP-dépendantes puisqu'il empêche la dégradation de ces peptides par le NPR-C (Maack et al., 1987).



**Figure 2.19 :** Structure de l'ECD du NPR-C montrant le rapprochement du domaine proximal d'environ 20 Angströms induit par le ligand.

Tiré de (He et al., 2001).

### **2.2.3.3 Internalisation et signalisation**

Comme le récepteur de transferrine ou le récepteur des LDL, l'internalisation du NPR-C est constitutive et indépendante de la liaison du ligand (Nussenzveig et al., 1990). L'internalisation serait médiée par des puits tapissés de clathrine puisqu'un traitement au sucre hypertonique inhibe l'internalisation (Cohen et al., 1996). Ce traitement est connu comme un inhibiteur de l'assemblage de la clathrine. L'hydrolyse de l'ANP est aussi inhibée par un traitement avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou avec chloroquine, ce qui indique que l'ANP est dégradé dans le lysosome et le récepteur est recyclé à la surface cellulaire (Nussenzveig et al., 1990; Fan et al., 2005).

Certains groupes de recherche ont observé une fonction de signalisation pour le NPR-C. L'agoniste C-ANP, sélectif pour le NPR-C, fait diminuer l'activité adénylyl cyclase membranaire ainsi que les concentrations d'AMPc produites par des cellules (Anand-Srivastava et al., 1990). Cet effet est inhibé par la toxine pertussique et passe donc par les protéines Gi ou Go (Anand-Srivastava et al., 1987). Cette inhibition peut être bloquée par un anticorps spécifique à la portion intracellulaire du NPR-C (Anand-Srivastava et al., 1996), et des fragments peptidiques du domaine intracellulaire miment l'inhibition (Pagano and Anand-Srivastava, 2001). Également, il a été observé que le CNP inhibe l'efflux de catécholamines des cellules PC12 en culture. Cet effet est directement relié à la quantité de NPR-C présente et est aussi inhibé par un anticorps contre la portion intracellulaire du NPR-C (Trachte, 2000;Trachte, 2003). Le NPR-C stimulerait aussi la PLC en passant par la protéine Gi (Resink et al., 1988;Berl et al., 1991;Anand-Srivastava, 2005). Le NPR-C exprimé dans les cellules musculaires lisses aortiques de rat est phosphorylé sur des résidus sérine au niveau intracellulaire (Pedro et al., 1998). Le rôle de cette phosphorylation n'est pas encore résolu. Tel que mentionné plus haut, le rôle du NPR-C dans la signalisation est parfois difficile à identifier lorsque le type cellulaire ou le tissu utilisé exprime aussi le NPR-A ou le NPR-B. En effet, dans ce cas l'ANP va stimuler autant le NPR-A que le NPR-C. Il faut donc aussi vérifier si l'effet observé est dû à une augmentation du GMPc dans ce modèle. Par exemple, il a été démontré que l'ANP inhibe la transformation de PiP<sub>2</sub> induite par la norépinéphrine dans les artères rénales de lapin (Fujii et al., 1986). Ces artères contiennent beaucoup de NPR-C mais aussi le NPR-A. Il a été démontré que l'inhibition de la transformation de PiP<sub>2</sub> peut être mimée par le 8-bromo-GMPc ce qui indique que cet effet passe par le NPR-A. Ce mécanisme est aussi observé dans les plaquettes (Nakashima et al., 1986).

L'utilisation du peptide C-ANP, qui lie spécifiquement le NPR-C, permet d'étudier les voies de signalisation modulées par le NPR-C. Il a récemment été démontré que l'activation du NPR-C par le C-ANP active la NOS constitutive via Gi $\alpha$ -1 et Gi $\alpha$ -2 dans le muscle lisse gastrointestinal (Murthy et al., 2000). Prins et collaborateurs ont aussi démontré que le C-ANP ou l'ANP inhibent l'activité MAPK stimulée par l'endothéline-3, le PDGF, et le PMA dans les astrocytes (Prins et al., 1996). L'inhibition de la voie MAPK passerait par l'inhibition de

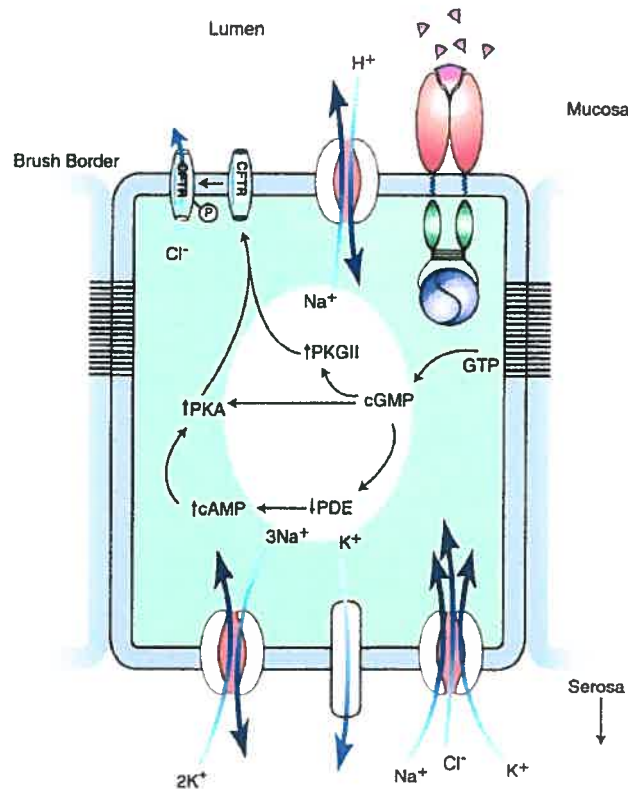
MEK ou de ERK. Le C-ANP n'a pas fait diminuer la concentration d'AMPc dans ces cellules, ce qui suggère la présence d'un autre mécanisme de signalisation entre le NPR-C et la voie MAPK.

Le traitement avec C-ANP inhibe aussi la sécrétion de progestérone des cellules tumorales de Leydig. Il a aussi des effets antiprolifération sur les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse vasculaire, et des lignées de neuroblastomes (Anand-Srivastava, 2005). Le C-ANP inhibe aussi l'adenylyl cyclase et la neurotransmission dans les cellules PC12 traitées avec le NGF. Des agents sélectifs pour le NPR-C inhibent aussi la traduction de l'ARNm de l'endothéline et la sécrétion de l'endothéline *in vivo*. L'activation du NPR-C et l'inhibition de la production d'AMPc seraient aussi impliquées dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale pour des cultures de cellules endothéliales coronariennes (Hempel et al., 1998). Le C-ANP inhibe de plus la production de VEGF et d'endothéline dans des cultures de cellules de muscle lisse vasculaire, ce qui suggère un rôle du NPR-C dans le remodelage vasculaire et l'angiogénèse (Pedram et al., 1997). Le NPR-C protégerait aussi l'hépatocyte contre les effets néfastes de l'hypoxie via une stimulation de la PKC à travers la PLC et Gi (Carini et al., 2003).

#### ***2.2.4 La guanylate cyclase C***

La GC-C a d'abord été identifiée et clonée à partir d'ARNm provenant de cellules de la muqueuse intestinale (Schulz et al., 1990). Bien que la GC-C possède des domaines structuraux semblables, elle n'est pas considérée comme un récepteur des peptides natriurétiques. Les ligands endogènes de la GC-C sont la guanyline et l'uroguanyline, cependant le premier ligand identifié pour la GC-C a été la ST (entérotoxine bactérienne). La liaison de ST sur la GC-C active le domaine guanylate cyclase et augmente la concentration en GMPc dans les cellules intestinales (Schulz et al., 1990). La délétion du gène codant pour la GC-C chez la souris leur donne une résistance aux toxines bactériennes qui produisent une diarrhée sécrétoire. En effet, le GMPc produit par la GC-C active une PKG II qui stimule l'activité du canal CFTR (le régulateur de la conductance membranaire de la fibrose kystique) et donc la sécrétion de chlore et de bicarbonate dans le lumen. L'absorption de sodium est aussi inhibée. Par diffusion

passive, l'eau suit l'augmentation des concentrations en ions dans le lumen, provoquant une diarrhée (**Figure 2.20**). Les toxines bactériennes lient et activent la GC-C de façon prolongée et 10 fois plus que le peptide endogène guanyline.



**Figure 2.20** : Régulation de la sécrétion intestinale par les entérotoxines bactériennes et la GC-C.

Les bactéries comme *E.coli* colonisent l'intestin suite à la consommation de nourriture ou d'eau contaminée. Ces bactéries produisent l'entérotoxine dans le lumen et celle-ci va se lier sur la GC-C, exprimée à la surface des cellules de la muqueuse intestinale du duodénum jusqu'au rectum. Il y a production de GMPc par la GC-C, qui va activer la PKG II positionnée à la membrane non loin de la GC-C. Le GMPc peut aussi activer la PKA de façon directe ou en inhibant une phosphodiesterase spécifique à l'AMPc ce qui fait augmenter les taux d'AMPc. La phosphorylation du canal CFTR par la PKG ou la PKA produit son ouverture prolongée, ce qui permet au chlore de sortir de façon passive dans le lumen. Tiré de (Lucas et al., 2000).



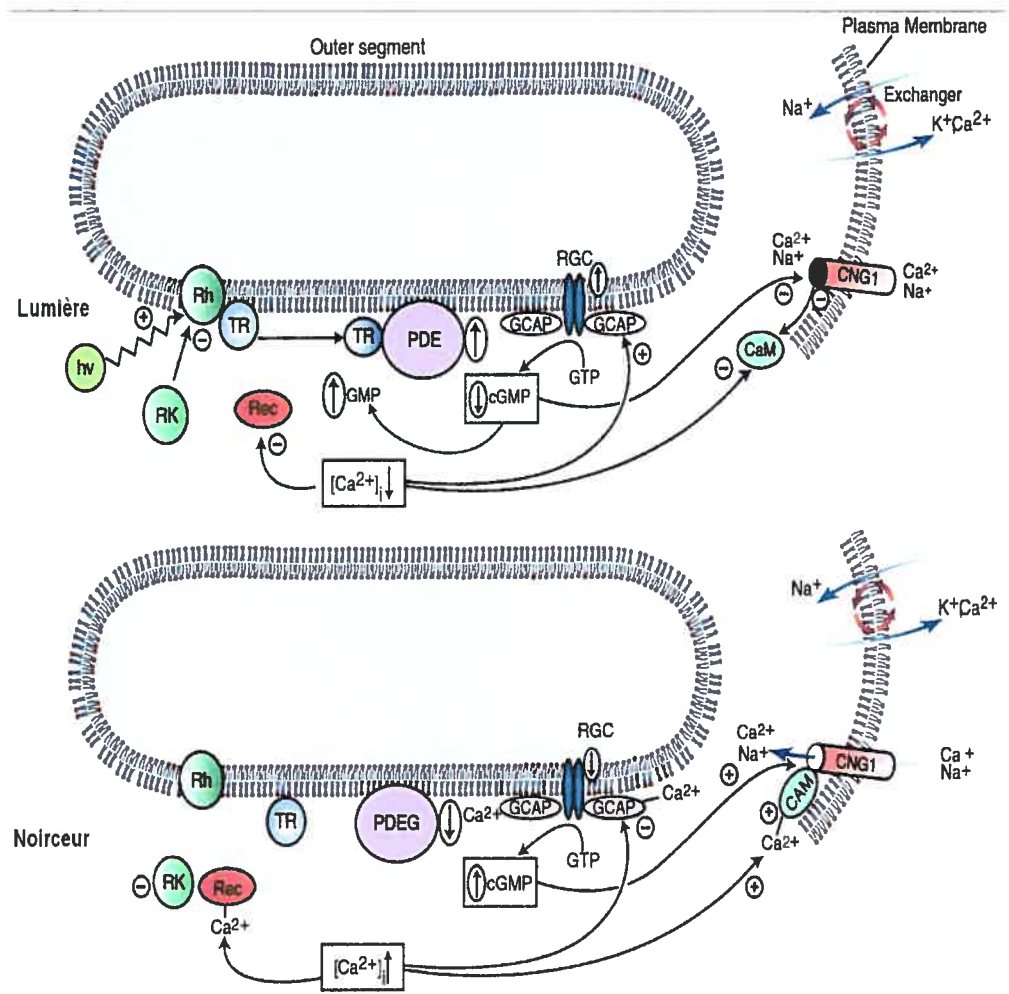
### ***2.2.5 La guanylate cyclase D***

La GC-D est un récepteur orphelin exprimé de façon majeure dans l'épithélium olfactif et dans un groupe de neurones olfactifs. Ces neurones sont projetés dans le bulbe olfactif dans ce qui est appelé « glomérule en collier » et jouent possiblement un rôle dans la détection des phéromones (Juilfs et al., 1997). La GC-D lierait la neurocalcine, une protéine qui active la GC-D suite à sa liaison avec le calcium (Duda et al., 2001).

### ***2.2.6 Les guanylate cyclases E et F***

Le GMPc joue un rôle majeur dans la phototransduction au niveau du segment extérieur de la rétine. Il est chargé de réguler la phase de récupération de l'excitation visuelle et l'adaptation à la lumière environnante. Les photorécepteurs des cônes et des bâtonnets contiennent des protéines uniques qui agissent de façon coopérative pour contrôler les niveaux de GMPc et de calcium. Ces 2 molécules régulent le mécanisme de la phototransduction et déterminent la réponse physiologique à la lumière. Les cellules de la rétine contiennent 2 guanylates cyclases, GC-E et GC-F, aussi nommées retGC-1 et retGC-2. Ces isoformes sont exprimées uniquement dans les cellules de photoréception, où elles forment des homodimères qui sont activés suite à l'interaction avec des protéines de liaison du calcium, nommées GCAPs, au niveau intracellulaire. On les considère comme des récepteurs orphelins puisqu'aucune molécule de liaison au domaine extracellulaire n'a été identifiée. La GC-E est présente autant dans les bâtonnets que dans les cônes, alors que la GC-F n'est présente que dans les bâtonnets. La délétion du gène de la GC-E chez la souris produit une dégénérescence des cônes. Des mutations de ce gène sont reliées à 2 maladies congénitales de la rétine. Ce phénotype est semblable à celui des souris sans CNG (canal sensible au GMPc). Ces souris montrent une perte de cellules en cône et répondent mal à la lumière. Ce canal CNG est la principale cible du GMPc dans les bâtonnets et les cônes. Le canal CNG3, présent dans les cônes, répond différemment du canal CNG1 présent dans les bâtonnets. Ceci explique la différence de réponse à la lumière des 2 types cellulaires. Les composantes moléculaires de la machinerie de phototransduction

créent une cascade complexe dans laquelle le GMPc et le calcium interagissent pour convertir l'énergie externe (les photons de la lumière) en messages internes (impulsions électriques du système nerveux) (Figure 2.21).



**Figure 2.21** : Rôle des guanylates cyclases E et F dans la phototransduction au niveau de la rétine.

La lumière ( $h\nu$ ) active d'abord la rhodopsine (Rh) et la transducine (TR) (image du haut). La transducine active la phosphodiésterase 6 (PDE) qui dégrade le GMPc en GMP. La baisse des quantités de GMPc fait fermer le canal CNG1, ce qui produit une hyperpolarisation de la membrane. Cette hyperpolarisation est le signal qui traduit le signal photonique en signal nerveux. La fermeture du canal CNG diminue l'entrée de calcium alors que sa sortie persiste par le canal échangeur de cations. Cette baisse de calcium fait baisser l'interaction du calcium avec la protéine GCAP, ce qui permet à GCAP d'aller activer la guanylate cyclase E ou F (RGC) qui va regonfler les quantités de GMPc. Aussi, le calcium interagit moins avec la calmoduline (CaM), donc celle-ci se dissocie du canal CNG. Cette

dissociation fait diminuer la capacité du GMPc d'ouvrir le canal CNG. De plus, le calcium interagit moins avec la recoverine (Rec), une protéine chargée d'inhiber la rhodopsine kinase (RK) par interaction. La RK phosphoryle et inactive la rhodopsine (Rh). À la noirceur (image du bas), la transducine (TR) et la phosphodiesterase (PDE) sont inactives et le GMPc s'accumule. Le canal CNG reste donc ouvert et les photorécepteurs sont dépolarisés. Le calcium entre par le canal et se lie à la GCAP, à la calmoduline, et à la recoverine (Rec). La guanylate cyclase est alors inhibée, la calmoduline (CaM) se lie au canal CNG et aide ainsi le GMPc à garder le canal ouvert, et la recoverine interagit avec et inhibe la rhodopsine kinase (RK), ce qui va potentialiser une prochaine activation de la rhodopsine (Rh). Tiré de (Lucas et al., 2000).

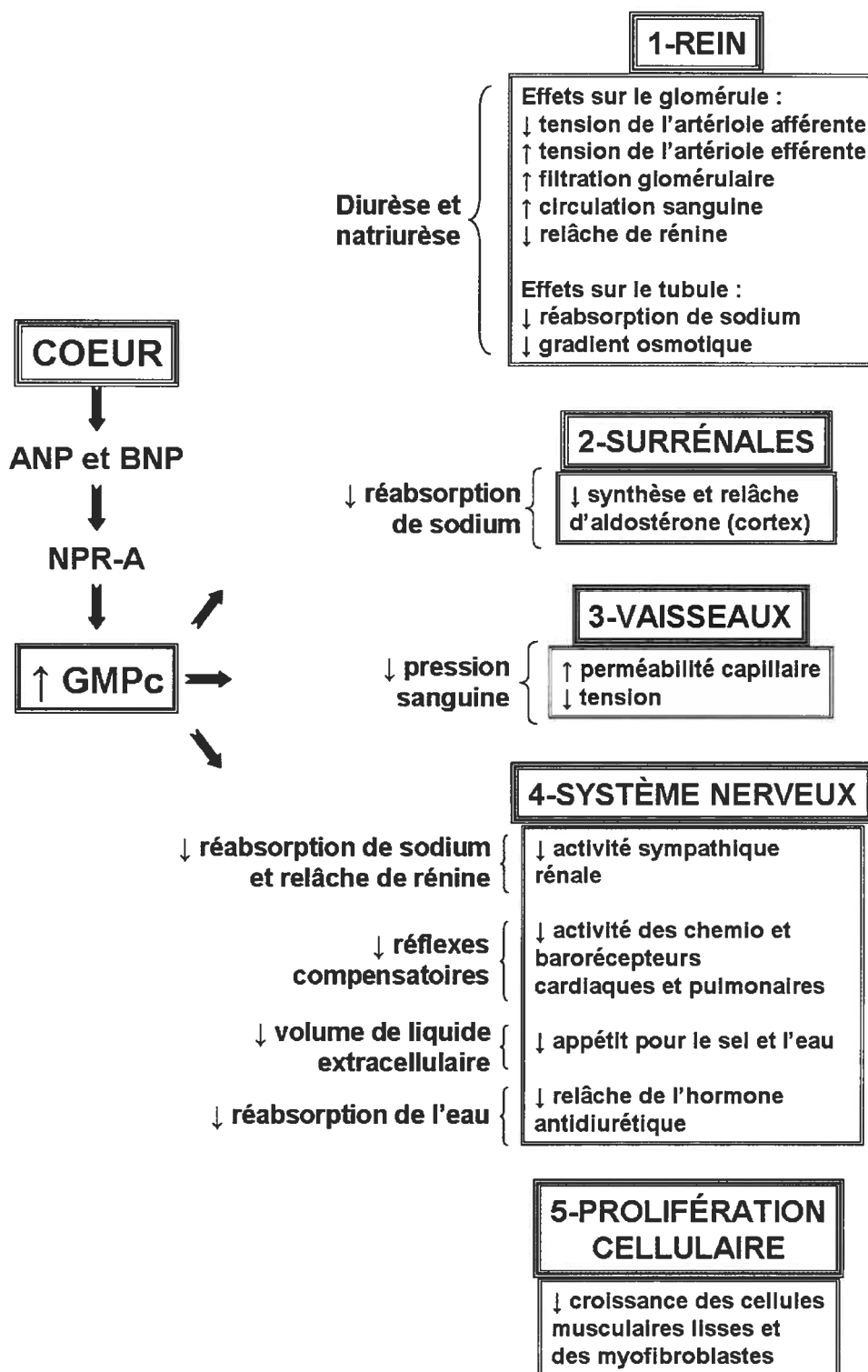
### ***2.2.7 La guanylate cyclase G***

Ce récepteur orphelin est le dernier membre des guanylates cyclases membranaires de mammifère. Il a été identifié en 1998 (Schulz et al., 1998). Contrairement aux autres récepteurs guanylates cyclases orphelins, il est présent dans plusieurs tissus chez le rat, comme les poumons, l'intestin, le rein, et le muscle squelettique (Schulz et al., 1998). Ceci suggère qu'il existe peut-être une autre famille de ligands endogènes activateurs de guanylate cyclase particulière.

**CHAPITRE 3 : Effets physiologiques des peptides  
natriurétiques**

## Introduction

Les peptides natriurétiques sont principalement connus pour leur implication dans la régulation de la pression sanguine et du volume sanguin. Bien que ce rôle soit le mieux documenté, d'autres effets physiologiques de ces peptides ont été découverts. De plus, les rôles exacts joués par les peptides ANP et BNP, qui activent tous les deux le NPR-A, ne sont pas encore tout à fait élucidés. Ce chapitre a pour but de décrire en détail le « où » et le « comment » de l'action des peptides natriurétiques dans le corps humain. Les effets physiologiques les mieux connus pour l'instant sont ceux reliés à l'activation du NPR-A (**Figure 3.1**).



**Figure 3.1** : Les actions biologiques bien documentées du système ANP / BNP / NPR-A.

Modifié de (McGrath et al., 2005).

### 3.1 Les effecteurs du GMPc

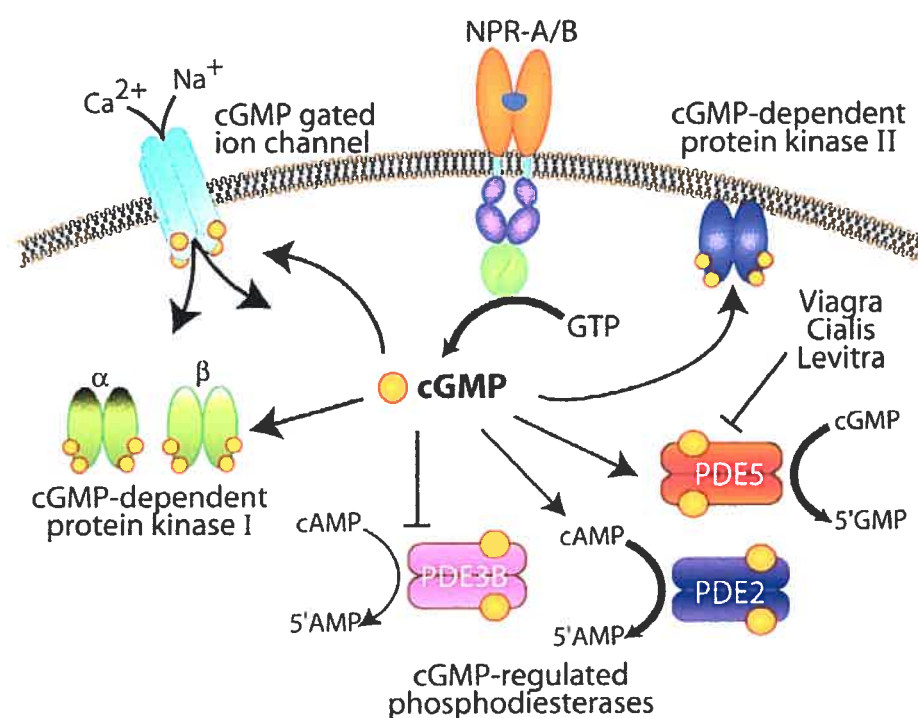
Les peptides natriurétiques induisent leurs effets via la synthèse de GMPc, un second messenger intracellulaire important qui fut d'abord identifié et détecté dans l'urine de rat (Ashman et al., 1963). Il y a trois principales protéines de liaison au GMPc connues : La PKG, les phosphodiésterases liant le GMPc, et les canaux ioniques sensibles au GMPc.

#### *3.1.1 La protéine kinase G*

La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) est le principal médiateur intracellulaire de la signalisation par le GMPc. Deux gènes de PKG ont été identifiés chez les mammifères. Un de ces gènes est situé sur le chromosome 10 chez l'humain et code pour les isoformes I $\alpha$  et I $\beta$  de la PKGI, suite à un épissage alternatif de la région N-terminale (**Figure 3.2**) (Tamura et al., 1996). L'autre gène est placé sur le chromosome 4 et code pour la PKGII. La PKGI est un homodimère cytosolique de 76 kDa exprimé dans plusieurs tissus mais particulièrement dans le cervelet, les plaquettes, et le muscle lisse (Lohmann et al., 1997). La différence dans le domaine N-terminal entre les isoformes confère des affinités de liaison différente pour le GMPc. L'isoforme  $\alpha$  a des sites de haute et de basse affinité pour le GMPc qui démontrent une coopérativité positive. L'isoforme  $\beta$  a deux sites de liaison pour le GMPc mais ils démontrent une faible affinité et une faible coopérativité (Pfeifer et al., 1999). Bien que ces deux isoformes soient retrouvées dans les mêmes tissus, l'isoforme  $\alpha$  se retrouve surtout dans le système vasculaire, les reins, et la surrénale, alors que la forme  $\beta$  est la seule forme présente dans l'utérus (Tamura et al., 1996). Il est intéressant de constater que la délétion de la PKGI chez la souris produit une perte de fonction au niveau de la relaxation du muscle lisse vasculaire dépendante du GMPc. Les souris montrent aussi une hypertension juvénile (Pfeifer et al., 1998).

La PKGII est un homodimère de 86 kDa lié à la membrane. Elle n'est pas retrouvée dans le système cardiovasculaire, mais est abondante dans le cerveau et l'intestin, et aussi retrouvée dans les poumons, les reins, et les os (Uhler, 1993; Jarchau et al., 1994; Lohmann et al., 1997). La différence de séquence entre

la PKGI et la PKGII se retrouvent surtout en N-terminal, où des sites sont chargés de diriger la localisation intracellulaire de l'enzyme. La PKGI contient un site d'acétylation alors que la PKGII contient une séquence de myristoylation requise pour l'association à la membrane (Lohmann et al., 1997). La délétion de la PKGII chez la souris ou le rat produit une forme de nanisme ainsi qu'une résistance aux entérotoxines bactériennes (Pfeifer et al., 1996; Chikuda et al., 2004). Une différence majeure entre PKGI et PKGII est que les sites de liaison du GMPc de la PKGII ont très peu d'affinité et de coopérativité. Leur sélectivité de substrat est aussi très différente *in vivo* (Pfeifer et al., 1999). De plus, à l'exception de certains chondrocytes, on ne retrouve jamais les deux enzymes dans le même type cellulaire (Pfeifer et al., 1996).



**Figure 3.2 :** Les effecteurs du GMPc.

Tiré de (Potter et al., 2006).

Les PKG sont composées de 3 domaines : Un domaine N-terminal, un domaine régulateur, et un domaine catalytique. Le domaine N-terminal contient cinq sites de régulation : 1) un site de dimérisation des sous-unités, composé d'une hélice avec un motif répété leucine-isoleucine en heptades ; 2) des sites d'autoinhibition, impliqués dans l'inhibition du domaine catalytique en absence



de GMPc ; 3) des sites d'autophosphorylation, qui vont augmenter l'activité catalytique basale en présence de GMPc ; 4) un site qui régule l'affinité et la coopérativité des sites de liaison du GMPc ; et 5) le site de localisation intracellulaire, qui détermine l'interaction de l'enzyme avec certaines structures cellulaires. Le domaine régulateur contient 2 sites de liaison de GMPc qui permet une activation totale de l'enzyme après liaison de 2 molécules de GMPc. Finalement, le site catalytique en C-terminal contient les sites de liaison pour le substrat Mg-ATP et la protéine cible de la phosphorylation (Lohmann et al., 1997;Lucas et al., 2000).

### ***3.1.2 Les canaux ioniques sensibles au GMPc***

Le GMPc induit des réponses cellulaires à travers la régulation de canaux ioniques CNG (sensibles aux nucléotides cycliques). Cette famille de canaux non sélectifs aux cations contient en C-terminal un domaine de liaison à l'AMPc ou au GMPc (**Figure 3.2**). Ces canaux ont surtout été caractérisés dans les photorécepteurs de la rétine, mais on les retrouve aussi dans les cellules chemosensibles, dans le cerveau, dans les cellules épithéliales des bronches, et dans le rein (Kaupp and Seifert, 2002). Six gènes humains codent pour les sous-unités formant les canaux CNG. Ces sous-unités sont divisées en 2 groupes, A et B. Le groupe A comprend des sous-unités qui peuvent former un canal fonctionnel complet, alors que le groupe B contient des sous-unités qui doivent s'assembler avec des membres du groupe A pour former un canal fonctionnel. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a mis en relation directe l'activation d'un canal CNG avec l'activation d'un récepteur des peptides natriurétiques.

### ***3.1.3 Les phosphodiésterases***

Les phosphodiésterases (PDEs) des nucléotides cycliques sont des enzymes importantes puisqu'elles sont chargées de dégrader les nucléotides cycliques en nucléotide 5'-monophosphates inactifs. Ce sont donc des régulateurs des concentrations intracellulaires de seconds messagers. Il y a 11 familles de PDEs. Chaque famille contient différentes isoformes, ce qui génère en réalité 25 enzymes PDEs différentes chez l'humain (Rybalkin et al., 2003;Jeon et al., 2005).

Les familles sont classées selon le substrat dégradé. Les enzymes spécifiques à l'AMPc sont les PDE-4, 7, et 8, alors que celles spécifiques au GMPc sont les PDE-5, 6, et 9. Les PDEs 1, 2, 3, 10, et 11 dégradent les deux nucléotides cycliques (Jeon et al., 2005). Certaines PDEs (2, 5, 6, 10 et 11) contiennent des motifs régulateurs en N-terminal nommés domaines « GAF », chargés de lier le nucléotide cyclique. Cette régulation allostérique fait augmenter l'activité de l'enzyme. La PDE 5 est particulièrement connue. Retrouvée dans presque tous les types de cellules musculaires lisses vasculaires ou viscérales comme l'utérus ou l'intestin, elle est la cible des agents utilisés dans le traitement de la dysfonction érectile (Sildenafil-Viagra, Valdenafil-Levitra, Tadalafil-Cialis). De plus, ces enzymes sont sujettes à l'activation allostérique et peuvent produire une régulation croisée entre le GMPc et l'AMPc. Par exemple, la liaison du GMPc à la PDE 2 active l'enzyme qui dégrade ensuite l'AMPc. Aussi, la liaison de GMPc à la PDE 3 inhibe son activité, ce qui diminue la dégradation de l'AMPc (**Figure 3.2**).

### **3.2 Effets du système ANP / NPR-A sur la pression sanguine**

Une étude convaincante chez la souris a démontré que l'activité guanylate cyclase et la pression sanguine sont directement proportionnelles au nombre de copies du gène codant pour le NPR-A présent chez les souris (Oliver et al., 1998). De plus, les souris n'ayant pas d'ANP (John et al., 1995) ou de NPR-A (Lopez et al., 1995; Oliver et al., 1997) ont des pressions sanguines de 20-40 mm de mercure plus élevées que la normale. À l'inverse, des animaux exprimant fortement les gènes de l'ANP (Steinhilper et al., 1990) ou du BNP (Ogawa et al., 1994) ont des pressions sanguines 20-30 mm de mercure plus basses que la normale. Bien que la régulation de la pression sanguine par l'ANP ait d'abord été décrite comme sensible à la présence de sel (John et al., 1995), d'autres études ont indiqué que ce n'est pas le cas (Lopez et al., 1995; John et al., 1996). En fait, les effets combinés de l'ANP sur le volume intravasculaire, la vasorelaxation, la natriurèse, et la diurèse, sont responsables de son effet hypotenseur (**Figure 3.1**). Nous allons maintenant discuter de ces aspects en détail.

### **3.3 Effets du système ANP / NPR-A sur la perméabilité de l'endothélium et le volume intravasculaire**

Les toutes premières études effectuées avec l'ANP indiquaient que l'injection d'extraits de l'oreillette faisait augmenter les taux d'hématocrites (de Bold et al., 1981). D'autres études ont ensuite indiqué que la diminution du volume vasculaire induite par l'ANP ne nécessite pas les effets de natriurèse et de diurèse du peptide, puisqu'elle se produit aussi chez des rats néphrectomisés et elle se produit avant la production d'urine (Almeida et al., 1986) (Fluckiger et al., 1986; Richards et al., 1988b). Il a ensuite été démontré que l'ANP fait augmenter la conductivité capillaire (Huxley et al., 1987) et la perméabilité de l'endothélium à des macromolécules comme l'albumine (McKay and Huxley, 1995). Cependant il semble y avoir une controverse à ce sujet lorsque les études sont effectuées avec des lignées cellulaires en culture. Une étude suggère que le GMPc produit induit une augmentation de la perméabilité (He et al., 1998), alors qu'une autre montre que la perméabilité est réduite (Westendorp et al., 1994). Cependant, une étude récente utilisant la technique de délétion sélective du gène NPR-A permet de lever la controverse et indique que les souris n'ayant pas de NPR-A exprimé dans l'endothélium vasculaire sont légèrement hypertendues (10-15 mm Hg) et ont un volume sanguin plus élevé d'environ 12% (Sabrane et al., 2005). Ces données suggèrent que le NPR-A de l'endothélium est responsable du tiers de l'effet hypotenseur total de l'ANP, puisque les animaux n'ayant absolument aucun NPR-A sont très hypertendus (30-40 mm Hg) et ont un volume sanguin plus élevé de 30%. L'albumine iodée a été utilisée comme marqueur de la perméabilité du territoire vasculaire puisqu'une augmentation de perméabilité va permettre à l'albumine iodée d'entrer dans les tissus. Ainsi, les souris normales présentent une entrée marquée de l'albumine iodée dans les tissus lors d'une injection d'ANP. Au contraire, chez les animaux sans NPR-A endothélial, l'albumine iodée reste dans le plasma (Sabrane et al., 2005). De plus, les souris sans NPR-A endothélial ne montrent pas d'élévation des taux de globules rouges suite au traitement avec ANP, démontrant un rôle crucial de l'endothélium dans ce mécanisme. Ces résultats indiquent clairement que l'ANP régule le volume de liquide transvasculaire en augmentant la perméabilité microvasculaire, mais le mécanisme moléculaire de cette régulation n'est pas encore connu.

### **3.4 Effets de l'ANP et du BNP sur l'hypertrophie cardiaque et la fibrose**

L'ANP et le BNP ont des effets directs sur le poids du cœur. En effet, les souris qui n'ont pas d'ANP sécrété (John et al., 1995) ou de NPR-A exprimé (Oliver et al., 1997; Franco et al., 1998) ont des cœurs de masse plus élevée, alors que les animaux surexprimant l'ANP ont des cœurs plus légers (Steinhilber et al., 1990; Barbee et al., 1994). À l'origine, il était difficile de dire si cet effet d'augmentation de la masse, en plus d'une hypertrophie et d'une fibrose apparente, était dû à l'exposition prolongée du cœur à une hypertension, ou à la perte réelle d'un facteur anticroissance. Il est possible que ces deux facteurs mènent au développement de ce phénotype. Le premier indice d'un effet anticroissance direct de l'ANP est venu d'études indiquant que l'ANP induit l'apoptose des cardiomyocytes (Wu et al., 1997; Calderone et al., 1998; Chusho et al., 2000). L'inhibition du NPR-A de cardiomyocytes *in vitro* fait augmenter la taille des cellules et fait augmenter l'expression de marqueurs de l'hypertrophie. L'ajout d'un analogue de GMPc renverse ces effets (Horio et al., 2000). Une autre étude a ensuite suggéré ce rôle en utilisant des souris n'exprimant pas de NPR-A et traitées avec des agents antihypertenseurs depuis la naissance (Knowles et al., 2001). Ces animaux avaient une tension normale, mais avaient tout de même une hypertrophie cardiaque, ce qui indiqua que le NPR-A a un rôle antihypertrophique indépendant de son rôle dans le contrôle de la pression sanguine. Dans une autre étude publiée la même année, la réintroduction du gène codant pour le NPR-A dans le cœur de souris exprimant ou non le NPR-A a produit une réduction de la taille des cardiomyocytes sans affecter l'hypertension (Kishimoto et al., 2001). Les niveaux d'ANP plasmatiques étaient de plus inversement proportionnels au niveau d'expression du NPR-A. Par après, une étude a démontré que la délétion sélective du gène codant pour le NPR-A dans les cardiomyocytes avec la technologie Cre/Lox génère des souris ayant une pression sanguine diminuée mais avec une hypertrophie cardiaque assez développée (Holtwick et al., 2003). La pression sanguine réduite chez ces animaux est possiblement due à une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP. Il est probable que la délétion du NPR-A au cœur active des mécanismes compensatoires d'augmentation de la synthèse / sécrétion des peptides natriurétiques. Ces résultats

sont donc en accord avec un rôle localisé du NPR-A dans le contrôle de l'hypertrophie cardiaque.

Pour ce qui est du BNP, il a été démontré que la présence de BNP inhibe la prolifération de fibroblastes en culture (Cao and Gardner, 1995). Cette observation a pris de l'importance lorsqu'il a été démontré que les souris n'exprimant pas le BNP montraient une importante fibrose ventriculaire (Tamura et al., 2000). Il y a cependant controverse en ce qui a trait au mécanisme par lequel le BNP régule les fibroblastes. Un groupe de recherche a suggéré que le BNP atténue la fibrose induite par l'angiotensine II en inhibant la voie des MAPKs (Takahashi et al., 2003). Un autre groupe a indiqué que le BNP inhibe la fibrose en inhibant l'action du TGF- $\beta$  par une activation de la voie MAPK (Kapoun et al., 2004). Plusieurs études suggèrent que la fibrose cardiaque implique les métalloprotéases de la matrice (MMPs) puisque l'ANP et le BNP régulent les niveaux de ces protéines (Tsuruda et al., 2002; Wang et al., 2003; Kapoun et al., 2004). Les souris sans expression de NPR-A montrent une expression et une activité plus élevées de MMP-2 et MMP-9. Aussi, cette activité augmentée est en corrélation avec une augmentation de l'expression du NF- $\kappa$ B (Vellaichamy et al., 2005). Plusieurs publications indiquent que le système ANP-BNP-NPR-A inhibe aussi le remodelage cardiaque induit par la pression sanguine (Knowles et al., 2001; Holtwick et al., 2003; Tsuneyoshi et al., 2004). C'est pourquoi des agents qui activent le NPR-A ou qui bloquent l'inactivation de cette voie pourraient être utiles cliniquement pour les patients ayant un cœur défaillant.

Lorsque le gène codant pour le NPR-A est éliminé chez la souris, on observe chez ces animaux une haute pression sanguine, une hypertrophie cardiaque, et une fibrose ventriculaire (Lopez et al., 1995; Oliver et al., 1997). De plus, chez des patients, une mutation dans le promoteur du gène du NPR-A a été démontrée comme réduisant l'expression du NPR-A de 70% (Nakayama et al., 2000). Huit patients japonais avaient cette mutation. Sept de ceux-ci faisaient de l'hypertension, et l'autre faisait de l'ICC. Une autre mutation, M341I, associée au risque d'infarctus du myocarde, est soupçonnée de déstabiliser la structure du site de liaison de l'ANP sur le NPR-A (Nakayama et al., 2002; Nakayama et al., 2003). Donc, tout défaut dans ce gène semble mener droit à une maladie cardiovasculaire.

### 3.5 Effets de l'ANP sur la natriurèse et la diurèse

Dans le rein, les effets de l'ANP sont multiples (Figure 3.3).

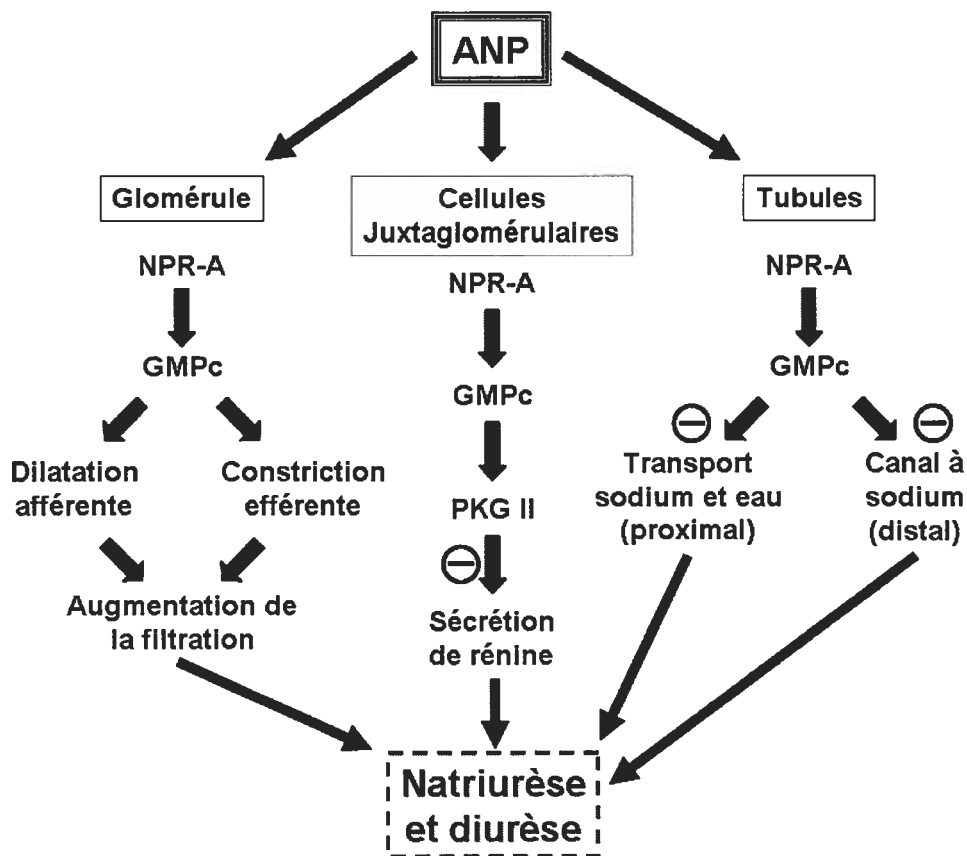


Figure 3.3 : Effets de l'ANP sur le rein.

Modifié de (Potter et al., 2006).

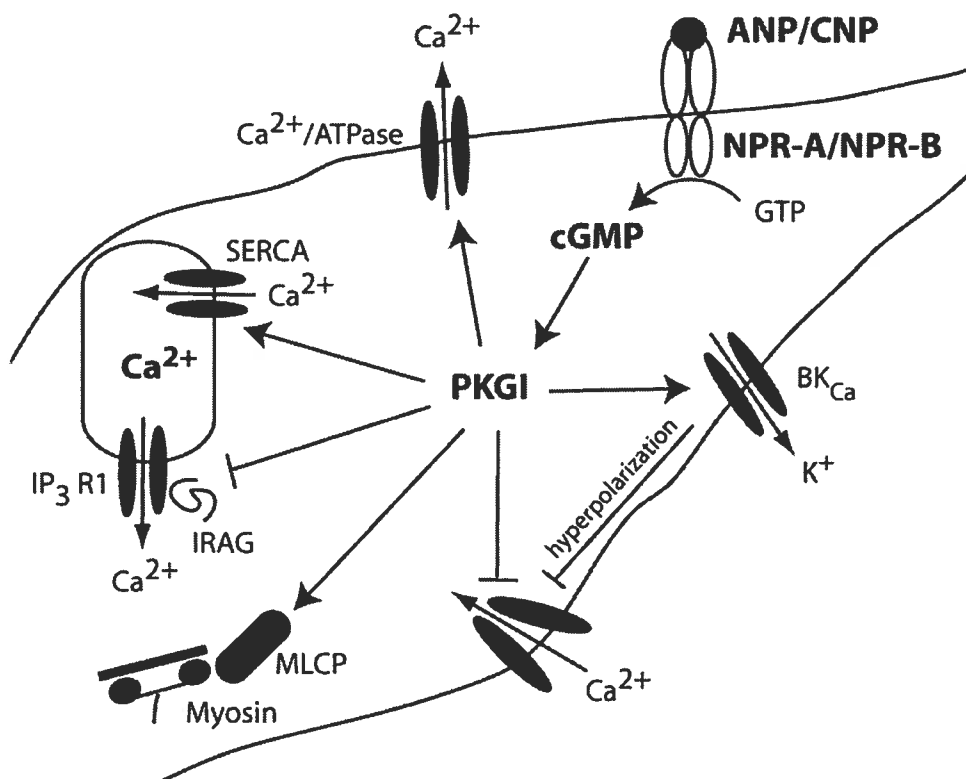
Il augmente le taux de filtration glomérulaire, il inhibe la réabsorption d'eau et de sodium, et il réduit la sécrétion de rénine. Ces effets de natriurèse et de diurèse sont entièrement dus à la présence du NPR-A puisque ces effets sont complètement absents chez la souris n'exprimant pas le NPR-A (Kishimoto et al., 1996). Plus précisément, l'ANP augmente la filtration glomérulaire en faisant augmenter la pression dans les capillaires du glomérule par une dilatation de l'artériole afférente et une contraction de l'artériole efférente (Marin-Grez et al., 1986). De plus, l'ANP inhibe la réabsorption de l'eau et du sodium à travers le néphron. Dans le tubule proximal, l'ANP inhibe le transport de l'eau et du sodium induit par l'angiotensine II (Harris et al., 1987). Dans le tubule collecteur, il réduit l'absorption de sodium en inhibant un canal à cation sensible à l'agent diurétique

amiloride (Light et al., 1990). Ces effets sur les tubules passent par la production de GMPc par le NPR-A.

### **3.6 Effets de l'ANP et du CNP sur la relaxation vasculaire et le remodelage**

La capacité des peptides natriurétiques à relaxer des anneaux aortiques précontractés requiert le NPR-A puisque des préparations venant d'animaux transgéniques n'ayant pas le NPR-A ne répondent pas à l'ANP (Lopez et al., 1997). Le CNP aussi relaxe les anneaux aortiques par un processus qui ne requiert pas le NPR-A, mais passe probablement par le NPR-B (Drewett et al., 1995; Lopez et al., 1997). Lorsque le gène codant pour le NPR-A est sélectivement inactivé dans les cellules de muscle lisse vasculaire, les souris ne subissent pas de réduction forte de la pression sanguine quand on leur injecte l'ANP (Holtwick et al., 2002). Cependant la pression sanguine de base de ces souris est la même que les souris normales, ce qui indique que le NPR-A agit sur la vasorelaxation que dans des conditions aiguës où l'ANP est abondant.

Le mécanisme moléculaire par lequel l'ANP induit la vasorelaxation est assez bien connu (**Figure 3.4**). La PKGI y joue un rôle central. D'ailleurs les souris n'exprimant pas la PKGI ne présentent pas de vasodilatation dépendante des agents producteurs de GMPc, comme l'ANP ou les générateurs de NO (Pfeifer et al., 1998). Ces animaux ont une tension normale, ce qui suggère que le phénotype d'hypertension des animaux n'exprimant pas l'ANP ou le NPR-A ne passe pas par l'action de la PKGI (Schlossmann et al., 2005). La PKGI induit la relaxation du muscle lisse vasculaire en faisant diminuer la concentration intracellulaire de calcium et en faisant diminuer la sensibilité au calcium de l'appareil de contraction. La PKGI agit sur plusieurs canaux calciques.



**Figure 3.4 :** Relaxation du muscle lisse induite par les peptides natriurétiques.

La liaison de l'ANP, du BNP, ou du CNP au NPR-A ou NPR-B active la production de GMPc par le récepteur. Le GMPc active la protéine kinase GI (PKGI) qui phosphoryle ensuite diverses protéines. La PKGI inhibe le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et stimule la calcium/ATPase à la membrane cellulaire, la calcium/ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), et le canal calcium/potassium BK, pour réduire la concentration intracellulaire en calcium. Également, la PKGI phosphoryle et active la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP). Ceci fait augmenter le niveau requis de calcium pour qu'il y ait contraction du muscle et fait donc diminuer la sensibilité au calcium. Tiré de (Potter et al., 2006).

La forme PKGI $\alpha$  phosphoryle et active directement le canal potassique calcium-dépendant (Swayze and Braun, 2001). Celui-ci fait sortir le potassium de la cellule et augmente ainsi la polarisation de la cellule. Cette hyperpolarisation inhibe l'entrée de calcium à travers le canal calcique voltage-dépendant. La PKGI inhiberait aussi ce canal par phosphorylation directe ou indirecte. Au niveau du réticulum sarcoplasmique, la PKGI phosphoryle directement le récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (Komalavilas and Lincoln, 1996) ainsi que le substrat de PKG associé au récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IRAG). Ceci bloque la relâche de



calcium de cette vésicule d'entreposage (Schlossmann et al., 2000). La PKGI active aussi la pompe membranaire calcium/ATPase pour faire sortir le calcium de la cellule de façon active. Le phospholamban est un autre substrat connu de la PKGI. Une fois phosphorylé par la PKGI, il se lie et active le canal calcium/ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), qui induit l'entreposage du calcium intracellulaire (Cornwell et al., 1991). Cependant ceci n'est pas absolument requis car des souris n'exprimant pas le phospholamban ont une vasodilatation normale en réponse aux agents éleveurs de GMPc (Lalli et al., 1999). Finalement, la PKGI $\alpha$  fait diminuer la sensibilité au calcium du système de contraction en phosphorylant et en activant la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (Nakamura et al., 1999). Celle-ci fait diminuer le niveau de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine sur la sérine 19. Tous ces effets mènent à une relaxation du muscle lisse vasculaire (**Figure 3.4**) (Carvajal et al., 2000).

Le CNP est aussi un vasodilatateur et est relâché suite à un dommage vasculaire (Suga et al., 1993). Son récepteur le NPR-B se retrouve dans le muscle lisse aortique vasculaire et active une relaxation CNP-dépendante de l'aorte de rat pré-contractée (Drewett et al., 1995). Il appert aussi que le CNP inhibe la prolifération du muscle lisse vasculaire ainsi que la migration, induite par les LDL oxydés, des cellules musculaires lisses d'artère coronaire en culture (Furuya et al., 1991; Kohno et al., 1997). Ceci passe par la production de GMPc. L'étude des voies activées par le CNP est plus récente, mais des études ont démontré des faits intéressants. Par exemple, une étude a suggéré que le CNP pourrait agir de façon paracrine dans la formation de la néointima (Brown et al., 1997). En effet le CNP est exprimé par les cellules de muscle lisse vasculaire dans la néointima de carotide de rat, mais pas dans la média. En accord avec cette idée, le CNP inhibe la croissance de l'intima induite par différents types de dommages artériels (Shinomiya et al., 1994; Takeuchi et al., 2003; Schachner et al., 2004). Des études récentes suggèrent également que le CNP serait le très recherché EDHF (facteur hyperpolarisant provenant de l'endothélium) (Chauhan et al., 2003; Chauhan et al., 2004). En effet, trois facteurs provenant de l'endothélium sont connus comme des vasodilatateurs locaux : le NO, la prostacycline, et un facteur inconnu, nommé EDHF, qui dilate le territoire vasculaire en hyperpolarisant le muscle lisse vasculaire. Le CNP inhiberait aussi le dommage du myocarde induit par

ischémie/reperfusion (Hobbs et al., 2004), ainsi que les interactions entre les plaquettes et les leucocytes (Scotland et al., 2005b). Étonnamment, ces effets du CNP passeraient par sa liaison au NPR-C et non au NPR-B.

### **3.7 Effets des peptides natriurétiques dans le poumon**

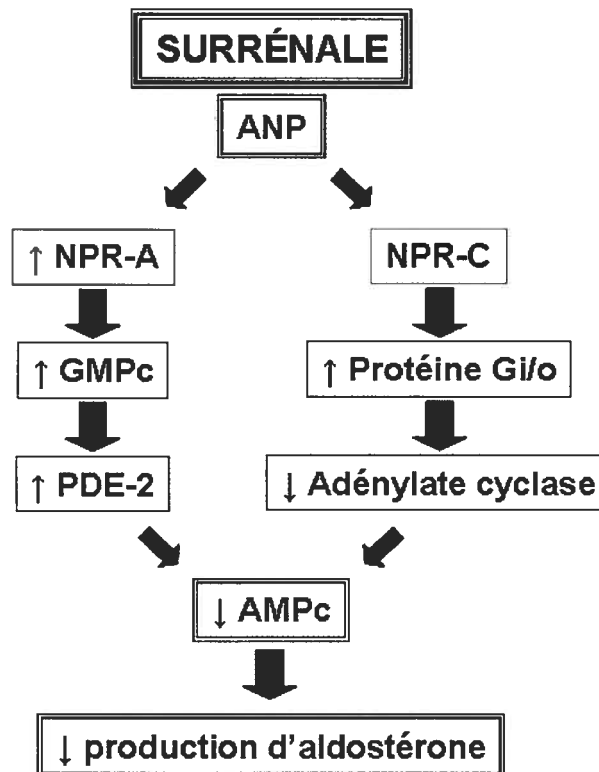
Comme indiqué dans les sections précédentes, les trois récepteurs aux peptides natriurétiques sont retrouvés dans le poumon. L'ANP stimule la dilatation des voies pulmonaires et des vaisseaux sanguins. L'infusion ou l'inhalation d'ANP stimule la bronchodilatation chez des patients normaux ou asthmatiques (Hamad et al., 2003). L'ANP et le BNP circulants sont élevés chez des patients qui font de l'hypertension pulmonaire et sont des indicateurs d'une augmentation de la tension dans le ventricule droit (Nagaya et al., 2000; Yap et al., 2004). De plus, les souris qui surexpriment l'ANP sont résistantes à l'hypertension induite par l'hypoxie (Klinger et al., 1993), alors que les souris n'exprimant pas l'ANP montrent au contraire une forte hypertension pulmonaire en réponse à une hypoxie chronique (Klinger et al., 1999). Le CNP aussi réduit l'hypertension pulmonaire et la fibrose (Murakami et al., 2004; Itoh et al., 2004).

### **3.8 Inhibition du système rénine-aldostérone par l'ANP**

La régulation de la pression sanguine par l'ANP se fait en partie par l'inhibition du système rénine-angiotensine II-aldostérone (SRAA). La rénine est une protéase sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires rénales. Elle est chargée de cliver l'angiotensinogène en angiotensine I. L'angiotensine I est ensuite convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) dans l'endothélium pulmonaire vasculaire. L'hormone angiotensine II stimule ensuite la vasoconstriction et la relâche de l'aldostérone, une hormone importante dans la régulation de la réabsorption du sodium dans le tubule collecteur du rein. Des doses physiologiques d'ANP inhibent la production de rénine et d'aldostérone (Richards et al., 1988a). Chez le chien, l'infusion d'ANP dans le rein inhibe fortement le taux de sécrétion de la rénine. (Burnett et al., 1984) La sécrétion de rénine est stimulée par l'AMPc mais l'inhibition de cette sécrétion requiert la PKGII (Gambaryan et al., 1998). D'ailleurs les souris n'exprimant pas

la PKGII ont une expression de rénine élevée et sont résistantes à l'inhibition 8-bromo-GMPc-dépendante de la sécrétion de rénine induite ou non par la forskoline (Wagner et al., 1998). À la naissance, les souris n'exprimant pas le NPR-A ont des niveaux élevés d'angiotensine II et de rénine au rein, ce qui va de pair avec les effets antagonistes de l'ANP et du NPR-A sur le SRAA (Shi et al., 2001). Cependant, à l'âge adulte, la souris n'exprimant pas le NPR-A montre des niveaux réduits de rénine au niveau global et au niveau rénal, alors que les niveaux de rénine et d'aldostérone dans la surrénale restent élevés. Ceci suggère que les niveaux réduits de rénine au niveau rénal et au niveau systémique sont le résultat d'un mécanisme compensatoire à la pression sanguine élevée.

En plus d'inhiber la sécrétion de rénine, l'ANP inhibe directement la production d'aldostérone dans la glande surrénale. Dans la glomérulosa de la surrénale, l'ANP réduit la production d'aldostérone stimulée par l'ACTH et l'angiotensine II (Chartier et al., 1984; De Lean et al., 1984; Kudo and Baird, 1984-1985). Le rôle joué par le GMPc dans cette inhibition est encore controversé. Une étude a démontré que l'effet d'ANP était imité par un analogue de GMPc perméable aux cellules (Barrett and Isales, 1988), alors qu'un autre groupe a indiqué que les analogues de GMPc étaient inefficaces (Ganguly et al., 1989). Ce groupe a indiqué que cette capacité de l'ANP de réduire les niveaux d'aldostérone peut être imitée par un ligand spécifique au NPR-C, et bloquée par la toxine pertussique, un inhibiteur de la protéine Gi/Go (**Figure 3.5**). Cependant, des données récentes utilisant un peptide 1000 fois plus spécifique pour le NPR-A que pour le NPR-C suggèrent que le NPR-A est responsable des effets ANP-dépendants sur la baisse des quantités d'aldostérone (Olson et al., 1998). En accord avec cette observation, les souris n'exprimant pas le NPR-A ont une aldostérone plasmatique 2 fois plus élevée que les souris normales (Shi et al., 2001). Le mécanisme impliqué dans la baisse de production d'aldostérone pourrait impliquer la phosphodiesterase 2, une phosphodiesterase activée par le GMPc mais qui dégrade l'AMPc. Elle est hautement exprimée dans la glomérulosa de la surrénale (**Figure 3.5**) (MacFarland et al., 1991).



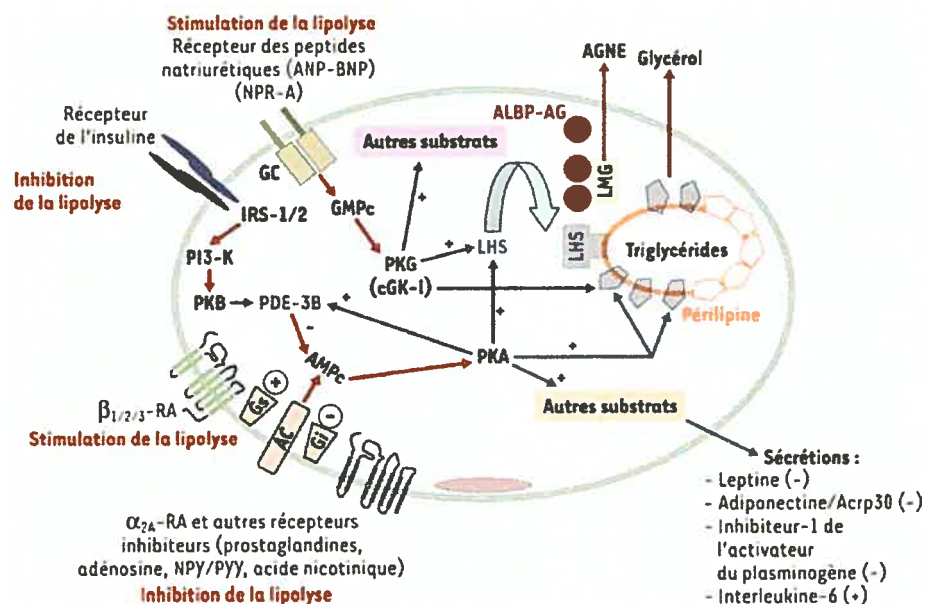
**Figure 3.5 :** Contrôle par l'ANP de la régulation de la production d'aldostérone dans la surrénale.

Deux mécanismes sont proposés pour cette régulation. Le premier implique l'activation du NPR-A, qui produit du GMPc et stimule la PDE-2 qui dégrade l'AMPc. L'autre implique l'activation du NPR-C qui inhibe l'adénylyl cyclase en passant par Gi/Go. Modifié de (Potter et al., 2006).

### 3.9 Effets de l'ANP sur le métabolisme des lipides

Plusieurs études ont démontré un lien entre l'obésité et l'hypertension, et l'effet des peptides natriurétiques sur le tissu graisseux commence tout juste à être investigué. La présence du NPR-A dans les adipocytes de rat avait déjà été démontrée (Okamura et al., 1988; Jeandel et al., 1989). Cependant dans ces tissus aucun effet lipolytique de l'ANP n'avait été détecté. Récemment, il a été démontré que l'ANP stimule la lipolyse dans des adipocytes humains en culture. L'infusion du peptide par microdialyse in situ a le même effet (Sengenès et al., 2000). Les différences de résultats entre le rat et la grande famille des primates peuvent s'expliquer par le fait que chez le rat, le ratio des quantités de NPR-A sur

NPR-C est tel que la dégradation du peptide supplante l'activation du NPR-A. Chez les primates, le ratio étant plus élevé, l'ANP peut avoir un effet significatif (Sengenès et al., 2002b). La stimulation de la lipolyse par l'ANP est imitée par l'ajout de 8-bromo-GMPc, et est indépendante de la phosphodiesterase 3B, l'enzyme de dégradation de l'AMPc dans l'adipocyte (Sengenès et al., 2000). L'effet dépend de la PKGI puisque l'inhibition de la PKGI bloque la lipolyse ANP-dépendante dans des preadipocytes humains primaires (Sengenès et al., 2003). La PKG stimule la lipase hormono-sensible, une enzyme adipocytaire fortement régulée et responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras. Une phosphorylation accentuée de la périlipine en réponse à l'ANP a aussi été observée. Cette protéine enveloppe la gouttelette lipidique et est un élément important du dispositif lipolytique (Sengenès et al., 2005). L'obésité est associée à un dérèglement de la lipolyse médié par les catécholamines. Une étude a démontré que les effets mobilisateurs des graisses de l'ANP ne sont pas reliés à l'obésité (Galitzky et al., 2001). Cependant une autre étude a indiqué que des femmes obèses ont une lipolyse augmentée par l'ANP et l'isoprotérénol lorsqu'elles suivent une diète hypocalorique (Sengenès et al., 2002a). La **figure 3.6** présente le mécanisme de la lipolyse dans l'adipocyte humain.



**Figure 3.6 :** Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain.

+ : stimulation ; - : inhibition. Tiré de (Sengenès et al., 2005).

Dans l'adipocyte, les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques (RA) sont couplés positivement ou négativement à l'adénylyl cyclase et à la production d'AMPc par des protéines G hétérotrimériques (Gs et Gi). La stimulation des récepteurs adrénergiques active les protéines Gs ou Gi, respectivement. L'AMPc produit par l'activation de l'adénylyl cyclase active la protéine kinase A (PKA) qui va stimuler la phosphorylation des périlipines et de la lipase hormono-sensible (LHS) (**Figure 3.6**). La PKA phosphoryle également diverses autres protéines cibles de l'adipocyte (non représentées dans le schéma). Les éléments impliqués dans la transduction du signal insulinique (récepteur insuline, IRS, PI3-kinase et PKB/Akt) et l'activation de la phosphodiesterase de type 3B (PDE-3B), qui hydrolyse l'AMPc, sont représentés. Cette voie exerce des effets modulateurs puissants sur la lipolyse adrénergique. Les peptides natriurétiques stimulent l'activité guanylate cyclase (GC) du récepteur NPR-A des peptides natriurétiques, induisent une augmentation des taux de GMPc, l'activation d'une protéine kinase G (PKG) puis la phosphorylation et l'activation de la périlipine et de la LHS. La LHS activée hydrolyse les tri- et les diglycérides. Les monoglycérides sont hydrolysés par une lipase des monoglycérides (LMG). L'activité lipolytique de l'adipocyte humain est sous le contrôle permanent des voies prolipolytiques ( $\beta$ -adrénergiques, peptides natriurétiques) et antilipolytiques (insuline,  $\alpha$ 2-adrénergiques, adénosine, prostaglandines, neuropeptide Y et peptide YY). Le système nerveux sympathique contrôle également, positivement ou négativement, la production de protéines sécrétées par l'adipocyte (telles que la leptine, l'adiponectine/Acrp30, l'interleukine-6 ou l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène). Dans la **figure 3.6**, ALBP-AG représente la protéine de liaison des acides gras qui va influencer l'exportation des acides gras non estérifiés (AGNE) vers le compartiment extracellulaire. Les flèches de couleur bleue indiquent les effets apparaissant au-delà de l'activation des kinases.

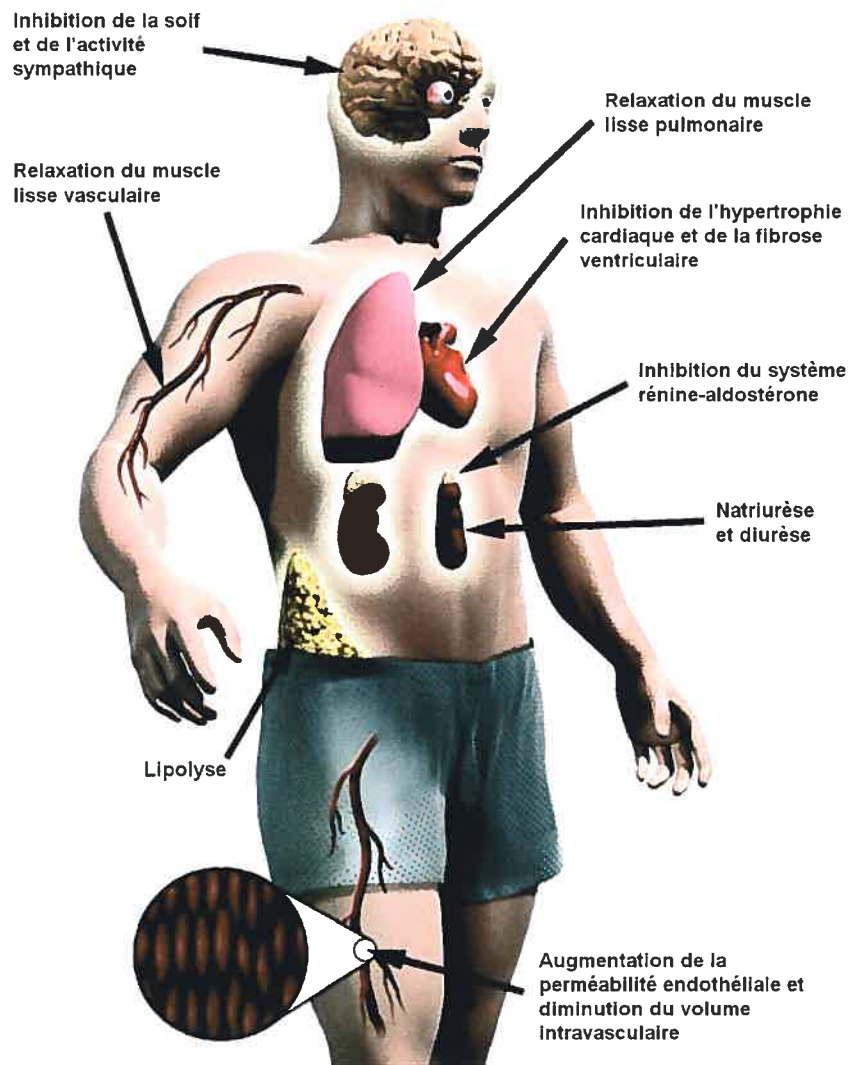
### **3.10 Effets neurologiques des peptides natriurétiques**

Il est intéressant de constater que tous les peptides natriurétiques et leurs récepteurs ont été détectés dans le cerveau. Le CNP et son récepteur le NPR-B sont particulièrement abondants. Une étude a montré que l'injection d'ANP dans l'hypothalamus inhibe la soif suite à une déshydratation (Antunes-Rodrigues et al., 1985). L'infusion intracerebroventriculaire d'ANP supprime l'appétit pour le

sel ainsi que la relâche de l'hormone arginine-vasopressine de l'hypothalamus (Itoh et al., 1986;Samson et al., 1987). De plus, la suppression de l'activité sympathique par l'ANP dans le cerveau a été observée (Schultz et al., 1988;Steele et al., 1991). Plus spécifiquement, l'ANP inhibe l'activité du nerf rénal ainsi que celle du nerf splanchnique en augmentant l'activité des fibres C vagales afférentes (Schultz et al., 1988). Il inhibe aussi la réponse des barorécepteurs artériels (Schultz et al., 1990;Yang et al., 1992). Finalement, il a été montré que le CNP et des analogues perméables du GMPc stimulent la relâche de l'hormone de croissance des cellules de la glande pituitaire de rat (Shimekake et al., 1994;Hartt et al., 1995).

### 3.11 Effets des peptides natriurétiques sur le système immunitaire

On a vu jusqu'à maintenant que le système ANP / BNP / NPR-A a des effets importants sur plusieurs fonctions biologiques dans plusieurs tissus (cerveau, poumon, cœur, rein, surrénale, tout le territoire vasculaire, et tissu adipeux) (Figure 3.7).



**Figure 3.7 :** Conséquences physiologiques de l'activation du NPR-A.

Modifié de (Potter et al., 2006).

Les peptides natriurétiques et leurs récepteurs sont aussi retrouvés dans plusieurs cellules du système immunitaire. Leur rôle dans ce système n'est cependant que très peu étudié. Les données récentes suggèrent un rôle de l'ANP



dans la réponse allergène de l'asthme et dans le dommage postischémique. Les effets de l'ANP ont surtout été mesurés avec le macrophage et les cellules dendritiques. L'ANP a un effet anti-inflammatoire puisqu'il réduit la production de cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-12, mais il augmente la production de l'interleukine-10 (Kiemer et al., 2000; Morita et al., 2003). Il inhiberait aussi l'activité des enzymes iNOS (Kiemer and Vollmar, 1998) et COX-2 (Kiemer et al., 2002) qui produisent des médiateurs proinflammatoires (Vollmar, 2005). L'ANP augmente de plus la migration des neutrophiles *in vitro* (Elferink and De Koster, 1995), et les souris n'exprimant pas le NPR-A ont une plus faible infiltration des neutrophiles dans le tissu cardiaque suite à un dommage au tissu. Ceci passe par une baisse de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Izumi et al., 2001). Une infiltration excessive des neutrophiles suite à une ischémie peut mener à un plus gros dommage tissulaire. Donc dans ces conditions on aurait avantage à bloquer la signalisation de l'ANP après ischémie. Les souris n'exprimant pas le NPR-A montrent aussi moins d'accumulation d'éosinophiles dans le poumon suite à une réaction allergique induite par l'ovalbumine (Mohapatra et al., 2004). L'ANP a donc possiblement un rôle à jouer dans l'asthme.

### **3.12 Le système CNP / NPR-B et la croissance osseuse**

Un effet physiologique maintenant évident concernant le CNP est son implication dans la stimulation de la croissance osseuse. Sa cible majeure semble être le chondrocyte. Il y a une dizaine d'années, un groupe de recherche a observé que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 stimule l'expression de CNP dans un modèle d'ostéoclaste de souris. Une élévation en GMPc a alors été corrélée avec une activité de résorption de l'ostéoclaste (Holliday et al., 1995). Un autre groupe a ensuite montré que le CNP fait augmenter les marqueurs de la différenciation dans l'ostéoblaste et fait augmenter la minéralisation des nodules sur les cellules cultivées (Hagiwara et al., 1996). Dans les chondrocytes, le CNP fait augmenter fortement le GMPc intracellulaire, et induit l'ossification endochondriale dans des cultures de tibia de souris (Hagiwara et al., 1994a; Yasoda et al., 1998). Confirmant ces résultats expérimentaux, des mutations inactivatrices dans les gènes codant pour le CNP (Chusho et al., 2001) ou pour le NPR-B (Tamura et al., 2004; Tsuji and Kunieda, 2005) induisent le nanisme. Au contraire, la

surexpression de CNP (Suda et al., 1998; Miyazawa et al., 2002; Yasoda et al., 2004) ou une diminution de sa clairance (Matsukawa et al., 1999; Jaubert et al., 1999) induisent une surcroissance osseuse. Les animaux transgéniques sont tout à fait normaux à la naissance, ce qui suggère que le système CNP / NPR-B intervient plus tard dans le développement. La délétion ciblée de la PKG II chez la souris ou des mutations inactivatrices de la PKG II chez le rat induisent aussi le nanisme (Pfeifer et al., 1996; Chikuda et al., 2004). Le substrat de la PKG II serait possiblement la protéine Sox9, un inhibiteur naturel de la différenciation des chondrocytes. En effet, l'expression de la PKG II inactive Sox9 par une translocation du noyau vers le cytoplasme (Chikuda et al., 2004).

Chez l'humain, une forme rare de nanisme a été liée récemment à des mutations inactivatrices dans le gène codant pour le NPR-B (Bartels et al., 2004). La dysplasie acromésomélisme de type Maroteaux est une maladie autosomale récessive qui a une prévalence d'environ 1 / 1000000. Cependant les gens hétérozygotes sont aussi plus petits sans toutefois souffrir de nanisme. L'effet de ces mutations sur la population en général est donc significatif. La forme la plus courante de nanisme est l'achondroplasie, qui se caractérise par des mutations dominantes dans le gène codant pour le récepteur du FGF3. Ceci produit une activation constitutive FGF3-dépendante de STAT-1 et de la voie MAPK dans le chondrocyte (Ornitz, 2005). Il est intéressant de constater que les souris n'exprimant pas le récepteur au FGF3 montrent une surcroissance osseuse, exactement comme les souris ayant une surexpression de CNP (Colvin et al., 1996). De plus, lorsque la surexpression de CNP est appliquée aux souris ayant le récepteur au FGF3 constitutivement actif, il y a un renversement partiel du phénotype de nanisme (Yasoda et al., 2004). Chez ces souris, l'activité de la voie MAPK est réduite, mais pas celle de la voie STAT-1, ce qui explique peut-être l'effet partiel du CNP (Yasoda et al., 2004).

## **CHAPITRE 4 : Applications thérapeutiques des peptides natriurétiques**

L'ANP et le BNP ont été les premiers peptides natriurétiques identifiés et leurs effets cardioprotecteurs ont rapidement suggéré un potentiel intéressant dans le traitement de l'ICC, de l'hypertension, et de l'insuffisance rénale. L'infusion d'ANP synthétique, appelé aussi anaritide ou carperitide, chez des patients avec hypertension ou insuffisance cardiaque chronique a produit des effets similaires à ceux des diurétiques, soit une natriurèse, une diurèse, et une baisse de la pression sanguine (Weder et al., 1987;Fifer et al., 1990). Le traitement avec anaritide sur 2 jours est aussi bénéfique pour des patients atteints d'insuffisance aiguë (Kitashiro et al., 1999). L'effet d'anaritide est moins évident pour des patients avec insuffisance rénale sévère puisque deux études ont rapporté des effets contradictoires (Potter et al., 2006).

Le BNP humain recombinant, appelé nésiritide ou natrecor en clinique, imite les effets du BNP *in vivo*. Il produit une vasorelaxation, la natriurèse, la diurèse, une baisse de l'endothéline et de l'aldostérone plasmatique chez les patients avec insuffisance cardiaque aiguë (Fonarow, 2003). Le BNP constitue donc un nouvel outil pour traiter l'insuffisance cardiaque (Boerrigter and Burnett, 2004). Le nésiritide va probablement supplanter l'usage de l'anaritide, puisque sa demie-vie est nettement plus longue. Cependant des études récentes montrent que le nésiritide pourrait provoquer une insuffisance rénale et une hausse de mortalité chez des patients avec insuffisance cardiaque (Sackner-Bernstein et al., 2005). L'usage du nésiritide est donc présentement contesté et des études sont en cours pour évaluer ses bénéfices et ses risques plus finement.

Le peptide BNP est aussi un outil diagnostique très utilisé. En effet, les niveaux de BNP dans le plasma correspondent bien avec une dysfonction du ventricule gauche, un indicateur de maladie cardiaque. Il est donc un bon marqueur diagnostique de l'insuffisance cardiaque. En clinique, les essais immunologiques pour mesurer les niveaux de BNP ou de proBNP, en urgence ou non, sont utilisés couramment (Richards et al., 2004). Les niveaux de BNP sont aussi mesurés après un infarctus ou une chirurgie cardiaque pour évaluer la fonction cardiaque et la capacité de récupération (Wazni et al., 2004;Makikallio et al., 2005).

Les effets du CNP sont moins bien connus que ceux de l'ANP ou du BNP, mais déjà certaines avenues thérapeutiques peuvent être envisagées. Par exemple, le CNP pourrait être utilisé dans le traitement du nanisme. L'activation du NPR-B pourrait ainsi stimuler l'expansion de la plaque de croissance osseuse, telle qu'observée dans les modèles de souris transgéniques surexprimant le CNP (Suda et al., 1998; Miyazawa et al., 2002). Une autre utilité du CNP serait d'accélérer la guérison des fractures osseuses. En effet, il a été observé que les os des rats n'exprimant pas la PKG II guérissent nettement moins rapidement que ceux d'animaux normaux (Chikuda et al., 2004). Finalement, le CNP, tout comme l'ANP ou le BNP, pourrait un jour servir comme agent bénéfique pour le système cardiovasculaire. Cette affirmation provient d'une étude récente qui a démontré que le CNP, chez la souris, peut prévenir le remodelage cardiaque observé après un infarctus (Soeki et al., 2005).

**DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES**  
**ARTICLES**

**CHAPITRE 5 : Reduced activity of the NPR-A  
kinase triggers dephosphorylation and homologous  
desensitization of the receptor**

Simon Joubert, Jean Labrecque, and André De Léan

Biochemistry (2001) 40 (37), 11096-11105.

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

## **Abstract**

NPR-A, the receptor for the atrial natriuretic peptide (ANP), is a 130-kDa protein presenting an extracellular ANP-binding domain, a single transmembrane domain, an intracellular regulatory kinase homology domain (KHD), and a guanylyl cyclase catalytic domain. Upon stimulation, NPR-A receptors are activated to produce cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and are subsequently desensitized through dephosphorylation of residues at their KHD. We used wild-type rat (r) NPR-A (WT) and a disulfide-bridged mutant (C423S) expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells to study receptor phosphorylation. We have previously characterized the C423S receptor as constitutively active and desensitized. At basal state,  $^{32}\text{P}$  incorporation in the rNPR-AC423S covalent dimer is about 24 times less efficient than incorporation in the WT rNPR-A. When membranes from WT and rNPR-AC423S are incubated with [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\gamma\text{S}$ , the mutant dimer receptor displays 3.5% of the thiophosphate incorporation found for WT rNPR-A. Since the rNPR-AC423S dimer is already extensively dephosphorylated, we then used the WT rNPR-A to study dephosphorylation. As previously documented, adding ANP globally induces time-dependent dephosphorylation of the receptor. However, in pulse-chase experiments with the WT rNPR-A, adding ANP during the chase does not lead to a significant effect on receptor dephosphorylation. On the other hand, thiophosphorylation of the WT rNPR-A previously desensitized with ANP is reduced to 8.3% of the incorporation for untreated receptor, similar to results found with the rNPR-AC423S at basal state. These results demonstrate that ANP-induced rNPR-A desensitization is modulated by a significant reduction in the activity or affinity of the rNPR-A kinase that contributes to the low phosphorylation level after induction. Moreover, we further document a close relationship between tight dimerization, dephosphorylation, and desensitization.



Abbreviations: NPR-A, natriuretic peptide receptor type A; rANP, rat atrial natriuretic peptide-(1-28); KHD, kinase homology domain; HEK, human embryonic kidney; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; ATP $\gamma$ S, adenosine 5'-O-(thiotriphosphate); DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; GR, glucocorticoid receptor; CDKs, cyclin-dependent protein kinases; JNK, c-Jun N-terminal kinase; PSTKs, protein serine/threonine kinases; PSTPs, protein serine/threonine phosphatases.

## **Introduction**

Guanylyl cyclase receptors exist in both soluble and membrane forms in many tissues (1-3). In mammals, eight different forms have been described, but half of these are orphan receptors (4). Three of the remaining four forms are membrane-bound receptors for known ligands (4). Cell surface guanylyl cyclase receptors are a unique family of receptors that mediate distinct functions and are also highly conserved among different species. Only two of them, NPR-A and NPR-B, have endogenous catalytic activity that produces a second messenger, cGMP (5, 6), in response to binding of different natriuretic peptides (ANP, BNP, CNP). The other form, the NPR-C dimer, acts as a natriuretic peptides scavenger (7, 8). Interactions between the signal transduction pathways of the NPRs and the G protein-coupled receptors have recently been found. Interestingly, the NPR-C pathway has been shown to inhibit the adenylyl cyclase/cAMP signal transduction system (9, 10), and the NPR-A pathway is possibly implicated in inhibition of G-protein activation (11).

The guanylyl cyclase receptor type A, or natriuretic peptide receptor A (NPR-A), is known for modulating vasodilation, natriuresis, and diuresis and acts as counterbalance to the renin-angiotensin-aldosterone system (12-14). Following the extracellular domain (ECD) of this receptor are the single transmembrane domain, the kinase homology regulatory domain (KHD), and the catalytic guanylyl cyclase domain (GC), which responds to ANP (atrial natriuretic peptide) binding to ECD by producing cyclic GMP (15). The ligand to receptor binding stoichiometry is still controversial, but the preformed NPR-A dimer is thought to be activated by an agonist-induced tight dimerization (16-18). At basal state, the KHD is phosphorylated on four serine and two threonine residues (19). This domain also requires ATP binding for the receptor to display maximal catalytic activity (20-22). Like many cell surface receptors, endogenous or exogenous overstimulation of NPR-A leads to a desensitization of the receptor (23, 24). For NPR-A, this process is mediated by the dephosphorylation of the KHD (25, 26). Maintenance of heart failure and hypertension are possibly consequences of the shutdown by desensitization. Recent studies showed an autocrine action of the endogenous ligand ANP on the atrium, and this affected the heart hypertrophy

mechanisms in hypertension pathology (27-29). Genetic alterations of the N-terminal ANP binding domain of human NPR-A or NPR-A knockout in mice have also been correlated with hypertension and cardiac hypertrophy (30, 31).

Although some pathways affected by the rise in cGMP and leading to physiological response are known, the pathways directly acting on NPR-A desensitization are still unknown. In turn, cGMP modulates signaling cascades through close downstream effectors, namely, cGMP-dependent protein kinases (PKGs), cyclic nucleotide-gated ion channels (CNG channels), and cGMP-regulated phosphodiesterases (32). In the vascular system, natriuretic peptides produce vasodilation through increases in intracellular cGMP. Many effectors have been found to be controlled by the cGMP/PKG system. These effectors are the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels, the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane and of the sarcoplasmic reticulum membrane (associated with phospholamban), the  $\text{IP}_3$  receptor, and myosin light-chain phosphatase (32). None of those effector pathways has been shown to modulate NPR-A desensitization by short-term feedback inhibition. Thus, the presence of a cGMP-independent pathway closely associated with the KHD domain of the NPR-A is not excluded. However, ANP autoregulates the NPR-A level through suppression of receptor gene expression and receptor synthesis. This long-term suppression is suspected to act through a cGMP-dependent element located upstream from the gene's transcription starting point (33).

Studies on NPR-A or NPR-B  $^{32}\text{PO}_4$  content and guanylyl cyclase activity after ANP treatment showed that the decrease in activity accompanied decreased  $^{32}\text{P}$  content in a time-dependent fashion (25, 34). These results echoed similar findings with sea urchin guanylyl cyclase, which had indicated time- and agonist-dependent loss of 15 phosphates/mol of protein resulting in desensitization and a dramatic 10 kDa gel shift (35). The experiments with the NPRs looked at the overall desensitization process without detailing the molecular mechanisms involved in receptor dephosphorylation. Not much is known about the protein kinases and protein phosphatases acting on the phosphorylation state of the NPR-A. When individual protein kinases (PKA, PKC, PKG) were added to the purified NPR-A *in vitro*, each enzyme was able to phosphorylate the receptor equally (36). Also, treatment of whole cells with phorbol esters, known to activate PKCs, leads

to the dephosphorylation of one residue on the NPR-A (37). Regarding the phosphatase that dephosphorylates the NPR-A, evidence for an association with protein phosphatase 5 (PP5) has been shown (38), and a recent investigation showed that this association is mediated by the formation of a multiprotein complex with HSP 90 and p50cdc37 (39).

We previously described a NPR-AC423S mutant receptor that is a disulfide-bridged covalent dimer (17). This mutant displayed high-affinity binding to natriuretic peptides, was responsive to ATP, and showed constitutive activation and desensitization (17). The term "constitutive activation and desensitization" means that the receptor has high basal activity but is unresponsive to agonist. These observations suggested a maintained receptor conformation possibly similar to the desensitized form of the WT NPR-A. The desensitization observed also suggested a dephosphorylation of the mutant NPR-A at basal state. Since we did not have to add agonist to the C423S receptor to obtain a desensitized receptor, we used this mutant at first to investigate phosphorylation events. Thus, studies were undertaken to determine the phosphorylation state of the NPR-AC423S and its phosphorylation/dephosphorylation kinetics compared to those of wild-type receptor. Here, we show that the dimerization event following the C423S mutation is the event that triggers dephosphorylation and constitutive activity of the NPR-AC423S. Also, the NPR-A-phosphorylating kinase has markedly reduced activity for the NPR-AC423S desensitized form and for the ANP-treated WT receptor, whereas the NPR-A-dephosphorylating phosphatase has no significantly increased activity for the ANP-activated WT receptor. Thus, the unidentified KHD-phosphorylating kinase represents a short-term regulator of NPR-A desensitization.

## **Experimental Procedures**

### **Cell Culture**

The NPR-AC423S mutant (previously described; 17) and the wild-type receptor were stably expressed in HEK 293 cells (17). The cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units of penicillin/streptomycin, and 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G-418 (Geneticin, Boehringer Mannheim), in a 5%  $\text{CO}_2$  and 37  $^\circ\text{C}$  incubator. Geneticin was removed one step before any experiment with the cells.

### **Membrane Preparations**

Stable cell lines expressing WT and C423S NPR-A receptors were rinsed with phosphate-buffered saline and scraped in ice-cold homogenization buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 20% glycerol, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , and 10 mM NaF containing  $10^{-5}$  M Pefabloc,  $10^{-6}$  M leupeptin,  $10^{-6}$  M pepstatin, and  $10^{-7}$  M aprotinin). Cells were homogenized with a Polytron homogenizer and centrifuged 30 min at 30500g in a Sorvall SS-34 rotor. The pellet was resuspended in 2 mL total volume of the same buffer and homogenized again by aspiration through a needle. Finally, membranes were aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80  $^\circ\text{C}$ . The protein concentration was determined by use of the BCA protein assay kit (Pierce) and ranged from 800 to 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Western blotting, Immunodetection, and Immunoprecipitation**

Membrane proteins were separated on SDS-containing 5% or 7.5% polyacrylamide gels under nonreducing or reducing conditions (5%  $\beta$ -mercaptoethanol) and transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot, 0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad) by use of the mini or full-size Trans-Blot transfer system (Bio-Rad). Detection of NPR-A was achieved with an affinity chromatography-purified rabbit polyclonal antiserum raised against the sequence YGERGSSTRG that is the sequence of the C-terminal portion of human NPR-A. Specific signal was detected with a horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit polyclonal antibody according to the ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech). Immunoprecipitation was carried out by addition of the anti-NPR-A antibody to the receptor solubilized in solubilization buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10%

glycerol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, and protease inhibitors) to get 2% final antibody concentration. Incubation was pursued 18 h at 4 °C, and a 2-fold volume excess of protein A-Sepharose CL-4B gel (Amersham Pharmacia Biotech) prewashed in solubilization buffer was added and incubated with agitation by rotation 4 h at 4 °C. The gel was washed 5-7 times by centrifugation with 10 volumes of solubilization buffer and once with solubilization buffer without detergent. The gel was then eluted with hot sample buffer (0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, and 0.0025% bromophenol blue), and the eluate was loaded on SDS-PAGE. In cases where whole cells were the starting material, a preclearing was accomplished by addition of normal rabbit serum and the protein A-Sepharose to the solubilized membrane preparation, as mentioned, and the supernatant was submitted to specific immunoprecipitation. In the case of SDS-PAGE separation under nonreducing conditions, 6 M urea was added in both the gel and sample buffer, and 20 mM iodoacetamide was added to homogenization buffer in order to avoid cysteine shuffling of the mutant monomer receptor (see Figures 1, 2, and 5B).

### **ANP-Induced Dephosphorylation Experiment**

This experiment was based on the protocol of Potter et al. (25). Briefly, duplicate plates of HEK 293 cells expressing WT NPR-A were incubated 4 h in DMEM without sodium phosphate containing 1 mCi/mL [<sup>32</sup>P]orthophosphate. After the addition of 1 μM ANP for the periods of time indicated, cells were solubilized with solubilization buffer containing 0.2 μM okadaic acid and receptor was purified by immunoprecipitation as described above. Proteins were then submitted to SDS-PAGE and the <sup>32</sup>P signal associated with the NPR-A in the dried gel was visualized with a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### **<sup>32</sup>P Incorporation and Pulse-Chase Experiments**

Approximately  $5 \times 10^5$  cells expressing WT or C423S rNPR-A were plated in 3 mL of DMEM onto 3.5 × 1.0 cm wells in Linbro multiwell plates. After 24 h, cells were washed with 3 mL of the same medium without sodium phosphate and incubated 4 h in 1 mL of DMEM without sodium phosphate containing 0.5-1.0 mCi of [<sup>32</sup>P]orthophosphate (Amersham Pharmacia Biotech). The excess radioactivity was removed, and the cells were washed with 3 mL of DMEM and

radioactivity was removed, and the cells were washed with 3 mL of DMEM and then incubated in 3 mL of DMEM for different times. The medium was removed, and the cells were washed with 3 mL of ice-cold phosphate-buffered saline and solubilized twice with 0.5 mL of cold solubilization buffer containing 0.2  $\mu\text{M}$  okadaic acid. For maximal incorporation determination or in the case of a simple  $^{32}\text{P}$  incorporation study, labeled cells were washed and homogenized after the 4 h incorporation period. In all experiments, two wells were used in parallel in Western blot analysis to evaluate receptor quantity between the cell types or samples.

### **[ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\gamma\text{S}$ Incorporation Studies**

Each membrane preparation (WT and C423S) was diluted in incubation buffer (25 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM NaF, and protease inhibitors) to obtain a final concentration of 100 ng/ $\mu\text{L}$  in eppendorf tubes containing 0.2  $\mu\text{M}$  okadaic acid final. [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\gamma\text{S}$  (specific activity > 1000 Ci/mmol) was added to have an activity of 20 nCi/ $\mu\text{L}$  in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . Nonspecific incorporation was determined by addition of 10 $^{-4}$  M ATP $\gamma\text{S}$ . Tubes were placed on ice, and then membranes were added to the mixture and incubated at 37°C for different times. To end the incorporation, tubes were placed on ice and 1 mL of ice-cold stop buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2  $\mu\text{M}$  okadaic acid, and protease inhibitors) was added to each tube. Tubes were centrifuged at 4°C for 30 min at 12000g, and the pellets were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of solubilization buffer. The receptor was purified by immunoprecipitation and SDS-PAGE as described previously, and radioactivity was measured in a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### **Statistical Analysis**

Comparison of treatment groups was done by unpaired Student's t tests. In the case of time course of dephosphorylation, curves for control and ANP treatment groups were first analyzed by nonlinear regression according to a sum of two (fast and slow) exponential components by use of the MS Excel function solver. Comparison of control and treatment curves was then performed by stepwise

## **Results**

### **WT and NPR-AC423S Receptors Detection by Western Blot Analysis**

As previously shown, NPR-AC423S is a disulfide-bridged covalent dimer (17). Membrane preparations from HEK 293 cells expressing wild-type NPR-A and NPR-AC423S were loaded on SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions. As shown in Figure 1A, the migration under reducing conditions (left panel) points to a 130 kDa band corresponding to the molecular weight of the WT rNPR-A. When cleavage of the disulfide bridge is avoided by removal of the reducing agent  $\beta$ -mercaptoethanol, the migration of the C423S mutant indicates a molecular weight of about 260 kDa, consistent with the presence of a rNPR-A dimer (Figure 1A, right panel). It is noteworthy that a 130 kDa band remains and accounts for about 10-15% of the total signal as determined by densitometry. The signal for the monomer varied depending on the experiment but always remained between 10% and 20% of the total immunodetection signal. In Figure 1B, qualitative dephosphorylation was investigated by gel shift in Western blot analysis. A gradual shift in molecular weight, consistent with dephosphorylation, can be observed, independent of receptor amount. The receptors, ranked by weight, are found in the following order: NPR-AC423S < ANP-activated NPR-A < NPR-A. Thus the NPR-AC423S appears to be more dephosphorylated than ANP-treated WT NPR-A. However, we cannot exclude that part of the shift seen for the NPR-AC423S may be the consequence of a slight change in receptor conformation induced by the mutation.

Thus, the disulfide-bridged rNPR-A formed by the C423S mutation revealed itself as a good system to study the desensitization process. Also, as already reported, we reproducibly found that NPR-A does not spontaneously form covalent higher-ordered receptor oligomers. This allows for a direct comparison between the inactive monomeric state and the NPR-AC423S covalent dimer, the latter presumably corresponding to the activated form of the receptor. On the other hand, because we could not conclude that the gradual shift observed in Western blot analysis was generated only by dephosphorylation, we sought to determine



the phosphorylation state of each receptor form and the phosphorylation/dephosphorylation kinetics leading to each state.

### **NPR-AC423S Is Dephosphorylated at Basal State in Whole Cells**

NPR-AC423S was previously shown to be a desensitized receptor, approximately 37-fold less activated by maximal treatment with ANP than the WT receptor (17). Since dephosphorylation has been shown to be the modulating event of desensitization (25, 26), we investigated the phosphorylation state of NPR-AC423S. Figure 2 represents the  $^{32}\text{P}$  content of both WT and C423S receptors at basal state, as purified on SDS-PAGE. Under reducing conditions (upper panel), WT NPR-A has approximately 9.5 times the  $^{32}\text{P}$  content of the NPR-AC423S. But under these reducing conditions, results were suspected to be biased. In fact, as shown by Western blot analysis, the NPR-AC423S heterogeneous population of receptors is composed of monomer and dimer. Hence, the possibility remained that these two components were distinct maturation products, each possibly having a distinct phosphorylation state. In turn, the same  $^{32}\text{P}$  incorporation studies were repeated with NPR-AC423S but under nonreducing conditions. As shown in Figure 2 (lower panel), most of the radioactive signal is found for the band representing the NPR-AC423S monomer, even though this form is present in smaller amount than the dimer form as indicated by Western blot analysis. Thus, the  $^{32}\text{P}$  radioactivity signal values were corrected for receptor quantities (Table 1). The corresponding value for WT receptor was based on the fact that the sum of the radioactive signals of NPR-AC423S is approximately 9.5 times less than WT NPR-A as evaluated before. In turn, the WT NPR-A/NPR-AC423S dimer signal ratio gives a value of  $\sim 24$ , indicating a large decrease in  $^{32}\text{P}$  content for the mutant C423S dimer. On the other hand, the WT NPR-A/NPR-AC423S monomer signal ratio is around 1.4, indicating a similarity in  $^{32}\text{P}$  content between the monomer form of the mutant and the WT NPR-A. These data show a drastic reduction in  $^{32}\text{P}$  content when the mutant receptor is found in dimeric form, showing a close relationship between dimerization and the phosphorylation state.

### **Inhibition of rNPR-A Phosphorylation by Amiloride**

To segregate the dephosphorylation process associated with the WT rNPR-A receptor, we initiated pulse-chase experiments. These experiments are useful for proteins that are phosphorylated at basal state and for which there is a constant

phosphate turnover. The C423S mutant is extensively dephosphorylated at basal state. In turn, use of the WT receptor was necessary in such studies on dephosphorylation. The pulse-chase experiment was validated with the use of the diuretic drug amiloride. This molecule is known to be a nonspecific protein kinase inhibitor, acting as an ATP analogue ( $K_i = 350 \mu\text{M}$ ) (40). It acts on intact cell systems and is 3-fold concentrated intracellularly (40). On the other hand, it has no effect on protein phosphatases (40). Also, it has been shown to increase the number of high-affinity binding sites on the NPR-A and to inhibit the hormone-dependent cyclase activity of NPR-A (22, 41). We used amiloride to investigate its effect on NPR-A phosphorylation and to show that this experiment efficaciously isolates the activity of the NPR-A phosphatase. Thus, we labeled HEK 293 cells expressing WT rNPR-A with  $^{32}\text{P}$  for 4 h (pulse), and after that period of time, the radioactive medium was replaced with regular medium (chase) for 1 h (see Experimental Procedures). In some pulse-chase experiments 1 mM amiloride was added either during the chase (1 h), to assess the efficiency of the chase step in blocking further  $^{32}\text{P}$  incorporation, or during both the pulse and the chase, to test the ability of amiloride to inhibit protein kinases. As shown in Figure 3, the 1 h chase period led to a 35% reduction in  $^{32}\text{P}$  content of the receptor. Adding amiloride during the chase did not significantly reduce WT rNPR-A  $^{32}\text{P}$  content beyond the level obtained in the sample containing regular medium only. However, the presence of amiloride during both the pulse and the chase led to an 80% reduction in NPR-A  $^{32}\text{P}$  content. This shows that amiloride inhibits the NPR-A-phosphorylating enzyme activity and that protein kinases have no impact on the NPR-A  $^{32}\text{P}$  content during the chase period.

### **ANP-Induced NPR-A Dephosphorylation Is Not Mediated by an Increase in the Activity of the NPR-A Phosphatase**

First, as a control, we needed to show the global effect of ANP on receptor phosphorylation at basal state. The time-dependent effect of adding 1  $\mu\text{M}$  ANP to  $^{32}\text{P}$ -labeled HEK 293 cells expressing WT rNPR-A is shown in Figure 4A. The  $^{32}\text{P}$  content is reduced by ~40% after 1 h and by ~60% after 2 h. These results are consistent with those of Potter et al. (25), showing ANP-induced dephosphorylation of NPR-A. Second, to investigate the effect of ANP specifically on the NPR-A phosphatase, we repeated pulse-chase studies with the addition of 1  $\mu\text{M}$  ANP during the chase for different times. Chase with phosphate-

dephosphorylation of NPR-A. Second, to investigate the effect of ANP specifically on the NPR-A phosphatase, we repeated pulse-chase studies with the addition of 1  $\mu$ M ANP during the chase for different times. Chase with phosphate-replete medium efficiently stops de novo  $^{32}\text{P}$  incorporation into NPR-A. Figure 4B shows the effect of rANP on the time-dependent decrease in  $^{32}\text{P}$  content of WT rNPR-A during chase. Addition of rANP slightly but nonsignificantly ( $F = 1.1$ , NS) alters the kinetics of dephosphorylation of the receptor. Thus, ANP produces no significant effect on receptor-dephosphorylating protein phosphatase activity. Therefore, the inducing effect of ANP on NPR-A dephosphorylation shown in Figure 4A must be due to reduced activity or affinity of the NPR-A kinase, since ANP has no effect on the activity or affinity of the NPR-A phosphatase (Figure 4B). We then proceeded to directly document the effect of ANP on NPR-A phosphorylation under conditions where receptor dephosphorylation is prevented.

### **NPR-A Kinase Is Unable To Phosphorylate the NPR-AC423S Dimer *in Vitro***

The rNPR-AC423S was first used as a substrate for the receptor-phosphorylating protein kinase, because this mutant was permanently desensitized and because investigating this mutant's phosphorylation kinetics could lead to information on WT receptor mechanistic events. To isolate the receptor-phosphorylating protein kinase activity, we used [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\gamma$ S as a substrate for the receptor-phosphorylating kinase. In fact, protein kinases are unable to discriminate between this substrate and regular ATP. However, thiophosphates are poor substrates for protein phosphatases. Thiophosphorylation is thus partially protected against dephosphorylation. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, was also added to further reduce protein phosphatase activity (42). Figure 5A represents the time-dependent arbitrary units of thiophosphorylation of each receptor form under reducing conditions. Again each signal was corrected for receptor number as determined by Western blot analysis. The mutant receptor has a blunted signal compared to WT rNPR-A, overall representing  $19.3\% \pm 6.6\%$  of the signal for WT receptor (Table 2). Under nonreducing conditions (Figure 5B), the NPR-AC423S dimeric form shows an even more decreased incorporation representing  $3.5\% \pm 3.5\%$  (Table 2) of the thiophosphorylation signal of the WT NPR-A after 30-60 min (some experiments showed no significant signal). This implies that the mutant receptor dimeric form, although possessing potential

phosphorylation sites, is inaccessible to the receptor-phosphorylating protein kinase. Yet, the rNPR-AC423S monomeric form has a phosphorylation profile similar to that of WT rNPR-A (Figure 5B). It represents  $93.4\% \pm 6.6\%$  (Table 2) of the WT receptor thiophosphorylation in the same time range. It seems that the mutant receptor's transition from monomer to covalent dimer changed the activity of the kinase for the KHD domain, presumably through a dimerization-induced conformational change of this domain. Also, a close regulation of the guanylyl cyclase domain by the KHD has been documented (43, 44). Hence, it seems unlikely that the phosphorylated form of the rNPR-AC423S (monomer) has the same guanylyl cyclase activity patterns as the dephosphorylated form (dimer). This could explain why we measured a 1.4-fold induction for the C423S mutant in guanylyl cyclase experiments (17); i.e., the residual monomer is not desensitized.

### **rANP-Desensitized rNPR-A Is Not Phosphorylated by the NPR-A Kinase**

The results of both the pulse-chase experiments and the rNPR-AC423S thiophosphate incorporation studies indirectly proved that the desensitization process is mainly due to blunting of the NPR-A-phosphorylating kinase activity, with minimal changes in phosphatase activity. The objective was now to show it directly by studying the phosphorylation of the native receptor. Thus, we repeated [<sup>35</sup>S]ATP $\gamma$ S incorporation studies, using membrane preparations of WT receptor desensitized with ANP. The membrane preparations were done with HEK 293 cells expressing WT rNPR-A that had been treated or not with 1  $\mu$ M rANP for 1 h. Our hypothesis is that the KHD domain of the covalent dimeric form of the C423S mutant has a conformation very similar to the KHD domain of the WT desensitized receptor. Thus, we suspect that the agonist-desensitized WT receptor will have a blunted thiophosphate incorporation profile compared to untreated WT receptor. Figure 6 shows the time-dependent arbitrary units of thiophosphorylation for WT rNPR-A treated or not with rANP. Okadaic acid was again added to the assay to inhibit protein phosphatase activity. The ANP-desensitized receptor incorporates less thiophosphates than the WT receptor at all times measured. The activated NPR-A has  $8.3\% \pm 4.6\%$  of the thiophosphate signal found for inactivated NPR-A after 30 min, a value comparable ( $t = 1.3$ , NS) to the reduction found for the dimeric NPR-AC423S ( $3.4\% \pm 3.2\%$ ). Also, in Figure 6, there seems to be a time-dependent significant reduction in

It is noteworthy that attempts to observe differences in thiophosphate content when ANP was added *in vitro* to membrane preparations of WT NPR-A were unsuccessful, suggesting that the complete molecular machinery necessary for initiating NPR-A desensitization is altered with cell breakage (data not shown).

## **Discussion**

In this work, we have shown that the C423S mutation leads to a disulfide-bridged dephosphorylated receptor, already known to be unresponsive to ANP (17). This receptor dimer displays a significantly blunted capacity to be thiophosphorylated in membrane preparations. On the other hand, a residual noncovalently bound form of this mutant has thiophosphate and  $^{32}\text{P}$  content similar to that of WT rNPR-A. The diuretic drug amiloride was found to efficiently inhibit the NPR-A kinase. We also studied the effect of excess ANP on WT receptor dephosphorylation in whole cells, and found this effect to be nonsignificant after 2 h ( $F = 1.1$ , NS). Moreover, WT receptor desensitized with ANP has reduced thiophosphorylation compared with untreated receptor. The incorporation seen in the WT is not significantly different from what is found for the covalent dimeric C423S mutant ( $t = 1.3$ , NS). This further demonstrates that the KHD conformation in the dimeric rNPR-AC423S mimics the conformation of this domain in the agonist-stimulated rNPR-A. Overall, this shows that receptor desensitization by dephosphorylation is carried out by abrogated kinase activity and relatively maintained phosphatase activity. This might be due to an inhibition of the protein kinase involved or to reduction in the accessibility of the kinase to the NPR-A receptor. Moreover, this process seems to be associated with receptor dimerization.

Studies from Potter and Hunter (19, 45) previously reported direct evidence supporting NPR-A desensitization by dephosphorylation. Mutation of all the normally phosphorylated serine and/or threonine residues (S497, T500, S502, S506, S510, and T513) to alanine, except T513, abolished the hormone-dependent guanylyl cyclase activity of NPR-A. Also, mutation of all known phosphorylation sites to glutamate yielded a receptor still 4 times less active than the normal NPR-A. They concluded the presence of an unknown dephosphorylation-independent process, although they did not investigate the binding affinities of their mutant receptors for ANP. Furthermore, suggestion was made that activation of the NPR-A-phosphorylating protein phosphatase might mediate dephosphorylation. This was based on results showing a protective effect of the phosphatase inhibitor microcystin on the guanylyl cyclase activity of the WT rNPR-A in membrane preparations. Nevertheless, phosphorylation and dephosphorylation are dynamic

events in whole cells. It remains possible that the receptor-associated kinase shows a bigger drop in activity for the activated receptor than the increase in phosphatase-related activity, as shown in the present study.

Besides membrane guanylyl cyclases, very few examples of signal transduction interruption mechanisms by protein dephosphorylation of Ser/Thr residues have been described. The only receptor with similar regulation is the nuclear glucocorticoid receptor (GR). All steroid hormone receptors are phosphorylated and go through hormone-induced hyperphosphorylation of three to eight serines in the N-terminal domain (46). Hyperphosphorylation is specific for glucocorticoid agonists and is due to accelerated phosphorylation (47). With GRs (eight suspected phosphorylation sites), alanine mutants are up to 75% less active in hormone-induced transactivation (47). Moreover, Zuo et al. (48) found that Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is closely associated with the GR. In fact, PP5 activation leads to inhibition of p21WAF1/Cip1 transcription, mediated by dephosphorylation of GR and p53 transcription activators. In turn, p21WAF1/Cip1, a general cyclin-dependent protein kinase (CDKs) inhibitor, cannot repress these cell growth mediators, and cell growth ensues. The GR-associated kinase has not been identified, but *in vitro* studies point to CDK kinases and MAPK kinases (49). This system differs from the NPR-A dephosphorylation system in the activation sequence. Both receptors are phosphorylated at basal state, but GR probably undergoes conformational change due to ligand binding, which permits phosphorylation, and thus activation, by an associated protein kinase. In turn it possibly possesses a broader "dephosphorylation range" compared to rNPR-A. Indeed, as suggested in the literature, steroid hormone receptor phosphorylation serves not as an on-off switch but modulates function more subtly.

Another example is the c-Jun/JNK complex. The regulation of c-Jun by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) modulates apoptosis, cell cycle arrest, and DNA repair processes (50-52). c-Jun is regulated via heterodimerization with Fos or through phosphorylation of clusters of Ser/Thr residues in the C- or N-terminus that either inhibit DNA binding or activate transcriptional activity, respectively (53). Phosphorylation of Ser63/Ser73 by JNK enhances transcriptional activity and stability by activating the p300/CBP coactivator recruitment (54, 55). May et al.

(56) described the interaction of the c-Jun/JNK complex. Their results suggest that JNK can be tethered to c-Jun through multiple interacting regions ( $\delta$  docking site, P-Q region, and bZIP domain) and, upon activation, can induce c-Jun phosphorylation without need of dissociation from the substrate. No c-Jun-associated phosphatase has been identified so far, but evidence for the activation of JNK by phosphorylation and the presence of a JNK-inactivating phosphatase activated by Hsp72 has been found (57). In this case, regulation seems to stem more from three-dimensional interactions than regulation by phosphorylation. This modulation may be important in rNPR-A, since enzyme activity experiments have shown that the elements required for sensitization and desensitization of rNPR-A likely reside in the membrane itself (42), and because phosphorylation of rNPR-A is suspected to be an "all or nothing" event (19).

Specificity of phosphorylation/dephosphorylation events is often achieved through subcellular targeting of distinct modules of kinase or phosphatase toward substrates at specific subcellular locations (58-60). Based solely on general substrate specificity, no assumptions can be made as to which enzyme could be responsible for NPR-A desensitization, since both types of enzyme families have been described as potentially highly specific *in vivo* (58, 59). Ser/Thr kinases (PSTKs) and phosphatases (PSTPs) differ in the means of creating structural and functional diversity. Compared to kinases, the structural complexity of PSTPs *in vivo* is created as a result of a combination of associated regulatory domains and subunits (58, 59). In turn, care should be taken in the interpretation of results of dephosphorylation processes following cell disruption, since accessory subunits may be released or bound with cell breakage.

Recently, Huo et al. (61) investigated the double mutant NPR-AC423S,C432S. These mutations eliminate the first intramolecular disulfide bridge aside of the membrane in the extracellular domain. In consequence, no covalent interchain link can be made in this receptor. The authors found that this mutant also displays constitutive activity and concluded that the constitutive activity we found for our NPR-AC423S mutant was not linked to the dimerization process but rather to mutation-induced alteration of the receptor structure. These interesting results bring other possibilities. It remains possible that the C432S mutation alone creates this phenotype. Also, our hypothesis is that dimerization is the activation inducer.



Obviously, this process does not need to be a covalent dimerization. Namely, any event or mutation that will bring two ectodomains together will, if correctly oriented, have a chance to activate the receptor. We gathered strong evidence showing that one of the intrinsic receptor structures that seems to be required in order to block this event in absence of agonist is the extracellular juxtamembrane region (18). It is likely that completely removing this structure, as was done with NPR-AC423S,C432S, creates a receptor that can noncovalently dimerize in the absence of agonist in whole cells and demonstrate constitutive activity. We must specify that the terms monomer and dimer are used to discriminate noncovalently linked NPR-AC423S from the disulfide-bridged dimer. Noncovalent dimerization of the monomeric NPR-AC423S is not excluded, consistent with a model of loose or tight conformations (17, 18).

Furthermore, in the current study, we investigated the phosphorylation state of our NPR-AC423S mutant. We found that the receptor population generated by this mutation is heterogeneous. As explained earlier, 10-15% of NPR-A mutant stays in a WT receptor phosphorylation-like monomeric form, while 85-90% is dimeric and dephosphorylated. The minor form may have been generated if two monomers of mutated receptor failed to interact during the maturation process. As mentioned, the dimeric species showed characteristics inherent to the activated form of regular rNPR-A, namely, ATP modulation and dephosphorylation. The phosphorylated state of the residual monomeric rNPR-AC423S suggests an inactive form in the absence of agonist. In turn, the overall 1.4-fold activation by ANP, seen in our previous study in whole-cell guanylyl cyclase stimulation of mutant rNPR-AC423S (17), might be due to the presence of this residual monomer. Thus, the sole C423S mutation does not create as such a constitutively active receptor. Dimerization during the maturation process is the event that triggers this phenotype.

The reasons for the constitutive activity of the NPR-AC423S dimeric form are still unknown, but dephosphorylation of the KHD with tight dimerization is consistent with desensitization. It is possible that the C423S mutation created a "frozen" receptor not flexible enough, in its dimeric state, to enter the next step of rNPR-A desensitization, namely, the guanylyl cyclase activity shutdown. Nevertheless, we show that treatment of WT rNPR-A with ANP creates a strong

drop in receptor-phosphorylating kinase activity, as is seen for the dimeric rNPR-AC423S. Also, the WT rNPR-A-dephosphorylating phosphatase seems to have unvarying activity toward the KHD in whole-cell experiments. No unique PSTK consensus sequence was identified for the clustered sites of the KHD. Thus, identification of the agonist-sensitive NPR-A-phosphorylating kinase and of processes regulating the enzyme is of great interest.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Mr. Normand McNicoll for helpful discussion and advice. This work was supported by Grants MT-13753 and MT-15165 from the Canadian Institutes for Health Research. Simon Joubert is recipient of a studentship from Université de Montréal. André De Léan is recipient of a Research Chair from Merck Frosst Canada.

## **References**

1. Yu, S., Avery, L., Baude, E., and Garbers, D. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3384-3387.
2. Liu, W., Yoon, J., Burg, M., Chen, L., and Pak, W. L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12418-12427.
3. Katafuchi, T., Takashima, A., Kashiwagi, M., Hagiwara, H., Takei, Y., and Hirose, S. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222, 835-842.
4. Garbers, D. L. (1999) *Methods* 19, 477-484.
5. Garbers, D. L. (1992) *Cell* 71, 1-4.
6. Murad, F., Leitman, D. C., Bennett, B. M., Molina, C., and Waldman, S. A. (1987) *Am. J. Med. Sci.* 294, 139-143.
7. Nussenzveig, D. R., Lewicki, J. A., and Maack, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20952-20958.
8. Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F. A., Nussenzveig, D., Scarborough, R. M., McEnroe, G. A., and Lewicki, J. A. (1987) *Science* 238, 675-678.
9. Anand-Srivastava, M. B., Sehl, P. D., and Lowe, D. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19324-19329.
10. Anand-Srivastava, M. B., Sairam, M. R., and Cantin, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8566-8572.
11. Pedram, A., Razandi, M., Kehrl, J., and Levin, E. R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 7365-7372.
12. Levin, E. R., Gardner, D. G., and Samson, W. K. (1998) *N. Engl. J. Med.* 339, 321-328.
13. Espiner, E. A., Richards, A. M., Yandle, T. G., and Nicholls, M. G. (1995) *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 24, 481-509.
14. Drewett, J. G., and Garbers, D. L. (1994) *Endocr. Rev.* 15, 135-162.
15. Garbers, D. L., and Lowe, D. G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30741-30744.
16. Wilson, E. M., and Chinkers, M. (1995) *Biochemistry* 34, 4696-4701.
17. Labrecque, J., McNicoll, N., Marquis, M., and De Léan, A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 9752-9759.
18. Labrecque, J., Deschênes, J., McNicoll, N., and De Léan, A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 8064-8072.
19. Potter, L. R., and Hunter, T. (1999) *Methods* 19, 506-520.

20. Larose, L., McNicoll, N., Ong, H., and De Léan, A. (1991) *Biochemistry* 30, 6990-6995.
21. Kurose, H., Inagami, T., and Ui, M. (1987) *FEBS Lett.* 219, 375-379.
22. Jewett, J. R., Koller, K. J., Goeddel, D. V., and Lowe, D. G. (1993) *EMBO J.* 12, 769-777.
23. Yasunari, K., Kohno, M., Murakawa, K., Yokokawa, K., Horio, T., and Takeda, T. (1992) *Hypertension* 19, 314-319.
24. Woods, M., and Houslay, M. D. (1991) *Biochem. Pharmacol.* 41, 385-394.
25. Potter, L. R., and Garbers, D. L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 14531-14534.
26. Koller, K. J., Lipari, M. T., and Goeddel, D. V. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 5997-6003.
27. Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., and Kangawa, K. (2000) *Hypertension* 35, 19-24.
28. Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L. F., and Colucci, W. S. (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 812-818.
29. Wu, C. F., Bishopric, N. H., and Pratt, R. E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14860-14866.
30. Nakayama, Y., Soma, M., Takahashi, Y., Rehemudula, D., Kanmatsuse, K., and Furuya, K. (2000) *Circ. Res.* 86, 841-845.
31. Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., Kim, H. S., Reddick, R. L., Pandey, K. N., Milgram, S. L., Smithies, O., and Maeda, N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14730-14735.
32. Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., and Waldman, S. A. (2000) *Pharmacol. Rev.* 52, 375-413.
33. Cao, L., Wu, J., and Gardner, D. G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24891-24897.
34. Potter, L. R. (1998) *Biochemistry* 37, 2422-2429.
35. Ramarao, C. S., and Garbers, D. L. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1524-1529.
36. Larose, L., Rondeau, J. J., Ong, H., and De Léan, A. (1992) *Mol. Cell. Biochem.* 115, 203-211.
37. Potter, L. R., and Garbers, D. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14636-14642.
38. Chinkers, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11075-11079.
39. Kumar, R., Grammatikakis, N., and Chinkers, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, Jan 4 [pub ahead of print].
40. Davis, R. J., and Czech, M. P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2543-2551.
41. De Lean, A. (1986) *Life Sci.* 39, 1109-1116.

42. Foster, D. C., and Garbers, D. L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16311-16318.
43. Chinkers, M., and Garbers, D. L. (1989) *Science* 245, 1392-1394.
44. Koller, K. J., De Sauvage, F. J., Lowe, D. G., and Goeddel, D. V. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12, 2581-2590.
45. Potter, L. R., and Hunter, T. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10, 1811-1820.
46. Weigel, N. L. (1996) *Biochem. J.* 319, 657-667.
47. Bodwell, J. E., Webster, J. C., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., Hu, J. M., and Munck, A. (1998) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 91-99.
48. Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J. G., Dean, N. M., McLean, T. K., Aragon, I., and Honkanen, R. E. (1999) *Biochemistry* 38, 8849-8857.
49. Pocuca, N., Ruzdijic, S., Demonacos, C., Kanazir, D., and Krstic-Demonacos, M. (1998) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 66, 303-318.
50. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., and Greenberg, M. E. (1995) *Science* 270, 1326-1331.
51. Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (1996) *Nature* 380, 75-79.
52. Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F, Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R., and Mercola, D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14041-14044.
53. Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
54. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., and Karin, M. (1991) *Nature* 354, 494-496.
55. Black, E. J., Catling, A. D., Woodgett, J. R., Kilbey, A., and Gillespie, D. A. (1994) *Oncogene* 9, 2363-2368.
56. May, G. H. W., Allen, K. E., Clark, W., Funk, M., and Gillespie, D. A. F. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33429-33435.
57. Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Gabai, V. L., Zon, L., Ganiatsas, S., Mosser, D. D., Zon, L., and Sherman, M. Y. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 2547-2555.
58. Sim, A. T. R., and Scott, J. D. (1999) *Cell Calcium* 26, 209-217.
59. Barford, D. (1996) *Trends Biochem. Sci.* 21, 407-412.
60. Pawson, T., and Scott, J. D. (1997) *Science* 278, 2075-2080.
61. Huo, X., Abe, T., and Misono, K. S. (1999) *Biochemistry* 38, 16941-16951.

**Table 5.1 : <sup>32</sup>P Content of Dimeric and Monomeric rNPR-AC423S Relative to WT rNPR-A<sup>a</sup>**

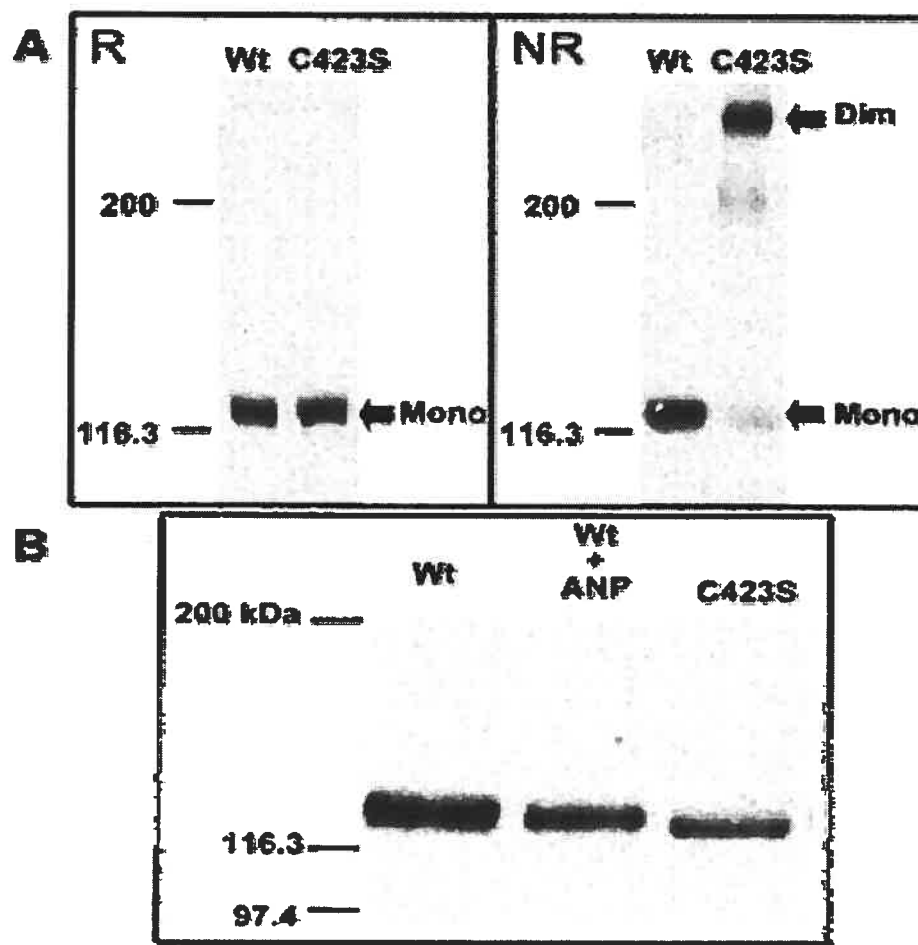
Receptor	Quantity <sup>b</sup> (arbitrary units)	Radioactive signal (pixels)	Corrected radioactive signal <sup>c</sup> (pixels)	WT/mutant signal ratio <sup>d</sup>
rNPR-A WT	1000	34 510 ± 2390 <sup>e</sup>	34 510 ± 2390	----
rNPR- AC423S monomer	94	2340 ± 120	24 880 ± 1230	1.39 ± 0.07
rNPR- AC423S dimer	906	1300 ± 140	1430 ± 150	24 ± 2

<sup>a</sup> HEK 293 cells expressing WT and rNPR-AC423S were incubated 4 h with <sup>32</sup>P, receptors were purified, and radioactivity was measured by PhosphorImager, as described under Experimental Procedures. Values are the mean ± SEM of two experiments.<sup>b</sup> Receptor quantity as determined by densitometry of results of Western blot analysis (Figure 1A).<sup>c</sup> Radioactive signal calculated when all receptor quantities are set at 1000 arbitrary units.<sup>d</sup> The WT/mutant signal ratio represents the WT receptor radioactive signal value divided by the radioactive signal found for each mutant receptor form.<sup>e</sup> Radioactive signal values for WT rNPR-A were calculated knowing that the sum of the signals for rNPR-AC423S is 9.5-fold less than for WT receptor (Figure 2, upper panel).

**Table 5.2 :  $^{35}\text{S}$  Content of Each Mutant Receptor Form as Percentage of the Content of WT rNPR-A<sup>a</sup>**

Conditions	mutant receptor form	WT rNPR-A $^{35}\text{S}$ content <sup>b</sup> (%)
Reducing	rNPR-AC423S	19.3 ± 6.6
Nonreducing	rNPR-AC423S monomer	93.4 ± 6.6
	rNPR-AC423S dimer	3.5 ± 3.5

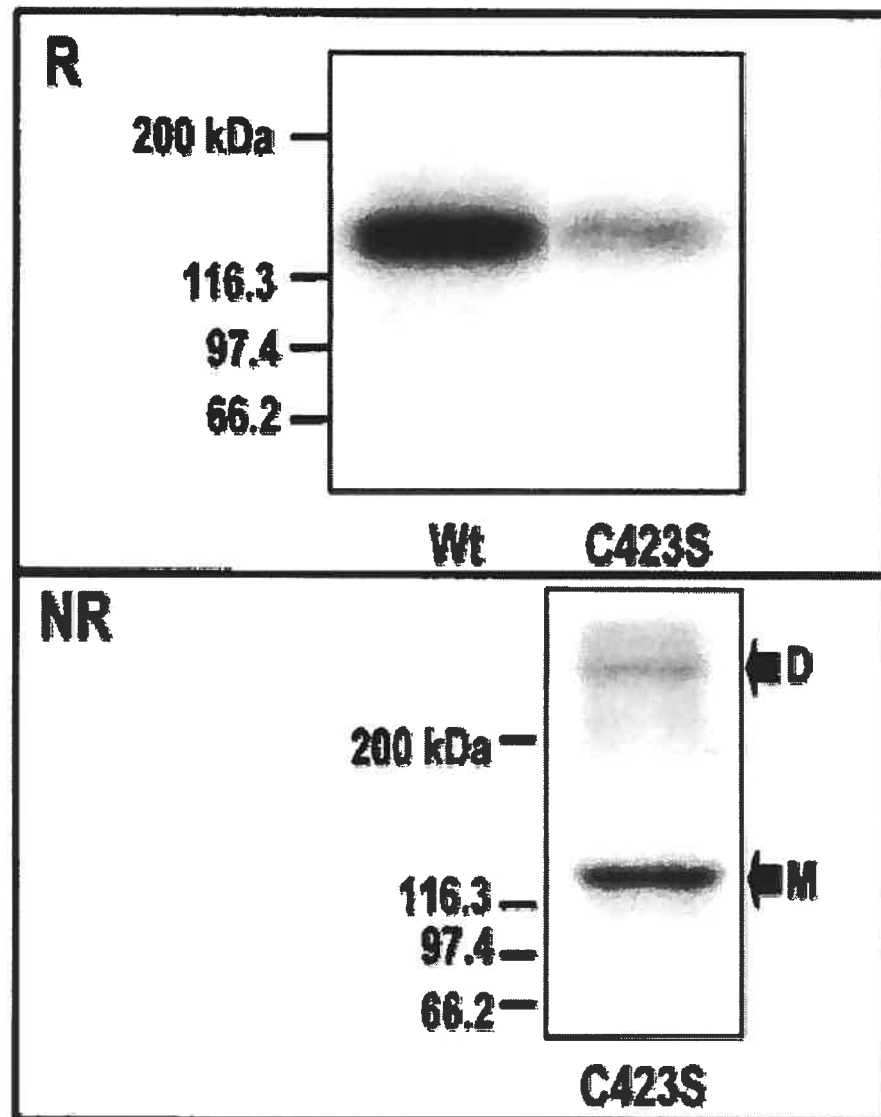
<sup>a</sup> Membrane preparations of HEK 293 cells expressing WT or NPR-AC423S were incubated with ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  for different times, receptors were purified, and radioactivity was measured in PhosphorImager, as described under Experimental Procedures.<sup>b</sup> Results were first corrected for receptor quantity (Figure 5), and then the values at different times for the mutant receptor were expressed as percentage of the signal for WT rNPR-A. Values are the mean ± SEM of four experiments.



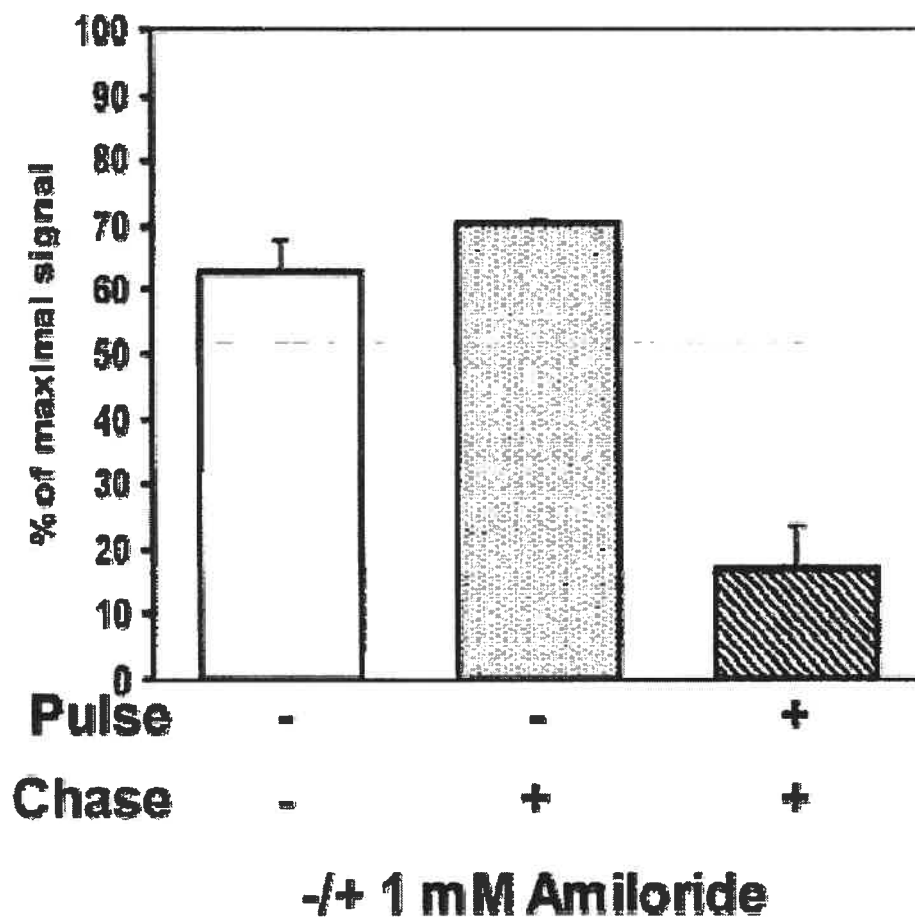
**Figure 5.1 :** Western blot analysis of WT rNPR-A and rNPR-AC423S.

(A) Analysis showing the intermolecular disulfide bridge in the mutant receptor. Membranes prepared from HEK 293 cells expressing wild-type (WT) rNPR-A and mutant rNPR-AC423S were purified by SDS-PAGE (5% gels) under reducing (R) and nonreducing (NR) conditions. In each lane, 20  $\mu$ g of membrane proteins was loaded. The receptor was revealed by Western blotting with an anti-carboxyl terminus as described under Experimental Procedures. (B) Analysis showing the gel shift pointing to dephosphorylation. Membranes of WT NPR-A (WT), ANP-treated NPR-A (WT + ANP), and NPR-AC423S (C423S) were purified also by SDS-PAGE under reducing conditions and detected as described. The molecular mass standards (in kilodaltons) were myosin (200),  $\beta$ -galactosidase (116.3), and phosphorylase b (97.4). The positions of monomers (Mono) and disulfide-linked dimers (Dim) are indicated ( $n = 3$ ).



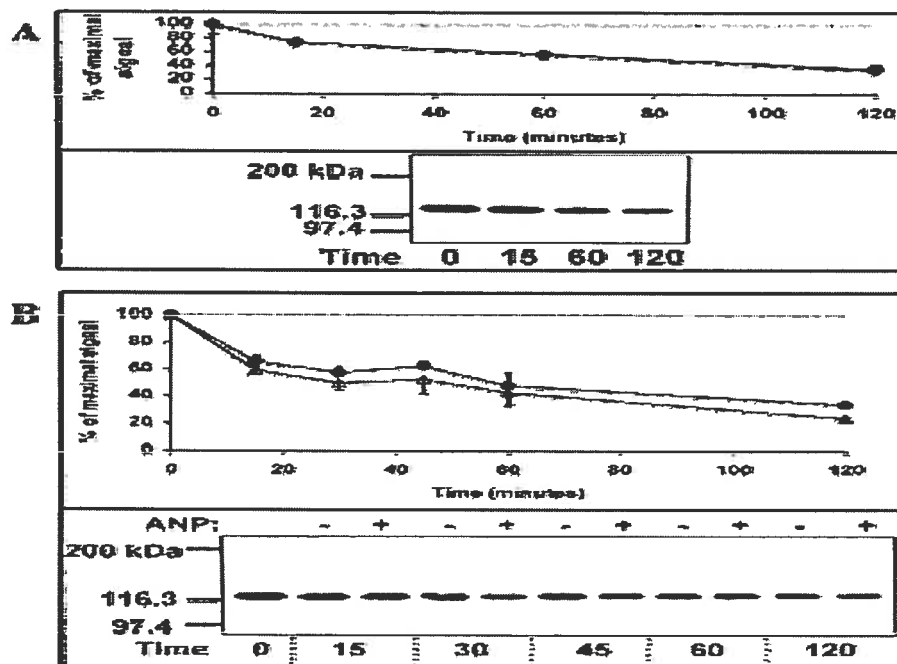


**Figure 5.2 :** Basal state  $^{32}\text{P}$  incorporation in WT and C423S rNPR-A. Upper panel (R): rNPR-AC423S mutant receptor is dephosphorylated. In two separate experiments,  $^{32}\text{P}$ -labeled HEK 293 cells expressing WT rNPR-A (WT) and rNPR-AC423S (C423S) were solubilized, immunoprecipitated, and fractionated by SDS-PAGE under reducing conditions. The gel was dried and exposed to PhosphorImager (Molecular Dynamics) for visualization. Lower panel (NR): the  $^{32}\text{P}$  signal is mostly contained in the minor rNPR-AC423S monomeric form. The same experiment as in the upper panel was accomplished in duplicate with rNPR-AC423S, only this time under nonreducing conditions. The molecular mass standards (in kilodaltons) were myosin (200),  $\beta$ -galactosidase (116.3), phosphorylase b (97.4), and bovine serum albumin (66.2). The positions of monomers (M) and disulfide-linked dimers (D) are indicated.



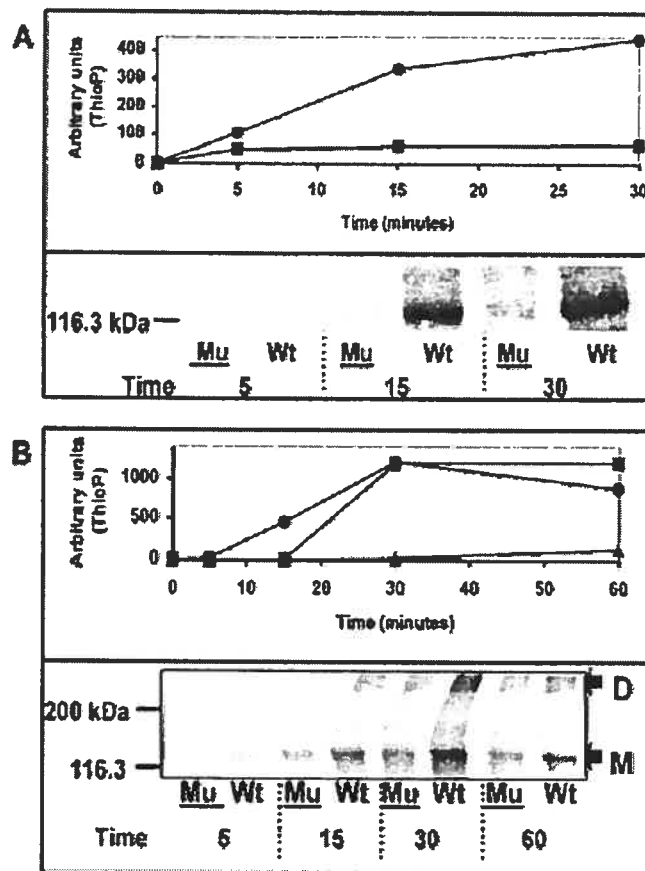
**Figure 5.3 :** Effect of amiloride on WT rNPR-A  $^{32}\text{P}$  incorporation.

Validation of the pulse-chase method was accomplished by use of amiloride. Duplicate plates containing HEK 293 cells expressing WT NPR-A were incubated in DMEM without sodium phosphate for 4 h with 1 mCi/mL [ $^{32}\text{P}$ ]orthophosphate (pulse). After that period, cells were washed with regular medium, and incubation was resumed for 1 h (chase) in phosphate-replete medium. Where indicated, 1 mM amiloride was added only during the chase or during both the pulse and the chase. The cells were washed and solubilized in homogenization buffer, and the NPR-A was immunoprecipitated and purified by SDS-PAGE as described under Experimental Procedures. Phosphorylation was quantitated by PhosphorImager analysis. Results are shown as percentage of the maximal incorporation found after the 4 h of pulse ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM).



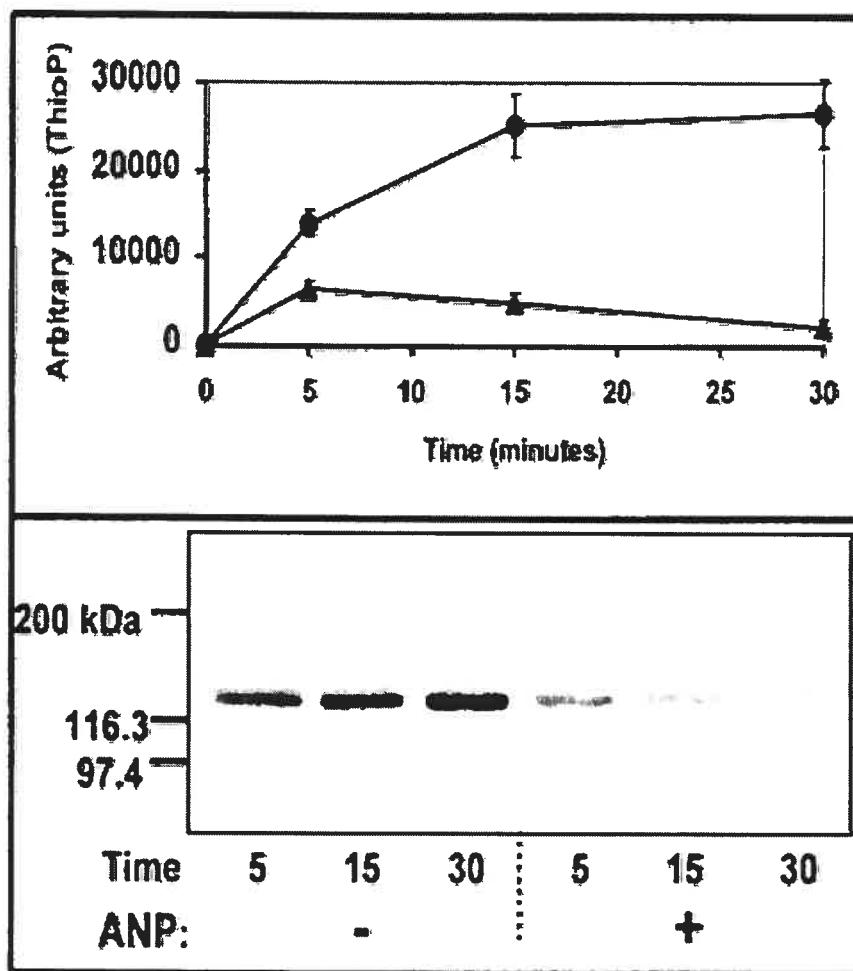
**Figure 5.4 :** Effect of rANP on rNPR-A dephosphorylation.

(A) Effect of rANP on global rNPR-A phosphorylation. Duplicate plates of HEK 293 cells expressing WT NPR-A were incubated 4 h in DMEM without sodium phosphate containing 1 mCi/mL [ $^{32}\text{P}$ ]orthophosphate. After that period, 1  $\mu\text{M}$  ANP was added for the periods of time indicated, followed by solubilization of the cells for purification of the NPR-A by immunoprecipitation and SDS-PAGE. The vertical bars within each symbol represent the range of values obtained from two separate experiments. (B) Effect of rANP on the isolated dephosphorylation component. Exposure of HEK 293 cells expressing WT rNPR-A to ANP, after  $^{32}\text{P}$  incorporation, does not increase the rate of  $^{32}\text{P}$  removal from the receptor. Duplicate plates of HEK 293 cells expressing WT receptor were incubated 4 h with  $^{32}\text{P}$ . Radioactivity was then removed and replaced with regular medium (DMEM) ( $\bullet$ ) or medium containing 1 mM rANP ( $\blacktriangle$ ) for different times, followed by preparation of whole-cell detergent extracts for purification of NPR-A by immunoprecipitation and SDS-PAGE under reducing conditions as described under Experimental Procedures. The vertical bars within each symbol represent the range of values obtained from two separate experiments, which were assayed in duplicate. Results are shown as percentage of the maximal incorporation found after the 4 h of pulse. The images under graphs depict results seen by PhosphorImager of a representative time-dependent  $^{32}\text{P}$  content experiment.



**Figure 5.5 :** Thiophosphorylation of the rNPR-AC423S (Mu).

(A) Membrane preparations of HEK 293 cells expressing either WT rNPR-A (●) or rNPR-AC423S (■) were incubated at 37°C for different times with [<sup>35</sup>S]ATPyS in buffer containing protein phosphatase inhibitors (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, okadaic acid), solubilized in detergent, and purified by immunoprecipitation and SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were blotted on a nitrocellulose membrane and radioactivity was revealed by PhosphorImager. Receptors are in equal amounts, as determined by Western blot analysis. (B) Same experiment as in panel A was accomplished with purification under nonreducing conditions. Signals for WT rNPR-A (●), monomeric rNPR-AC423S (■), and dimeric rNPR-AC423S (▲) are depicted. Receptor quantities were adjusted to obtain equal monomeric receptor phosphorylation since WT receptor was expressed 5 times more than the mutant receptor. The results in the graphs are representative of one experiment of two and have been corrected for receptor quantity, background signal, and nonspecific <sup>35</sup>S signal. The images under graphs represent time-dependent PhosphorImager signals seen for one representative experiment.



**Figure 5.6 :** Thiophosphorylation of the rANP-treated WT rNPR-A.

HEK 293 cells expressing WT rNPR-A were incubated 1 h in medium containing (▲) or lacking (●) 1 μM rANP. Membrane preparations of these cells were then made and incubated at 37°C for different times with [<sup>35</sup>S]ATPγS in buffer containing protein phosphatase inhibitors (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, okadaic acid), immunoprecipitated, and separated in SDS-PAGE under reducing conditions as described under Experimental Procedures. The graph depicts time-dependent thiophosphorylation in four experiments (mean ± SEM). The image under the graph shows PhosphorImager results of one representative experiment.

**CHAPITRE 6 : Atrial natriuretic peptide-  
dependent photolabeling of a regulatory ATP-  
binding site on the natriuretic peptide receptor-A**

Simon Joubert, Christian Jossart, Normand McNicoll, and André De Léan

FEBS Journal (2005) 272 (21), 5572-5583.

Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec,  
Canada, H3T 1J4

## **Abstract**

The natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) is composed of an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane-spanning domain, a kinase homology domain (KHD) and a guanylyl cyclase domain. Because the presence of ATP or adenylylimidodiphosphate reduces atrial natriuretic peptide (ANP) binding and is required for maximal guanylyl cyclase activity, a direct interaction of ATP with the receptor KHD domain is plausible. Therefore, we investigated whether ATP interacts directly with a binding site on the receptor by analyzing the binding of a photoaffinity analog of ATP to membranes from human embryonic kidney 293 cells expressing the NPR-A receptor lacking the guanylyl cyclase moiety ( $\Delta$ GC). We demonstrate that this receptor (NPR-A- $\Delta$ GC) can be directly labeled by 8-azido-3'-biotinyl-ATP and that labeling is highly increased following ANP treatment. The mutant receptor  $\Delta$ KC, which does not contain the KHD, is not labeled. Photoaffinity labeling of the NPR-A- $\Delta$ GC is reduced by 50% in the presence of 550  $\mu$ M ATP, and competition curve fitting studies indicate a Hill slope of 2.2, suggestive of cooperative binding. This approach demonstrates directly that the interaction of ANP with its receptor modulates the binding of ATP to the KHD, probably through a conformational change in the KHD. In turn, this conformational change is essential for maximal activity. In addition, the ATP analog, 8-azido-adenylylimidodiphosphate, inhibits guanylyl cyclase activity but increases ANP binding to the extracellular domain. These results suggest that the KHD regulates ANP binding and guanylyl cyclase activity independently.

**Abbreviations** : ANP, atrial natriuretic peptide; 8-azido-ATP-B, 8-azido-3'-biotinyl-ATP; 8-azido-Ado, 8-azido-adenosine; 8-azido-App(NH)p, 8-azido-adenylylimidodiphosphate; BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium; HEK293, human embryonic kidney 293; KHD, kinase homology domain; NPR-A, natriuretic peptide receptor-A; PBS, phosphate buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

**Keywords** : ATP, kinase homology domain, natriuretic peptide, photoaffinity labeling, receptor binding

## **Introduction**

Guanylyl cyclase (GC) receptors are involved in many different functions, and seven different homologous membrane-bound GCs have been identified in mammals [1,2]. Guanylyl cyclase A (GC-A), also termed natriuretic peptide receptor A (NPR-A), is the receptor for atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP). Guanylyl cyclase B (GC-B), also known as natriuretic peptide receptor B (NPR-B), is a receptor for C-type natriuretic peptide, while GC-C serves as the receptor for the guanylin peptides and heat-stable enterotoxins. Guanylyl cyclases E and F, also called retGC-1 and retGC-2, are orphan receptors that are responsible for cGMP synthesis during the phototransduction cascade in the retina. Guanylyl cyclases D and G are orphan receptors with unknown functions. Members of the family all have a similar topology, namely an N-terminal extracellular domain, a single apparent transmembrane domain, a protein kinase homology domain (KHD), an amphipathic  $\alpha$ -helical or hinge domain, and a C-terminal GC domain [1,2].

NPR-A is well known for its wide tissue distribution and control of important functions. NPR-A is found in the heart, spleen, kidney, vascular smooth muscle, endothelium, and in central and peripheral nervous system tissues [1,2]. Its main functions are to (a) decrease arterial blood pressure through vasorelaxation and inhibition of the renin–angiotensin–aldosterone system, (b) decrease blood volume through natriuresis/diuresis, and (c) inhibit cardiomyocyte growth [1,3,4]. NPR-A also appears to regulate fatty acid mobilization [5].

NPR-A is a phosphoprotein that contains 1029 amino acids and migrates as a band of  $\approx$  125 kDa molecular mass under reducing SDS/PAGE. Previous data have shown that NPR-A is a noncovalently linked A-shaped dimer [6–9]. Both extracellular [10] and intracellular [11] regions interact to stabilize the dimer. The intracellular KHD has  $\approx$  250 residues and contains an N-terminal cluster of four serine and two threonine residues that are phosphorylated in the basal state [12–16]. When ANP is added to whole cells expressing the NPR-A, the phosphate content and GC activity are reduced over time [12,13,15,17,18]. Almost 20 years ago, our group found that adding ATP to cell membranes expressing the NPR-A increased the off-rate of ANP binding to the extracellular domain [19]. Shortly



afterwards, Kurose et al. demonstrated that ATP synergically increases the ANP-induced GC activity of the receptor in membrane preparations [20]. Many other studies then documented the activation of NPR-A by ATP [18,21–29]. These effects are also observed when ATP is replaced with nonhydrolysable analogues of ATP, showing that the catalytic conversion of ATP is not involved [18,20–24]. Moreover, the KHD domain has no detectable phosphotransferase activity, presumably because an HGNL sequence is found in subdomain six of the KHD instead of a highly conserved HRDL sequence, which is involved in the catalytic process of regular protein kinases. Moreover, a glycine-rich loop (commonly found in kinases) is misplaced in the KHD. Thus, the function of this domain, and the dual regulation by ATP and phosphorylation, are not fully understood.

Based on these observations, the current model for NPR-A activation by ANP involves four steps [25]. First, ANP binds to the extracellular domain of the NPR-A dimer and induces a conformational change of the intracellular KHD domain. Second, ATP binds to the newly configured KHD. Third, ATP binding increases GC activity, and also increases the off-rate of ANP binding. Finally, NPR-A undergoes desensitization, which correlates with a loss of phosphate content in the KHD. It is suggested that dephosphorylation of the KHD by distinct protein phosphatases [17] occurs as a consequence of reduced kinase activity [13]. Although the current model for agonist activation of the NPR-A indicates binding of ATP to the KHD, this has never been shown by a direct method. Whether ATP binds to the KHD or to an ATP-sensitive accessory protein was investigated by Wong and colleagues [27]. They showed that a recombinant NPR-A protein of > 95% purity was still highly activated by ATP and retained high-affinity ANP binding, implying that the effects of ATP did not require other proteins besides the NPR-A receptor itself.

In this report, we demonstrate that a photosensitive analog of ATP binds directly to the KHD of the NPR-A, mostly upon pretreatment with ANP. The results suggest that ATP binding is cooperative and that it tightly regulates both GC activity and ANP binding to the receptor.

## **Results**

### **Effect of ATP on NPR-A GC activity**

Both the phosphorylation of NPR-A and the presence of ATP seem important in order to attain high GC activity. To further investigate this idea, we used human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, stably expressing NPR-A, and tested the effect of treatment with a high concentration (0.5  $\mu$ M) of ANP for 90 min. These conditions are known to desensitize/dephosphorylate the NPR-A [13,15,17,18]. As membranes from these cells are then further treated or not treated with ATP and ANP, cell surface bound ANP was removed in order to observe the effects of treatments in the absence of residual ANP from the desensitization step. Therefore, following treatment, the cells were washed with acidic buffer to prevent carryover of ANP [30]. Membrane preparations were made in buffer containing phosphatase inhibitors to maintain the phosphorylation state of both control (phosphorylated) and ANP-treated (dephosphorylated) NPR-A. GC assays were carried out using these membrane preparations. Data are presented as percentage of maximal activity measured by incubation in a mix of Triton X-100 detergent and  $MnCl_2$ [31]. In these assays, adding ANP alone to control receptor (WT) was found to increase cGMP production sixfold, but adding ATP with ANP produced a 108-fold increase in cGMP (Fig. 1). With desensitized receptor (Fig. 1, WT-Des), further incubation with ANP produced no significant increase in cGMP, and the ATP/ANP mix only produced a fourfold increase in cGMP production. Interestingly, the activation by ATP/ANP for the WT receptor in these membrane preparations was the highest activation ever obtained for this receptor ( $\approx$  67% of Triton/ $Mn^{2+}$ ). The phosphatase inhibitors thus probably helped to preserve NPR-A phosphorylation, leading to improved activation and cGMP production.

### **Effect of ATP on $^{125}I$ -labeled ANP binding**

We and others have shown that ATP reduces the binding of ANP to the NPR-A [19,28,29]. As shown in Fig. 2, 0.5 mM ATP was found to inhibit, by 20%, the specific binding of  $^{125}I$ -labeled ANP to WT NPR-A. However, ATP had no effect on  $^{125}I$ -labeled ANP binding to desensitized receptor (WT-Des) or on binding to a NPR-A- $\Delta$ KC mutant receptor that lacks the whole intracellular region. The results, so far, suggest two possibilities that are not mutually exclusive, namely (a)

ATP can only bind to the phosphorylated native receptor to mediate effects on GC activity and ANP binding or (b) ATP binds to an NPR-A-associated ATP-binding protein that regulates receptor function. This protein dissociates from the receptor upon desensitization and thus the effects of ATP are lost.

### **8-Azido-3'-biotinyl-ATP inhibition of NPR-A GC activity**

To investigate the direct interaction of the NPR-A with ATP, we used 8-azido-ATP to which we added a biotin moiety on position 3 of the ribose by esterification. This new agent (8-azido-3'-biotinyl-ATP or 8-azido-ATP-B) has been shown to be useful in the photolabeling of ATP-binding proteins [32]. The molecule is more stable than [<sup>32</sup>P]8-azido-ATP[αP], and detection is easily obtained by incubation with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP). We first examined the ability of 8-azido-ATP-B to substitute for ATP. To our surprise, 8-azido-ATP and 8-azido-ATP-B were competitors of the effect of ATP on GC activity (Fig. 3). In fact, all azido-containing nucleotides tested inhibited GC activity to some extent, the most potent being 8-azido-adenylylimidodiphosphate [8-azido-App(NH)p] and 2-azido-ATP (Fig. 3). The 8-azido-ATP-B analogue inhibited cGMP production by ≈ 35%. Thus, although the photolabeling agent does not increase GC activity like ATP does, it competes with ATP binding and thus may bind to the same site as ATP. Also, in these experiments, agents might inhibit ATP binding to the KHD and also GTP binding to the GC domain; thus we cannot conclude that the inhibition found here is entirely KHD-specific.

### **Effect of 8-azido-ATP-B on binding of <sup>125</sup>I-labeled ANP to NPR-A-ΔGC**

Previous studies suggested that ATP, in some conditions, might also bind to the GC domain and inhibit GC activity [33,34]. To exclude this possibility in our assay, and to demonstrate specific photoaffinity labeling on the KHD of NPR-A, we generated a ΔGC mutant receptor that lacks the C-terminal GC domain. Deletion of the GC domain had no effect on ΔGC native phosphorylation (i.e. C-terminal residue deletion up to amino acid 675 still yields a normally phosphorylated NPR-A) [35]. This construct also retained high-affinity ANP binding (data not shown). We first determined whether this construct was sensitive to ATP. Binding of <sup>125</sup>I-labeled ANP to the ΔGC construct was inhibited by ATP in a dose-dependent manner (Fig. 4). Adding 1 mM ATP inhibited ANP

binding by  $\approx 25\%$ . Surprisingly, the 8-azido-ATP-B analog proved to be a potent inhibitor of  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP binding to the  $\Delta\text{GC}$ , reducing binding by  $\approx 85\%$  (Fig. 4). While competing with ATP, 8-azido-ATP nonsignificantly inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP, whereas 8-azido-App(NH)p increased ANP binding to the receptor by almost 60%. A concentration of 1 mM Gpp(NH)p had no effect on ANP binding. Other azido-containing nucleotides, such as 8-azido-GTP and 8-azido-adenosine, were tested in ANP-binding experiments, and had a slight inhibitory effect of  $\approx 5\%$ , while other molecules (2-azido-ATP, 8-azido-ADP) had no effect (data not shown). This suggests that these latter compounds, when tested on GC activity in Fig. 3, were GC domain inhibitors.

### **8-azido-ATP-B labeling of NPR-A- $\Delta\text{GC}$**

We next investigated the direct interaction of NPR-A- $\Delta\text{GC}$  with ATP using the photoaffinity analog. According to the current model for activation of NPR-A [25], binding of ANP to the extracellular domain would induce a conformational change in the intracellular KHD. This conformational change would allow ATP binding to the KHD. Thus, preincubation of membranes with ANP should increase the specific photoaffinity labeling of the NPR-A- $\Delta\text{GC}$  with 8-azido-ATP-B.  $\Delta\text{GC}$  was stably expressed in HEK293 cells and membrane preparations were made. The membranes were first incubated with or without 0.1  $\mu\text{M}$  ANP for 90 min at room temperature and then on ice for 5 min with 100  $\mu\text{M}$  8-azido-ATP-B. As the presence of divalent ions is required for ANP binding, we first examined photolabeling in the presence of  $\text{MgCl}_2$  or  $\text{MnCl}_2$ . Photoaffinity labeling was higher when membranes were treated with ANP, and photolabeling was slightly increased in the presence of  $\text{MgCl}_2$  compared with  $\text{MnCl}_2$  (Fig. 5A). The photolabeling signal was also more consistent when  $\text{MgCl}_2$  was used (data not shown). Membranes were then incubated with ANP, as before, together with varying concentrations of 8-azido-ATP-B (Fig. 5B). Photoaffinity labeling increased with rising concentrations of 8-azido-ATP-B. The 100  $\mu\text{M}$  concentration was determined as optimal because it yielded the maximal signal to background ratio. Next, we looked at the receptor specificity of photolabeling. Membranes from untransfected HEK293 cells,  $\Delta\text{GC}$ -expressing cells, or  $\Delta\text{KC}$ -expressing cells were incubated in the presence or absence of ANP, photolabeled with 100  $\mu\text{M}$  8-azido-ATP-B, immunoprecipitated as previously described and separated on SDS/PAGE. Figure 5C shows a photoaffinity-labeled protein of

≈105 kDa that was immunoprecipitated from ΔGC-expressing cells (Fig. 5C, lanes 3 and 4) but not from untransfected cells (Fig. 5C, lanes 1 and 2). Photoaffinity labeling was found to be increased fourfold by pretreatment with ANP (Fig. 5C, lane 4 compared with lane 3). The molecular mass of this photoaffinity-labeled membrane protein was identical to that of the ΔGC, as determined by western blotting (Fig. 5D, lanes 3 and 4). Neither of the two bands observed in the western blot of ΔKC-expressing cells (Fig. 5D, lanes 5 and 6) exhibited any significant photoaffinity labeling (Fig. 5C, lanes 5 and 6).

### **Competition of photoaffinity labeling of ΔGC by ATP**

To examine the specificity of the photolabeling, ΔGC-containing membranes were treated with ANP and then photolabeled with 8-azido-ATP-B in the presence of 1 mM GTP or 1 mM ATP (Fig. 6). Photolabeling was reduced by ≈ 50% only when ATP was added, indicating that photolabeling is adenosine-specific. To determine whether photoaffinity labeling of ΔGC was specific, competition with ATP was further examined. Membranes were preincubated with or without ANP. Proteins were then incubated on ice for 5 min with 10 mM ATP after which 100 μM 8-azido-ATP-B was added (Fig. 7A). ANP-dependent photoaffinity labeling was completely abolished with 10 mM ATP. Next, we looked at the dose-dependent competition of photoaffinity labeling by ATP. Membranes were preincubated with 0.5, 1, 2 or 5 mM ATP on ice for 5 min, and then 100 μM 8-azido-ATP-B was added (Fig. 7B). ANP-dependent photoaffinity labeling of ΔGC was reduced as the concentration of ATP was increased. Similar results were obtained when 8-azido-ATP was used as the competitive nucleotide (data not shown). Data obtained from multiple experiments were analysed by radioimaging analysis and plotted as relative ANP-dependent photoaffinity labeling signal as function of ATP concentration (Fig. 7C). The data were curve fitted by using the allfit program [36]. Analysis revealed that photoaffinity labeling was reduced by ≈ 50% in the presence of 0.55 mM ATP. A calculated Hill slope of 2.2 was obtained, which suggests that competition by ATP occurs in a cooperative manner.

## **Discussion**

The results presented here provide biochemical evidence that ATP binds directly to the KHD of NPR-A. We demonstrate that a  $\Delta$ GC construct can be specifically labeled by the ATP photoaffinity analog, 8-azido-ATP-B, mostly when activated by ANP, and that this labeling can be significantly reduced by competition with ATP, but not with GTP. The  $\Delta$ KC construct, which does not contain the KHD, exhibits no photoaffinity labeling by 8-azido-ATP-B. Photolabeling competition experiments suggest that binding of ATP to the KHD is a highly cooperative event.

Interestingly, GC and ANP-binding studies using 8-azido-App(NH)p gave surprising results, reminiscent of those obtained with the diuretic drug, amiloride [19,28,37]. Just like amiloride, 8-azido-App(NH)p inhibits ATP-driven GC activity (Fig. 3), but increases ANP binding to the extracellular domain (Fig. 4). On the other hand, the photoaffinity labeling analog, 8-azido-ATP-B, inhibited both GC activity (Fig. 3) and ANP binding (Fig. 4). Addition of the biotin molecule to 8-azido-ATP conferred, to the photoaffinity analog, increased inhibition of both GC activity and ANP binding. These results suggest that allosteric effects on extracellular ANP binding and intracellular GC activity are regulated differently by the KHD.

Many studies have dealt with the effects of ATP and/or phosphorylation on the NPR-A, and intriguing results were reported. Some studies described that ATP inhibits ANP binding to NPR-A [19,28], while another did not document any effect of ATP on ANP binding [20]. In some studies, ATP alone had no effect on GC activity [20–22,26], while other studies showed a significant effect of ATP on GC activity [12,23,24,27,28]. The effects of ATP on both GC activity and ANP binding thus seem highly dependent on the method used for membrane preparation [20]. NPR-A occurs as a phosphoprotein in stably expressing HEK293 cells and NIH 3T3 fibroblasts [12–15]. The discrepancies found might be a result of the more or less effective removal or inhibition of protein kinases or phosphatases that could modify the phosphorylation status of the NPR-A when cells are homogenized. Native phosphorylation status of the protein might, in turn, be important for both ATP-induced GC activity and ATP-induced inhibition of

ANP binding. This is consistent with the results presented in [Fig. 1](#) that show high ANP+ATP-dependent GC activity in native membranes treated with phosphatase inhibitors (67% of maximal level). In a previous report, using the same NPR-A-expressing cells but without using phosphatase inhibitors, ANP+ATP treatment showed an activity of only 37% of the maximal level [[26](#)]. Also, ATP-induced inhibition of ANP binding is only found when native receptor is used and not with desensitized (dephosphorylated) NPR-A ([Fig. 2](#)). Moreover, attempts to show a difference in photoaffinity labeling between native and desensitized NPR-A-ΔGC were unsuccessful (data not shown), suggesting that ATP might still bind to a dephosphorylated KHD. Thus, ATP binding to desensitized NPR-A-ΔGC still occurs, but regulation of ANP binding is lost. This indicates that ATP has to bind to a phosphorylated NPR-A in order to modulate ANP binding.

Indirect methods have suggested that ATP binds to and has a direct effect on NPR-A. For example, 1 mM caged ATP was an effective activator of NPR-A purified from insect cells [[27](#)], indicating that ATP-driven signal transduction of NPR-A does not require another protein. The effects of ATP on ANP binding were also maintained when using a highly purified receptor preparation from adrenal zona glomerulosa [[29](#)]. Point mutation studies were also used to identify the ATP-binding site in the KHD. The KHD contains the sequence GRGSNYG(503–509), which resembles the sequence GXGXXG that serves as part of the ATP-binding site in most protein kinases. However, mutations within this region produced conflicting results. In one study, the double mutant G505V, S506N showed reduced ANP/ATP-dependent GC activation [[38](#)]. But, in another study, no ATP effect was lost when all three glycine residues were mutated to alanines [[12](#)]. Interpretation of point mutation studies in the KHD is difficult because they might impact only ATP binding, only KHD phosphorylation, or both.

In an attempt to show direct binding of ATP to the KHD of NPR-A, Sharma et al. incubated membranes containing different constructs of the NPR-A with [ $^{32}$ P]ATP[αP][[39](#)]. Although we cannot exclude that some ATP binding occurred, the results were difficult to interpret because [ $^{32}$ P]ATP[αP] in this case might bind to other membrane-associated ATP-binding proteins. In addition, there was no evidence to show that [ $^{32}$ P]ATP[αP] in these conditions did not bind to the GC

catalytic domain. Furthermore, specific and stable noncovalent binding seems unlikely because ATP is suspected to have low affinity for the KHD, based on 50% effective concentration (EC50) values in the high micromolar range (0.2 mM) [29].

GCs other than NPR-A are also modulated by ATP. Recently, Yamazaki et al. found that retinal GC can be activated by guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs) to at least 10–13-fold over control activity and that interaction with adenine nucleotides was essential for strong activation of retGC [40]. ATP or ATP analogues also potentiate ligand-mediated activity of GC-C, the receptor for the guanylin peptides and heat-stable enterotoxin. Bhandari et al. showed that binding of an antibody raised against the KHD domain of GC-C was reduced when receptor was preincubated in the presence of ATP, but not in the presence of GTP [41]. The ATP-induced conformational change of the KHD presumably inhibited antibody binding, and mutation of a conserved lysine residue in the antibody interaction region also inhibited antibody binding. Interestingly, GC-C does not contain the glycine-rich loop that is found in NPR-A. This might indicate that the glycine-rich region in GC-A is not essential for ATP binding. Also, the conformation of the KHD of GCs might be different from that of protein kinases. In fact, the N-terminal sequence of the KHD is not highly conserved among GCs and is not similar to typical protein kinase domains. Sequence alignment of the NPR-A KHD sequence with 25 known protein kinases showed that the GRGSNYG sequence found in the KHD does not align with the strictly conserved GXG sequence of protein kinases. Also, the highly conserved HRDL sequence of kinases is replaced by HGNL in the KHD. It is possible that these modifications lead to reduced affinity of ATP for the KHD. We obtained a 50% inhibitory concentration (IC50) of 550  $\mu$ M for competition of 8-azido-ATP-B from the receptor with ATP. As ATP is competing with a covalently binding molecule (8-azido-ATP-B), this value might underestimate the affinity of ATP for the KHD, and might also explain why we always obtain some residual nonspecific photolabeling signal, even at a high ATP concentration. However, previous data have shown that both effects of ATP on the NPR-A binding and catalytic activity share the same ED50 of 190  $\mu$ M [29].



Antos et al. recently proposed that activation of NPRs occurs in an ATP-independent manner [42]. Their conclusion is at odds with virtually all results and conclusions that have appeared in this field. The experimental model used by Antos et al. is questionable, for many reasons. First, the GC activity documented is very high ( $\text{nmol cGMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot 15\text{ s}^{-1}$ ), suggesting that the expression level of the receptor is excessive. If so, one might wonder if there could be extreme conditions that do not reflect those encountered at more physiological levels of expression. Under such extreme conditions, a substantial fraction of substrate would be converted to cGMP and thus the linearity of the enzymatic conditions would be lost. Furthermore, no nucleotide regenerating system was included and thus GTP substrate levels were not maintained, as required for proper enzyme kinetic studies. This might explain the rapid levelling of catalytic activity observed. Also, the effects of ATP were not significant when tested over a 15 s period in GC assays. This unusual time frame might be too short to observe any significant activation effect. In addition, dose-response curves of natriuretic peptides are shifted to the right and the ED50 values are in the high micromolar range. This is drastically different from what is typically obtained for natriuretic peptides. Natriuretic peptide dose-response curves usually show an ED50 of  $\approx 50$ –150 pmol. These factors might explain why this group did not observe any ATP-dependent activation of NPR-A or NPR-B and therefore their conclusion does not appear to challenge the overwhelming evidence for a direct effect of ATP on NPR-A.

Our results, showing co-operativity of ATP inhibition of 8-azido-ATP-B photolabeling, characterized by a Hill coefficient of 2.2, suggest a mechanism by which binding of one ATP molecule to one NPR-A KHD of the homodimer would facilitate binding of a second ATP molecule to the other KHD. To our knowledge, this is the first evidence to suggest such a mechanism for this receptor. However, it seems logical as tight dimerization is necessary for maximal GC activity and the catalytic sites are made up of complementary functional groups contributed separately by each GC domain monomer. The molecular structure of GC receptors is not well defined. Although the structure and mechanism of ANP binding to the extracellular domain of the NPR-A have recently been studied [6–9], the crystal structure of both the KHD and the GC domain of these receptors have still not been reported. Such studies should

provide new insight to understand the allosteric regulation of ligand binding and GC activity by the KHD.

## **Experimental procedures**

### **Materials**

Photosensitive analogs of ATP (8-azido-adenosine, 8-azido-ADP and 8-azido-ATP) were obtained from Biolog-Axxora LLC (San Diego, CA, USA), and 8-azido-App(NH)p, 8-azido-GTP and 2-azido-ATP were from Affinity Labeling Technologies Inc. (Lexington, KY, USA) ATP, GTP, Gpp(NH)p and ANP were from Sigma (St-Louis, MO, USA).

### **Expression vectors**

rNPR-A mutants were engineered in the expression vector pBK-Neo (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The construction of the NPR-A ( $\Delta$ KC) mutant, where the intracellular domain has been removed, has already been described [25]. The rNPR-A ( $\Delta$ GC) mutant was constructed by removing the C-terminal 196 amino acids, forming the GC domain, by a Bpu1102I/KpnI co-digestion. A synthetic linker (complementary oligonucleotides 5'-TGAGCAACTCAAGAGAGGTGAAAGAGGCTCTTCTACACGTGGTTAAGGTAC-3' and 5'-CTTAACCACGTGTAGAAGAGCCTCTTTCACCTCTCTTGAGTTGC-3') was ligated to complete the construction up to amino acid R833 of wild type NPR-A and to include the C-terminal GERGSSTRG epitope. The sequence was confirmed by automated nucleic acid sequencing.

### **Cell culture and transient or stable expression in HEK293 cells**

The HEK293 cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 100 mU streptomycin/penicillin, in a 5% (v/v) CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Transient expression of the  $\Delta$ KC was obtained by transfection using the CaHPO<sub>4</sub> precipitation method. For the stable expression of NPR-A and  $\Delta$ GC, clones were selected in 500  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> G-418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in culture medium.

### **Membrane preparations**

HEK293 cells expressing NPR-A were first washed with ice-cold NaCl/Pi (PBS) (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7.4) and then incubated for 10 min at 4 °C in TH buffer (20 mM Hepes, 2.5 mM EDTA, pH 7.4) containing various protease inhibitors (10<sup>-7</sup> M aprotinin, 10<sup>-6</sup> M pepstatin, 10<sup>-6</sup> M leupeptin, 10<sup>-5</sup> M Pefabloc). Cells were then broken with a polytron homogenizer, and membranes were pelleted by centrifugation at 37 000 g for 30 min in a Beckman JA-20 rotor (Beckman, Montreal, QC, Canada). The membranes were washed three times in 100 mL of TH buffer and then frozen at -80 °C in buffer (50 mM Hepes, 0.1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4 + protease inhibitors indicated above). When the phosphorylation state of the protein had to be maintained, a cocktail of nonspecific phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerol 2-phosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and 0.1 mM ammonium molybdate) was added to the above-mentioned buffers. The protein concentration was determined by use of the bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **Immunoblot analysis**

Membrane proteins were separated on SDS/PAGE and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using the liquid Mini Trans-Blot System (both Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Detection of NPR-A, ΔKC and ΔGC was achieved using a rabbit polyclonal antiserum raised against the NPR-A C-terminal sequence (YGERGSSTRG) and purified by affinity chromatography. Specific signal was obtained with an HRP-coupled anti-rabbit polyclonal antibody, according to the enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting Analysis System (Amersham, Piscataway, NJ, USA).

### **Synthesis of 8-azido-3'-biotinyl-ATP**

8-Azido-3'-biotinyl-ATP was synthesized by esterification of biotin with 8-azido-ATP using the protocol of Schafer et al. [32], with some modifications. Biotin was first mixed with dimethyl formamide, and then with 1,1'-carbonyldiimidazole, and mixed thoroughly to precipitate the activated biotin. 8-Azido-ATP was diluted in 1 M triethylammonium acetate buffer, pH 8.0, and added to the activated biotin. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. Product was purified with Accell QMA ion exchange chromatography and HPLC using a Vydac C18 column with a 0–50% linear methanol gradient at 1 mL·min<sup>-1</sup> for 80 min in

50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.5, containing 1 mM tetrabutylammonium. The molecular mass of the purified product was confirmed using MALDI-TOF.

### **Photolabeling procedure**

Receptor quantity was determined by saturation binding experiments, and 200–500 fmol receptor was first incubated at room temperature, with or without 0.5  $\mu$ M ANP, for 90 min. The samples were then placed on ice in the dark and 50–100  $\mu$ M 8-azido-3'-biotinyl-ATP was added. The final volume was 50–150  $\mu$ L. After a 5 min incubation period, samples were irradiated on ice with two hi-intensity 100 W long wave UV Lamps (Blak-Ray B-100AP; Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada) for 3 min. The membranes were then solubilized at 4 °C for 45 min in 600  $\mu$ L RIPA buffer [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS, 1% (w/v) sodium deoxycholate, pH 7.4]. The receptor was then purified by immunoprecipitation using an anti-(C-terminal) immunoglobulin, and separated on SDS/PAGE. After transfer of proteins on a nitrocellulose membrane, the NPR-A–8-azido-3'-biotinyl-ATP complex was revealed by incubation with streptavidin–HRP (Amersham).

### **Receptor binding assays**

<sup>125</sup>I-Labeled rANP was prepared using the lactoperoxidase method, as described previously [26]. The specific activity of the high-pressure liquid chromatography-purified radioligand was at least 2000 Ci·mmol<sup>-1</sup>. Membranes from HEK293-expressing rat NPR-A (0.2–5  $\mu$ g) were incubated at least in duplicate with 10 fmol <sup>125</sup>I-labeled rANP for 20 h at 4 °C in 0.5–1 mL of 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and 0.5% (w/v) BSA. Non-specific binding was defined by the addition of nonradioactive rANP at 100 nM. Bound ligand was separated from free ligand by filtration on GF/C filters pretreated with 1% (v/v) polyethylenimine. Filters were washed five times and counted in an LKB gamma counter (Fisher Scientific Ltd.).

### **Guanylyl cyclase activity**

A total of 5  $\mu$ g of membrane protein was incubated for 12 min at 37 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 7.6, with 10 mM theophylline, 2 mM IBMX, 10 mM creatine phosphate, 10 units of creatine kinase, 1 mM GTP and 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Maximal activity was measured by adding 4 mM MnCl<sub>2</sub> and 1% (v/v) Triton X-100. Cyclic

GMP was separated from GTP by chromatography on alumina and measured by radioimmunoassay, as previously described [43].

### **Data analysis and statistics**

Variation of the photolabeling signal for the same treatments, but between replicate experiments, appear to be mostly caused by a multiplicative factor, presumably owing to differences in film exposition. To correct for between-experiment variability, the photolabeling signal for each treatment within each experiment was log-transformed. Log-transforms were then corrected by subtracting the averaged log-transform within each experiment, then adding the grand average of log-transforms for all experiments. Finally, antilogs of the corrected log transforms were obtained and used for further testing. Statistical analysis was performed by analysis of variance (anova), followed by multiple comparisons using the Student Newman Keuls test, with  $P < 0.05$  as the significance level. Values presented in figures correspond to the average and standard error of the mean. The competition curve was analysed and generated using the program Allfit [36].

### **Acknowledgments**

We would like to thank Alain Fournier (INRS, Institut Armand Frappier) for MALDI-TOF analysis of the 8-azido-ATP-B product. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research. S. Joubert is the recipient of a studentship from Fonds de la recherche en santé du Québec. A. De Léan is the recipient of a Research Chair in Pharmacology from Merck Frosst Canada.

## **References**

- 1 Wedel, B.J., & Garbers, D.L. (2001) The guanylyl cyclase family at W2K. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 215-233.
- 2 Kuhn, M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93, 700-709.
- 3 Kuhn, M. (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol* 99, 76-82.
- 4 Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B.V., Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., & Kuhn, M. (2003) Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111, 1399-1407.
- 5 Moro, C., Polak, J., Richterova, B., Sengenès, C., Pelikanova, T., Galitzky, J., Stich, V., Lafontan, M., & Berlan, M. (2005) Differential regulation of atrial natriuretic peptide- and adrenergic receptor-dependent lipolytic pathways in human adipose tissue. *Metabolism* 54, 122-131.
- 6 Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C.M., & Misono, K.S. (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* 279, 28625-28631.
- 7 De Léan, A., McNicoll, N., & Labrecque, J. (2003) Natriuretic peptide receptor A activation stabilizes a membrane-distal dimer interface. *J Biol Chem* 278, 11159-11166.
- 8 Jossart, C., Coupal, C., McNicoll, N., Fournier, A., Wilkes, B.C., & De Léan, A. (2005) Photolabeling study of the ligand binding domain of natriuretic peptide receptor A: development of a model. *Biochemistry* 44, 2397-2408.
- 9 Qiu, Y., Ogawa, H., Miyagi, M., & Misono, K.S. (2004) Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling. *J Biol Chem* 279, 6115-6123.
- 10 Chinkers, M., & Wilson, E.M. (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant.

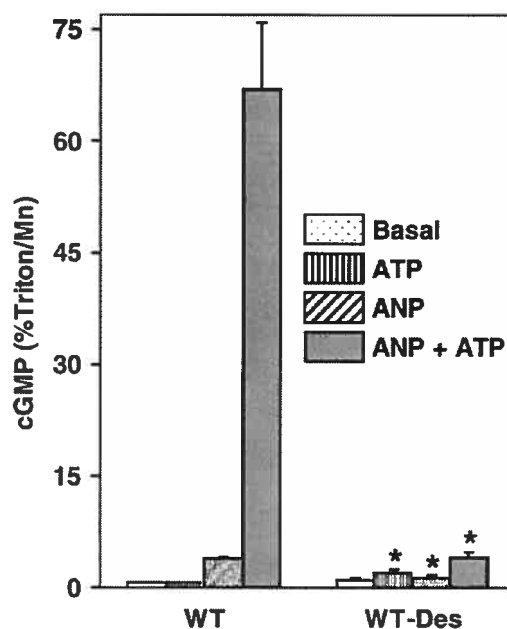
J Biol Chem 267, 18589-18597.

- 11 Wilson, E.M., & Chinkers, M. (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34, 4696-4701.
- 12 Koller, K.J., Lipari, M.T., & Goeddel, D.V. (1993) Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *J Biol Chem* 268, 5997-6003.
- 13 Joubert, S., Labrecque, J., & De Léan, A. (2001) Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* 40, 11096-11105.
- 14 Larose, L., Rondeau, J.J., Ong, H., & De Léan, A. (1992) Phosphorylation of atrial natriuretic factor R1 receptor by serine/threonine protein kinases: evidences for receptor regulation. *Mol Cell Biochem* 115, 203-211.
- 15 Potter, L.R., & Garbers, D.L. (1992) Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem* 267, 14531-14534.
- 16 Potter, L.R., & Hunter, T. (1998) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 18, 2164-2172.
- 17 Bryan, P.M., & Potter, L.R. (2002) The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *J Biol Chem* 277, 16041-16047.
- 18 Potter, L.R., & Hunter, T. (1999) A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Mol Biol Cell* 10, 1811-1820.
- 19 De Lean, A. (1986) Amiloride potentiates atrial natriuretic factor inhibitory action by increasing receptor binding in bovine adrenal zona glomerulosa. *Life Sci* 39, 1109-1116.
- 20 Kurose, H., Inagami, T., & Ui, M. (1987) Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylyl cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS Lett* 219, 375-379.
- 21 Marala, R.B., Sitaramayya, A., & Sharma, R.K. (1991) Dual regulation of atrial natriuretic factor-dependent guanylyl cyclase activity by ATP. *FEBS Lett* 281, 73-76.
- 22 Foster, D.C., & Garbers, D.L. (1998) Dual role for adenine nucleotides in the regulation of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A. *J Biol Chem* 273, 16311-16318.



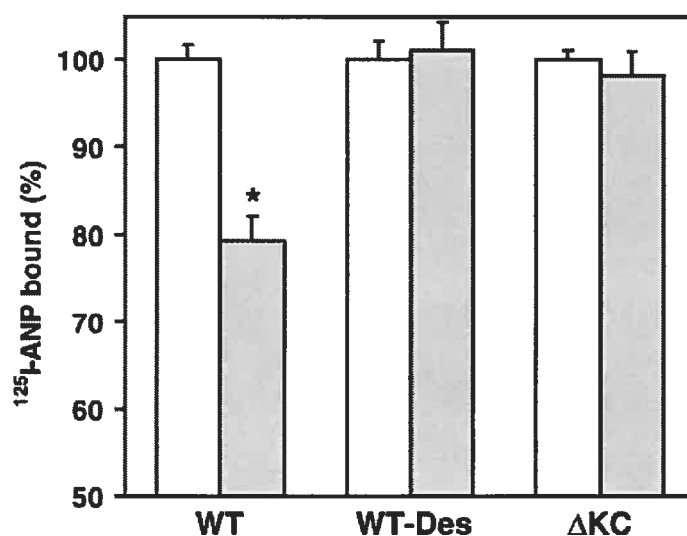
- 23 Chang, C.H., Kohse, K.P., Chang, B., Hirata, M., Jiang, B., Douglas, J.E., & Murad, F. (1990) Characterization of ATP-stimulated guanylyl cyclase activation in rat lung membranes. *Biochim Biophys Acta* 1052, 159-165.
- 24 Chinkers, M., Singh, S., & Garbers, D.L. (1991) Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J Biol Chem* 266, 4088-4093.
- 25 Labrecque, J., Deschenes, J., McNicoll, & De Léan, A. (2001) Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J Biol Chem* 276, 8064-8072.
- 26 Labrecque, J., Mc Nicoll, N., Marquis, M., & De Léan, A. (1999) A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem* 274, 9752-9759.
- 27 Wong, S., Ma, C.-P., Foster, D.C., Chen, A.-Y., & Garbers, D.L. (1995) The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *J Biol Chem* 270, 30818-30822.
- 28 Jewett, J.R., Koller, K.J., Goeddel, D.V., & Lowe, D.G. (1993) Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J* 12, 769-777.
- 29 Larose, L., McNicoll, N., Ong, H., & De Léan, A. (1991) Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions. *Biochemistry* 30, 6990-6995.
- 30 Nussenzveig, D.R., Lewicki, J.A., & Maack, T. (1990) Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 265, 20952-20958.
- 31 Hardman, J.G., Beavo, J.A., Gray, J.P., Chrisman, T.D., Patterson, W.D., & Sutherland, E.W. (1971) The formation and metabolism of cyclic GMP. *Ann N Y Acad Sci* 185, 27-35.
- 32 Schafer, H.-J., Coskun, U., Eger, O., Godovac-Zimmermann, J., Wiczorek, H., Kagawa, Y., & Gruber, G. (2001) 8-N(3)-3'-biotinyl-ATP, a novel monofunctional reagent: differences in the F(1)- and V(1)-ATPases by means of the ATP analogue. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 1218-1227.
- 33 Parkinson, S.J., Carrithers, S.L., & Waldman, S.A. (1994) Opposing adenine nucleotide-dependent pathways regulate guanylyl cyclase C in rat intestine. *J Biol Chem* 269, 22683-22690.

- 34 Ruiz-Stewart, I., Tiyyagura, S.R., Kazerounian, S., Pitari, G.M., Schulz, S., Martin, E., Murad, F., & Waldman, S.A. (2004) Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 37-42.
- 35 Potter, L.R., & Hunter, T. (1999) Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods* 19, 506-520.
- 36 De Léan, A., Munson, P.J., & Rodbard, D. (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 235, 97-102.
- 37 Meloche, S., McNicoll, N., Bin, L., Ong, H., De Léan, A. (1988) Atrial natriuretic factor R1 receptor from bovine adrenal zona glomerulosa: purification, characterization, and modulation by amiloride. *Biochemistry* 27, 8151-8158.
- 38 Goraczniak, R.M., Duda, T., & Sharma, R.K. (1992) A structural motif that defines the ATP-regulatory module of guanylyl cyclase in atrial natriuretic factor signalling. *Biochem J* 282, 533-537.
- 39 Sharma, R.K. (2002) Evolution of the membrane guanylyl cyclase transduction system. *Mol Cell Biochem* 230, 3-30.
- 40 Yamazaki, A., Yu, H., Yamazaki, M., Honkawa, H., Matsuura, I., Usukura, J., & Yamazaki, R.K. (2003) A critical role for ATP in the stimulation of retinal guanylyl cyclase by guanylyl cyclase-activating proteins. *J Biol Chem* 278, 33150-33160.
- 41 Bhandari, R., Srinivasan, N., Mahaboobi, M., Ghanekar, Y., Suguna, K., and Visweswariah, S.S. (2001) Functional inactivation of the human guanylyl cyclase C receptor: modeling and mutation of the protein kinase-like domain. *Biochemistry* 40, 9196-9206.
- 42 Antos, L.K., Abbey-Hosch, S.E., Flora, D.R., & Potter, L.R. (2005) ATP-independent activation of natriuretic peptide receptors. *J Biol Chem* 280, 26928-26932.
- 43 Féthière, J., Meloche, S., Nguyen, T.T., Ong, H., & De Léan, A. (1989) Distinct properties of atrial natriuretic factor receptor subpopulations in epithelial and fibroblast cell lines. *Mol Pharmacol* 35, 584-592.



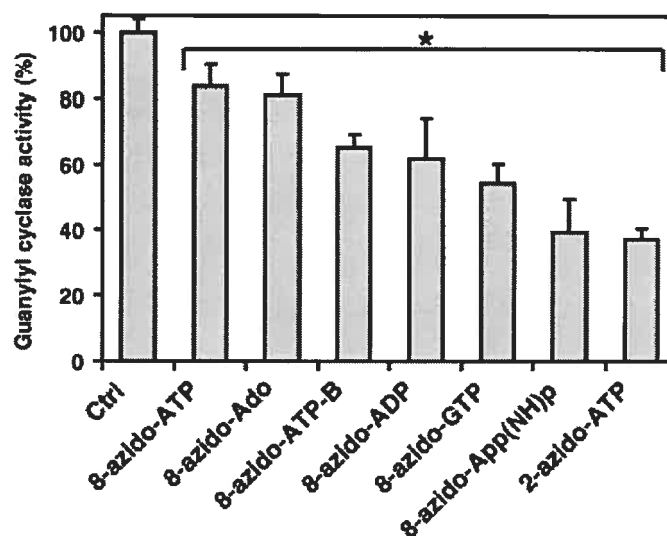
**Figure 6.1** : Desensitization of wild-type natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) and the effect of ATP on membrane guanylyl cyclase activity.

Whole cells stably expressing wild-type NPR-A were treated (WT-Des) or not (WT) with 0.5  $\mu$ M atrial natriuretic peptide (ANP) containing 200 000 counts per minute (c.p.m.) of  $^{125}$ I-labeled ANP for 90 min at 37 °C. Cells were then washed twice in ice-cold 60 mM acetic acid buffer, 500 mM NaCl, pH 3.0, to remove free and bound ANP. Membrane preparations were then made with the cells, as described in the Experimental procedures. Buffers contained a cocktail of nonspecific phosphatase inhibitors to preserve the phosphorylation state of the receptor. No  $^{125}$ I-labeled ANP radioactive signal remained in the membrane preparation, as measured using a gamma counter. Membrane preparations were then used in guanylyl cyclase assays. A total of 5  $\mu$ g of membranes was incubated for 12 min at 37 °C in the presence of theophylline, isobutylmethylxanthine (IBMX), creatine phosphate, creatine kinase, GTP and  $MgCl_2$ . Various experimental conditions were tested, using GTP alone (basal), or by adding 1 mM ATP, 0.1  $\mu$ M ANP, or ATP and ANP together. To determine maximal guanylyl cyclase activity, 1% (v/v) Triton X-100 and 4 mM  $MnCl_2$  were used. cGMP was purified by alumina chromatography and measured by radioimmunoassay. The results were thus normalized as a percentage of maximal activation in Triton/ $Mn^{2+}$ . \*Significant difference when compared with untreated wild-type NPR-A. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of three determinations. The experiment was repeated twice, with similar results obtained on each occasion.



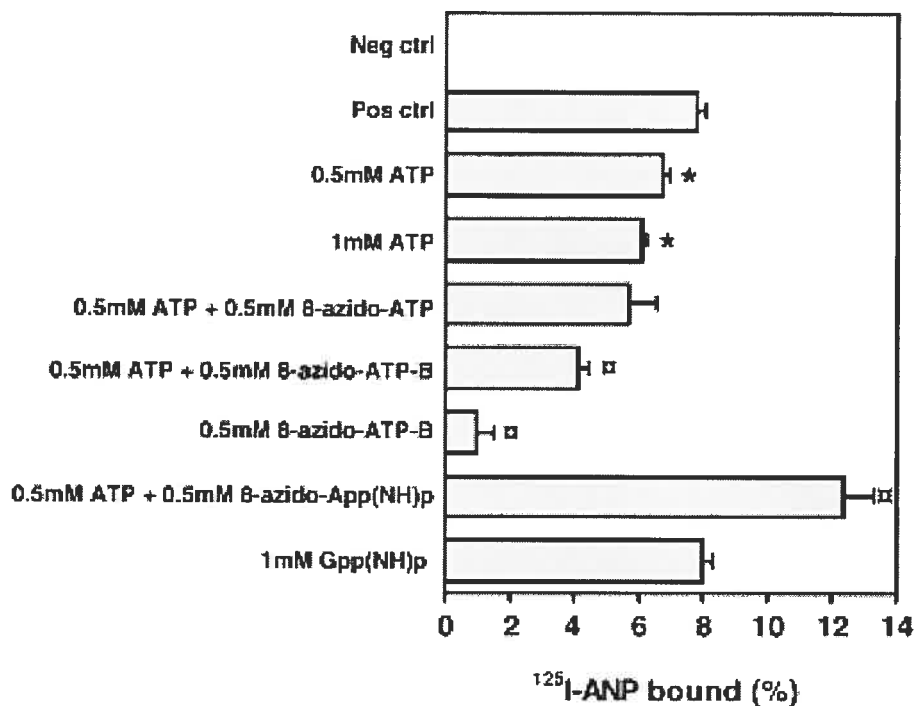
**Figure 6.2 :** Inhibition of  $^{125}\text{I}$ -labeled atrial natriuretic peptide (ANP) binding by ATP.

Membranes (3  $\mu\text{g}$ ) from ANP-desensitized cells (WT-Des), control cells (WT) (Fig. 1), or from cells expressing the  $\Delta\text{KC}$  mutant lacking the intracellular domain ( $\Delta\text{KC}$ ), were incubated, overnight at  $4^\circ\text{C}$ , with 10 fmol  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP with (shaded) or without (open) 0.5 mM ATP. The receptor quantity was  $\approx 5$  fmol. Incubation without ATP was fixed at 100% of bound  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP and represents 3000 counts per minute (c.p.m.) of specific bound  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP 30 000 c.p.m. of  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP included in the assay. Bound radioligand was separated from free radioligand by vacuum filtration on GF/C filters, as described in the Experimental procedures. \*Significant difference when compared with untreated WT. Each column is expressed as the percentage of specific  $^{125}\text{I}$ -labeled ANP binding and represents the mean  $\pm$  SEM of 16 determinations.



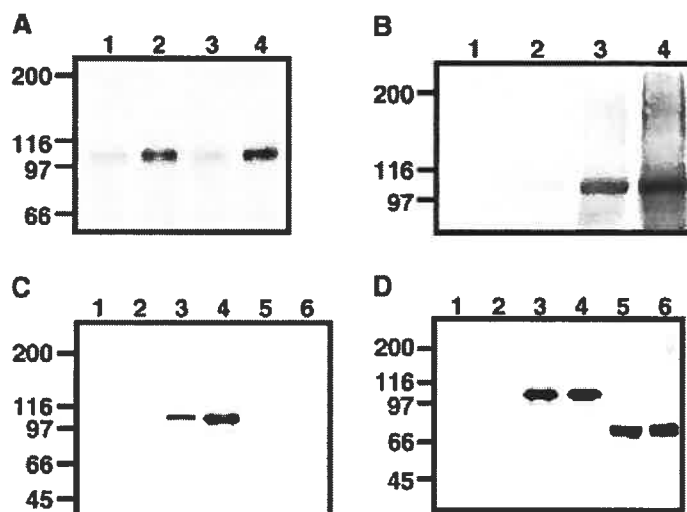
**Figure 6.3 :** Inhibition of guanylyl cyclase activity by azido-containing nucleotides.

Membranes (5  $\mu$ g) from human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing the wild-type natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) were incubated in the dark at 37  $^{\circ}$ C for 12 min in the presence of theophylline, IBMX, creatine phosphate, creatine kinase, GTP, 0.1  $\mu$ M atrial natriuretic peptide (ANP) and  $MgCl_2$ , as described in the Experimental procedures. The control (Ctrl) contained 100  $\mu$ M ATP. A total of 100  $\mu$ M azido-containing nucleotides were added on top of the control to measure the ability of each compound to inhibit ATP-driven guanylyl cyclase activity. The control was taken as 100% activity. \*Significant difference when compared with the ATP incubation. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of triplicates. The experiment was repeated twice, with similar results obtained on each occasion.



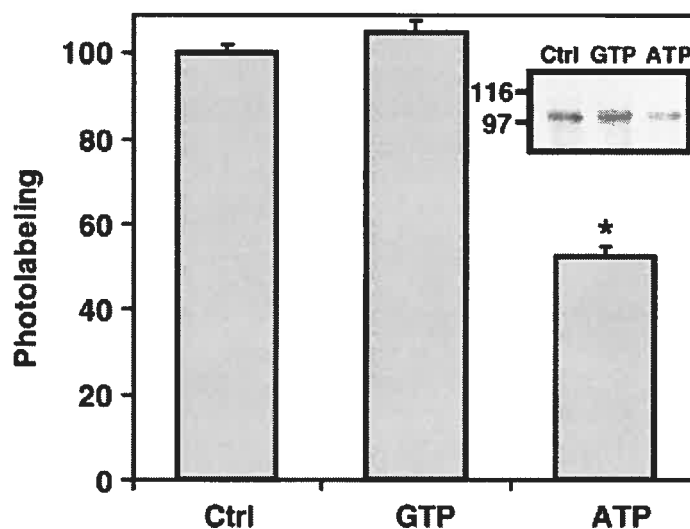
**Figure 6.4 :** The effect of ATP and azido analogues on the binding of <sup>125</sup>I-labeled atrial natriuretic peptide (ANP) to NPR-A-ΔGC.

Membranes (7.5 μg) from human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing (Pos ctrl) the Δguanylyl cyclase (ΔGC) construct were incubated with 10 fmol <sup>125</sup>I-labeled ANP and different nucleotides at the indicated concentrations overnight at 4 °C in the dark. Binding with neo membranes from HEK293 cells is indicated (Neg ctrl). Bound radioligand was separated from free radioligand by vacuum filtration on GF/C filters, as described in the Experimental procedures. \*Significant difference when compared with the positive control; □ indicates a significant difference when compared with the 0.5 mM ATP treatment. Each line is expressed as the percentage binding of specific <sup>125</sup>I-labeled ANP and represents the mean ± SEM of duplicates. This figure is representative of three identical experiments.



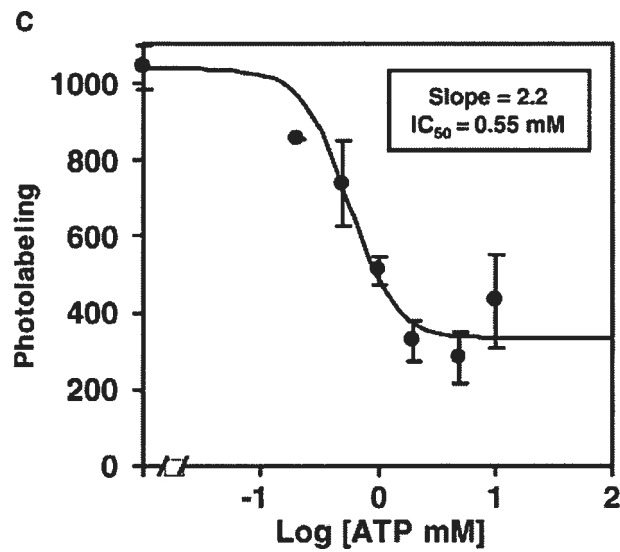
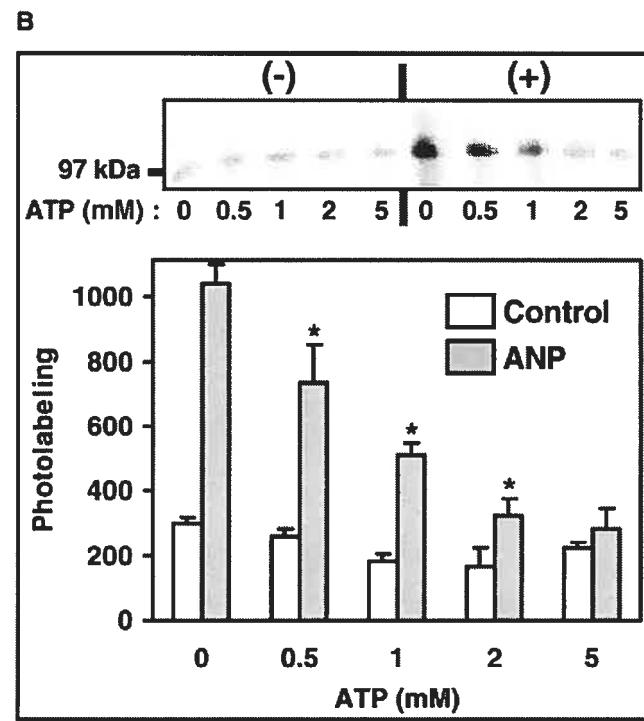
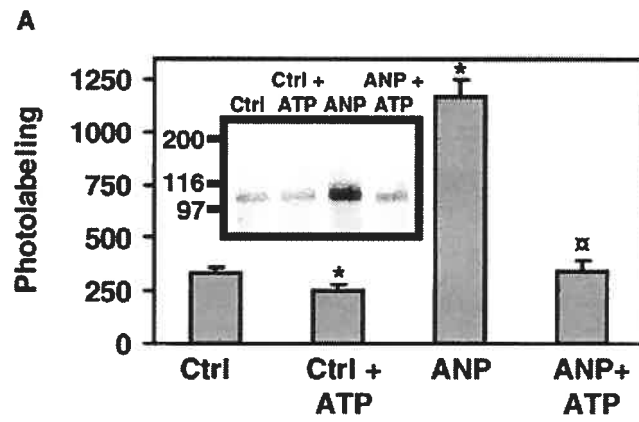
**Figure 6.5 :** Concentration dependence and photoaffinity labeling of the natriuretic peptide receptor-A (NPR-A)- $\Delta$ GC.

(A) Membranes (200  $\mu$ g) from  $\Delta$ guanylyl cyclase ( $\Delta$ GC) expressing human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were incubated with (lanes 2 and 4) or without (lanes 1 and 3) 0.1  $\mu$ M atrial natriuretic peptide (ANP) for 90 min at 22  $^{\circ}$ C in 5 mM  $MnCl_2$  (lanes 1 and 2) or 5 mM  $MgCl_2$  (lanes 3 and 4). Then, 100  $\mu$ M 8-azido-3'-biotinyl-ATP (8-azido-ATP-B) was added and incubated on ice for 5 min, before irradiation with ultraviolet (UV) light, on ice, for 3 min.  $\Delta$ GC was immunoprecipitated with anti-(C-terminal) immunoglobulin after solubilization, separated on 7.5% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP), as described in the Experimental procedures. (B) Membranes were incubated with 0.1  $\mu$ M ANP for 90 min at 22  $^{\circ}$ C and then incubated for 5 min on ice with 8-azido-ATP-B at 1  $\mu$ M (lane 1), 10  $\mu$ M (lane 2), 100  $\mu$ M (lane 3), and 500  $\mu$ M (lane 4), before UV irradiation. The receptor was purified and the signal detected as described for panel A. (C) Membranes from untransfected HEK293 cells (lanes 1 and 2),  $\Delta$ GC-expressing cells (lanes 3 and 4), or  $\Delta$ KC-expressing cells (lanes 5 and 6) were incubated with (lanes 2, 4 and 6) or without (lanes 1, 3 and 5) 0.1  $\mu$ M ANP for 90 min at 22  $^{\circ}$ C and then incubated for 5 min on ice with 100  $\mu$ M 8-azido-ATP-B before UV irradiation. Receptor was purified and signal detected as described for panel A. (D) In parallel to the experiment described for panel C, membranes were separated on 7.5% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and receptor detected by immunoblotting with anti-(C-terminal) immunoglobulin. The molecular mass standards (in kDa) were myosin (200),  $\beta$ -galactosidase (116.3), phosphorylase b (97.4), BSA (66.2), and ovalbumin (45).



**Figure 6.6 :** Specificity of  $\Delta$ guanylyl cyclase ( $\Delta$ GC) photoaffinity labeling. Membranes (200  $\mu$ g) from  $\Delta$ GC-expressing human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were incubated with 0.1  $\mu$ M atrial natriuretic peptide (ANP) for 90 min at 22  $^{\circ}$ C and then incubated on ice for 5 min with 8-azido-3'-biotinyl-ATP-B (8-azido-ATP-B) (Ctrl). GTP (1 mM) or ATP (1 mM) was added for the 5-min incubation period before photolabeling with UV irradiation.  $\Delta$ GC was immunoprecipitated with anti-(C-terminal) antibody after solubilization, separated on 7.5% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP), as described in the Experimental procedures. Arbitrary photolabeling signal from four experiments is plotted as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference when compared with the control. The inset shows the results of one representative experiment. The molecular mass standards (in kDa) were  $\beta$ -galactosidase (116.3) and phosphorylase b (97.4).





**Figure 6.7 : Inhibition of 8-azido-3'-biotinyl-ATP-B (8-azido-ATP-B) photoaffinity labeling of  $\Delta$ guanylyl cyclase ( $\Delta$ GC) by ATP.**

(A) Membranes from human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing  $\Delta$ GC were incubated with or without (Ctrl) 0.1  $\mu$ M atrial natriuretic peptide (ANP) for 90 min at 22 °C and then incubated on ice for 5 min with 8-azido-ATP-B and with or without 10 mM ATP (ATP). Membranes were irradiated with ultraviolet (UV) light and the receptor was then immunoprecipitated with anti-(C-terminal) immunoglobulin after solubilization, separated on 7.5% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP), as described in the Experimental procedures. The \*Significant difference when compared with the control; □ indicates a significant difference when compared with the ANP treatment. Each column represents arbitrary units of photolabeling of the mean  $\pm$  SD of six determinations. The inset shows the results of one representative experiment. (B) The membranes were first incubated with (shaded) or without (clear) 0.1  $\mu$ M ANP, as in panel A, and then incubated with 8-azido-ATP-B with four increasing ATP concentrations, lower than the 10 mM concentration used in panel A. After UV irradiation, receptor was purified and signal detected as in (A). \*Significant difference when compared with the ATP-untreated membranes. Each column represents arbitrary units of photolabeling of the mean  $\pm$  SEM of four determinations. The inset shows the results of one representative experiment. (C) Data obtained for six ATP concentrations (0.2, 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM) were curve fitted using the allfit program [36], according to relative ANP-dependent photolabeling of  $\Delta$ GC. The inset indicates the curve slope and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of ATP. Each data point represents the average arbitrary units of photolabeling of the mean  $\pm$  SEM of five determinations.

**CHAPITRE 7 : Biochemical and pharmacological  
characterization of P-site inhibitors on  
homodimeric guanylyl cyclase domain from  
natriuretic peptide receptor-A**

Simon Joubert, Normand McNicoll, and André De Léan

Accepté pour publication dans *Biochemical Pharmacology* sous certaines  
conditions le 19 octobre 2006

Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec,  
Canada, H3T 1J4

## **Abstract**

Guanylyl cyclases catalyze the formation of cGMP from GTP. This family of enzymes includes soluble (sGC) and particulate guanylyl cyclases (pGC). The sGC are heterodimers containing one active catalytic site and one inactive pseudo-site. They are activated by nitric oxide. The pGC are homodimers whose activity is notably regulated by peptide binding to the extracellular domain and by ATP binding to the intracellular kinase homology domain (KHD). The catalytic mechanism of the pGC is still not well understood. Homology modeling of the structure of the homodimeric guanylyl cyclase domain, based on the crystal structure of adenylyl cyclase, suggests the existence of two functional sites for the substrate GTP. We used a purified and fully active recombinant catalytic domain from mammalian pGC, to document its enzyme kinetics properties in the absence of the KHD. The enzyme presents positive cooperativity with the substrate Mg-GTP. However a heterodimeric catalytic domain mutant (GC-HET) containing only one active catalytic site is non-cooperative and is more similar to sGC. Structure-activity studies of purine nucleoside analogs indicate that 2'd3'GMP is the most potent inhibitor of pGC tested. It displays mixed non-competitive inhibition properties that are potentiated by the second catalytic product inorganic pyrophosphate (PPi). It appears to be equivalent to purinergic site (P-site) inhibitors characterized on particulate adenylyl cyclase. Inhibition of pGC by 2'd3'GMP in the presence of PPi is accompanied by a loss of cooperative enzyme kinetics. These results are best explained by an allosteric dimer model with positive cooperativity for both the substrate and inhibitors.

**Abbreviations** : sGC, soluble guanylyl cyclase ; pGC, particulate guanylyl cyclase ; PPI, inorganic pyrophosphate ; 2'd3'GMP, 2'-deoxy-3'-guanosine monophosphate ; 2'd5'AMP, 2'-deoxy-5'-adenosine monophosphate ; 2'd5'GMP, 2'-deoxy-5'-guanosine monophosphate ; 2'5'dd3'AMP, 2'5'-dideoxyadenosine-3'-monophosphate ; GC-A, guanylyl cyclase A ; NPR-A, natriuretic peptide receptor A ; GC-C, guanylyl cyclase C or guanylin/enterotoxin receptor ; ANP, atrial natriuretic peptide ; GC-E, guanylyl cyclase E ; retGC-1, retinal guanylyl cyclase ; KHD, kinase homology domain ;  $k_{cat}$ , catalytic constant ;  $S_{0.5}$ , Michaelis-Menten constant ;  $K_i$ , inhibition or dissociation constant of inhibitor ;  $V_{max}$ , maximal enzyme activity.

**Keywords:** Guanylyl cyclase, natriuretic peptide, P-site inhibitor, nucleotide, purine, catalysis, protein dimer

## **Introduction**

Guanylyl cyclases are a family of enzymes that catalyze the formation of 3': 5'-cyclic GMP from GTP. In mammalian systems, two general topological variants of the enzyme are found. Soluble guanylyl cyclases (sGCs) are heterodimers composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Each subunit contains an N-terminal regulatory heme binding domain, a dimerization domain and a C-terminal catalytic domain. Enzyme activity is greatly enhanced by binding of nitric oxide to the N-terminal regulatory domain [1]. The subunits are only partly homologous and they contain complementary mutations in key residues of their catalytic sites, such that only one site is active, while the other pseudo-site is inactive, but could bind purine nucleotides and other allosteric molecules [2-4].

In particulate guanylyl cyclases (pGCs), a single transmembrane domain divides the molecule into an extracellular ligand binding domain and an intracellular region containing a protein kinase homology domain (KHD), an amphipathic coiled-coil, and a guanylyl cyclase catalytic domain, with a C-terminal extension for several specific isoforms. Seven genes for pGCs are found in mammals [5]. All mammalian pGCs are believed to function as homodimers or homo-oligomers [5]. Invertebrate guanylyl cyclases are numerous. They are involved in neuronal signalling and display atypical properties [6-7].

sGCs and pGCs both produce cGMP and have ~50% catalytic domain sequence identity [8]. But modeling and comparison of their catalytic domain structures suggests that, contrary to the sGCs which contain only one functional GTP binding site, pGCs would contain two potentially functional GTP binding sites [8]. In agreement with this concept, enzyme kinetics for pGC typically displays positively cooperative behaviour, especially in the presence of  $Mn^{2+}$ . However, in the case of both sGC and pGC, no crystallographic data has been reported yet and current models are solely derived by homology modeling with adenylyl cyclase structure.

Direct inhibition of adenylyl cyclase by purine nucleotides (P-site inhibitors) has been previously documented. Some purine nucleotides act as substrate analogs that mainly compete with the substrate at the catalytically active

site in its free state. Other agents termed P-site inhibitors have been extensively studied [9-11]. These inhibitors are generally non-competitive or uncompetitive, suggesting that they might bind to the post-transition state of the enzyme. Their potency is typically increased in the presence of the second catalytic product inorganic pyrophosphate. Some of the most potent P-site inhibitors are 2',5'-dideoxy-adenosine-3'-mono- and 3'-polyphosphates [12]. Structural and functional studies have led to an elegant model for their action. According to those studies, P-site inhibitors bind directly to the active catalytic site in replacement for the main product 3',5'-cyclic-AMP and prior to the release of the other product inorganic pyrophosphate [13-14]. This would result in a product dead end inhibition mechanism, which could explain the mixed-competitive behaviour of these inhibitors. Initial results have documented that the heterodimeric sGC, which is more analogous to adenylyl cyclase than pGC, can also be inhibited by the corresponding agent 2'd3'GMP [15]. However, no structure-activity relationships or enzyme kinetics studies of P-site inhibitors for the homodimeric pGC have been reported. Since both sites for pGC are presumably functional and equivalent, this suggests that more complex inhibitory mechanisms involving site-site interactions might be involved for pGC.

In this report, we aimed to characterize the catalytic activity of the purified guanylyl cyclase homodimeric domain of pGC from the natriuretic peptide receptor-A (NPR-A or GC-A) in the absence of the KHD which also binds purine nucleotides, and to study the properties of P-site inhibitors and substrate analogs for this enzyme. The results indicate that positive cooperativity is observed with the natural substrate Mg-GTP. This cooperativity requires both catalytic sites to be functional. In addition, P-site inhibitors display mainly competitive inhibition, an effect that is potentiated by the second catalytic product pyrophosphate (PPi). Positive cooperativity is countered by the presence of P-site inhibitors and PPi. The results are consistent with a dimeric cooperative model for which the substrate and the inhibitor could bind to both catalytic sites of homodimeric pGC.

## **Materials and methods**

### **Materials**

2'd5'GMP, 2'd3'GMP, 2'd5'AMP, 2'AMP, 3'AMP, 2'5'dd3'AMP, 2'3'dideoxy adenosine, 5'ATP, 5'-AMP, 5'GMP, 5'GTP, PPI and guanosine 3'5'cGMP were from Sigma. Guanosine and guanosine 2', (3')-monophosphate (a mixture of the 2'- and 3'-isomers of GMP) were from ICN Biomedicals, and 2', 3'-dideoxyguanosine was from Axxora.

### **Plasmid constructs and site-directed mutagenesis**

Mammalian expression vector containing the rat NPR-A was the same as previously reported [16]. The guanylyl cyclase catalytic domain of NPR-A (GC-A) (amino acids Asn<sup>776</sup> to Gly<sup>1029</sup>) was amplified using the following strategy : PCR was done with two sense primers made of an excess (25 pmoles) of 5'-AAAAGAATTCAACATGAACCATCACCATCACCATCACAAC-3' and a limiting amount (250 fmoles) of 5'-CCATCACCATCACCATCACAACAGCAGCAACATCCTGGACAAC-3', and one antisense primer (5'-TTTTGGTACCTCAGCCTCGAGTGCTACATCC-3') to introduce an *EcoRI* restriction site followed by six histidine residues at the N-terminal, and a *KpnI* restriction site after the C-terminal stop codon. The *EcoRI* / *KpnI* co-digested fragment was ligated into the pFastBac1 vector (Invitrogen) to obtain the GC-WT construct. The D<sup>849</sup>A mutated protein was obtained using the QuickChange method (Stratagene) with two mutant oligonucleotides (5'-GTTACCATCTACTTCAGTGCTATTGTGGGCTTTACAGCTC-3' and 5'-GAGCTGTAAAGCCCACAATAGCACTGAAGTAGATGGTAAC-3'). The N<sup>968</sup>S mutation was obtained using the same method (5'-CTCTTTGGAGACACAGTCAGCACAGCTTCAAGAATGGAG-3' and 5'-CTCCATTCTTGAAGCTGTGCTGACTGTGTCTCCAAAGAG-3'). The histidine-tag of the N<sup>968</sup>S mutated protein was then replaced by a Protein C epitope (EDQVDPRLIDGK) using the following strategy : PCR was done with two sense primers made of an excess (25 pmoles) of 5'-AAAAGAATTCAACATGGAGGACCAGGTCGATCCGCGTCTGATTGATGG-3' and a limiting amount (250 fmoles) of 5'-CGATCCGCGTCTGATTGATGGCAAGAACAGCAGCAACATCCTGGACAA



CC-3', and one antisense primer (5'-TTTTGGTACCTCAGCCTCGAGTGCTACATCC-3'). The *EcoRI* / *KpnI* co-digested fragment was ligated into the pFastBac1 vector (Invitrogen) to obtain the GC-N<sup>968</sup>S construct. Sequences were confirmed using automated nucleic acid sequencing. Constructs with pFastBac1 were transformed in DH10Bac bacteria to obtain recombinant bacmid DNA according to the Invitrogen baculovirus expression system.

### **Transfection of Sf9 insect cells and titration of recombinant baculovirus by protein expression**

Sf9 cells were grown in SF-900 II SFM medium (Gibco) containing penicillin and streptomycin on a rotating shaker at 28°C. For each transfection,  $9 \times 10^5$  cells were seeded in a 6-well plate and allowed to attach for at least 1 h. Recombinant bacmid DNA was transfected into Sf9 insect cells using Cellfectin reagent as described for the pFastBac baculovirus expression system (Invitrogen). In order to maximize the expression levels of GC's in Sf9 cells, we tested the ratio of recombinant baculovirus over Sf9 cells by sequential dilution. Briefly, Sf9 cells ( $2 \times 10^6$ ) were plated in 35 mm petri dishes and increasing amounts of recombinant baculovirus were added. After 72 h, medium was removed and cells were washed once with PBS, resuspended in Laemmli sample buffer and submitted to electrophoresis as described below. After the Western blot (see below), bands corresponding to the protein of interest were evaluated by densitometry. The dilution corresponding to the maximum level of expression was used to scale up the production of GCs.

### **Expression of guanylyl cyclase in Sf9 cells**

Sf9 cells ( $5 \times 10^7$ ) were incubated in 100 ml of SF-900 II SFM medium in a 250 ml Erlenmeyer flask on a rotating shaker for 48 h at 28°C. Typically, 1 ml of recombinant baculovirus was added and the incubation was prolonged for another 72 h. Then, Sf9 cells ( $2 \times 10^8$ ) expressing GC-WT, GC-N<sup>968</sup>S, and the heterodimer GC-D<sup>849</sup>A-N<sup>968</sup>S were centrifuged at 500 g's for 5 min and washed twice with PBS. Cells were homogenized using a polytron in 40 mL of 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 μM aprotinin, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin and 10 μM Pefabloc. After centrifugation at 40000g for 30 min,

cytosolic fraction was passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter and kept at 4°C until use. For Sf9 cells expressing GC-D<sup>849</sup>A, homogenization was performed in 40 mL of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl containing protease inhibitors and processed as described above.

### **Purification of guanylyl cyclases**

GC-WT, GC-N<sup>968</sup>S and the heterodimer GC-D<sup>849</sup>A-N<sup>968</sup>S, which all contain a histidine-tag, were purified on Ni-NTA agarose as follows: After addition of 15% glycerol and 20 mM imidazole, each cytosolic fraction was loaded on a 1 mL Ni-NTA column. The gel was washed with 10 mL of 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM imidazole and the GC was eluted with 10 mL of 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 200 mM imidazole and collected in fractions of 1 mL. Typically the guanylyl cyclase eluted from Ni-NTA column in fractions 2 and 3 as determined by immunoblot analysis.

GC-D<sup>849</sup>A and the heterodimer GC-D<sup>849</sup>A-N<sup>968</sup>S (previously purified on Ni-NTA and dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl) both containing the Protein C epitope were purified on anti-Protein C agarose as follows : After addition of 10 % glycerol and 1 mM CaCl<sub>2</sub>, each preparation was loaded on a 1 mL anti-protein C column. The gel was washed with 10 mL of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and eluted at 22°C with 6 mL of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl and 10 mM EDTA and collected in fractions of 1 mL. In these conditions, guanylyl cyclase eluted from the anti-Protein C column in fraction 2.

### **Steric exclusion HPLC**

GC-WT, GC-D<sup>849</sup>A, and GC-N<sup>968</sup>S were further purified by steric exclusion chromatography on Superose-12, while the heterodimer GC-D<sup>849</sup>A-N<sup>968</sup>S (purified by the two sequential affinity chromatography steps) was tested for its purity and monitored for its exclusion volume on the same column. Chromatography on the Superose-12 was performed at 4°C in 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.4, 300 mM NaCl and 0.1 mM EDTA with a flow rate of 0.5 mL/min. Optical densitometry was monitored at 280 nm using a Lambda-Max spectrophotometer (Waters). Protein concentrations for each purification step were determined using

the BCA protein assay kit (Pierce) and confirmed using Dot Blot analysis. Coomassie staining of proteins in analytical SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis confirmed the high degree of purity of the GC's. Proteins migrated at approximately 29 kDa on a 12% polyacrylamide gel (Figure 1).

### **Immunoblot analysis**

For the Western blot, protein samples were solubilized in Laemmli sample buffer (62 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 % glycerol, 0.001 % bromophenol blue, pH 6.8) and heated at 100°C for 3 min. Electrophoresis was performed in 10 % polyacrylamide gel and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using the liquid Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Detection of GC's was achieved using an affinity-purified antibody from a rabbit polyclonal antiserum raised against the C-terminal sequence of the particulate guanylyl cyclase NPRA. Specific signal was probed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody, according to the ECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences). For the Dot Blot, proteins were boiled for 3 min in 6 M urea and blotted on nitrocellulose using the Bio-Dot Apparatus (Bio-Rad). Detection of GC's was performed as described above.

### **Guanylyl cyclase activity**

Assays were performed in a final volume of 100  $\mu$ L buffer containing 25 mM HEPES pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.1 % BSA and an excess of 4 mM  $MgCl_2$  or  $MnCl_2$ . Purified guanylyl cyclases, GTP, nucleotides or analogs were added as indicated in the results section. No GTP regenerating system or phosphodiesterase inhibitor was added since they were not needed with pure enzyme preparation. After 10 min incubation at 37°C, reactions were stopped by the addition of 500  $\mu$ L of 110 mM zinc acetate followed by 500  $\mu$ L of 110 mM sodium carbonate [17]. Tubes were then centrifuged at 12000g for 2 min and 50  $\mu$ L of supernatant was radio-immunoassayed for cyclic GMP content [18]. Concentrations of cGMP were corrected for the recovery, using an external standard of cGMP processed in the same manner throughout the steps. The recovery of cGMP varied from 60 % to 70 %.

## Statistical analysis

Statistics were performed by ANOVA, followed by multiple comparisons using the Student Newman Keuls test, with  $P < 0.05$  as the significance level. Values presented in figures correspond to the average and standard error of the mean from duplicates. Parameter estimates presented in tables are averages of values obtained in replicate experiments involving two separate batches of purified GC catalytic domain. Curve fitting of enzyme kinetics data for substrate and inhibitors was performed by nonlinear least squares regression using the program AllFit [19]. For substrate enzyme kinetics, the curves for the time course of product formation ( $v$ ) as a function of substrate concentration ( $S$ ) were therefore analyzed according to Hill's equation:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + S^{n_H}}$$

where  $S_{0.5}$  is the equivalent of the Michaelis-Menten coefficient for cooperative kinetics,  $V_{\max}$  is the maximum enzyme production rate and  $n_H$  is Hill's coefficient. For inhibition curves, data were then analyzed according to the equation:

$$v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^n}$$

where  $v_0$  is the initial rate of product formation in the absence of inhibitor,  $I$  is the concentration of inhibitor,  $IC_{50}$  is the inhibitor concentration at the midpoint of the curve and  $n$  is the slope factor for the inhibition curve. Estimation of apparent inhibition constants for inhibitors was obtained according to Segel [20].  $K_i$  estimates were calculated using:

$$K_i = \frac{I}{\frac{V_{\max}}{V_{\max}^*} \cdot \frac{S_{0.5}^*}{S_{0.5}} - 1}$$

where  $S_{0.5}^*$  and  $V_{\max}^*$  are the estimates for the  $S_{0.5}$  and the  $V_{\max}$  in the presence of the inhibitor at concentration  $I$ .

## **Results**

### **Purified guanylyl cyclase domain of pGC (GC-A) is fully active**

The structure of pGC or sGC catalytic domain has not yet been experimentally determined. But the crystal structure of the rat type II adenylyl cyclase C2 catalytic domain was used to obtain a molecular model. pGC was proposed to form an active dimer with two active sites by complementation of the two identical GC moieties [8]. A hinge region preceding the catalytic domain is providing a coiled-coil which favours dimerization and which was shown to be required for catalytic activity [21]. In addition, the kinase homology domain (KHD) located upstream of the hinge helical region is an ATP binding site which allosterically modulates catalytic activity [5, 22] and which could potentially bind other purine nucleotides. In order to specifically study the regulation of purine nucleotides on GC catalysis, we generated a truncated mutant containing only the hinge helical region and the guanylyl cyclase catalytic domain of GC-A. The mutant GC-WT was expressed in Sf9 insect cells and purified to homogeneity (Figure 1). GC-WT was expected to be fully active because it has been shown that when the kinase-like domain of NPR-A is deleted by mutagenesis, the resulting receptor protein displays high constitutive guanylyl cyclase activity [23]. However this activity is independent of the agonist ANP and its stimulation by ATP is abolished [23]. Thus this truncated mutant should represent the full catalytically active form of pGC.

Consistent with this model, we found that this GC-WT construct was constitutively active and stable. When cGMP production was assessed as a function of GTP concentration, we obtained a  $V_{\max}$  of  $28 \pm 2$   $\mu\text{moles/mg/min}$  and a  $S_{0.5}$  of  $0.37 \pm 0.07$  mM (Table 1). GC-WT remained fully active when stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for one year. The specific activity observed was therefore favourably comparable to that reported for ANP+ATP-activated full-length GC-A expressed and purified from Sf9 insect cells ( $4.3$   $\mu\text{moles cGMP formed/mg/min}$ ) [17]. Most experiments were performed using  $\text{Mg}^{2+}$  as the divalent cation as it is the natural cellular divalent cation and also because enzyme kinetics profiles of sGC or adenylyl cyclase can be very different in the presence of other divalent cations [13, 24]. In fact, when we measured cGMP production using  $\text{Mn}^{2+}$ -GTP as

substrate, kinetic parameters were drastically different. The  $S_{0.5}$  was reduced 22-fold and the  $V_{max}$  was reduced 1.5-fold (Table 1).

### Positive cooperativity in GC-WT domain

Kinetic analysis of cGMP production for the GC-WT construct also yielded a Hill slope of  $1.4 \pm 0.01$  and an upward concave double reciprocal, which suggests positive cooperativity (Figure 2). This is consistent with the enzyme having two active sites for GTP. We then wondered what would happen to this apparent cooperativity if pGC only had one active site. Two mutually complementary mutations were used to selectively inactivate one catalytic site in a heterodimeric pGC. In the model described for adenylyl cyclase, the residue Asp<sup>396</sup>, present only in C1a domain, stabilizes an Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> ion required for binding the phosphate chain of ATP and PPi. It also stabilizes the transition state [25]. Mutation of this residue results in an approximately 1800-fold drop in enzyme catalytic efficacy.  $S_{0.5}$  is 8-fold higher while  $V_{max}$  is 210-fold lower [25]. Also, the residue Asn<sup>1025</sup> present only in C2 domain stabilizes the transition state [11, 25-26]. Mutation of this residue results in a 40-fold reduction of  $V_{max}$ , with no change in  $S_{0.5}$  [26]. Those two residues are located on separate domains C1 and C2. Once combined as a hetero-complex, they contribute to the single catalytic site of adenylyl cyclase, while the other pseudo-site is catalytically inactive, but is the site for forskolin binding. This pseudo-site could potentially be occupied by nucleotides in the absence of forskolin. A similar conformation is observed in sGC [3, 15]. Indeed, it was recently documented that sGC displays both a high affinity and a low affinity binding site for nucleotides [4].

In GC-WT, the corresponding residues Asp<sup>849</sup> and Asn<sup>968</sup> are conserved in both GC subunits. Two active sites could then be formed when the GC subunits assemble in a head-to-tail conformation. Thus, to yield only one active site, we co-expressed the mutants GC-D<sup>849</sup>A and GC-N<sup>968</sup>S, including a Protein C tag or a histidine tag, respectively, to allow selective purification of the heterodimer (GC-HET) by sequential purification on Ni-NTA agarose and anti-Protein C agarose (Figure 1). GC-D<sup>849</sup>A and GC-N<sup>968</sup>S homodimers were also expressed and purified to homogeneity (data not shown). The D<sup>849</sup>A mutation completely abolished guanylyl cyclase activity (Table 1). The N<sup>968</sup>S mutation yielded a

protein almost 180-fold less catalytically active than the GC-WT, with a  $S_{0.5}$  increased almost 2-fold and a  $V_{max}$  reduced 88-fold. The heterodimer (GC-D<sup>849</sup>A-N<sup>968</sup>S or GC-HET) showed catalytic activity similar to GC-WT, i.e.  $k_{cat}/S_{0.5}$  values were not significantly different (Table 1). The  $S_{0.5}$  was improved 5.5-fold but the  $V_{max}$  was reduced 7-fold. When cGMP production of GC-HET was plotted against Mg-GTP concentration, we found a Hill slope of  $1.0 \pm 0.06$  and a linear double reciprocal plot, suggesting that the GC-HET has lost the cooperative catalytic behaviour observed for GC-WT (Figure 2, Table 1). These results show that two functional GTP binding sites are required for the cooperative catalytic process.

### **Structure-activity profile of P-site inhibition of GC-WT by nucleosides**

Adenylyl cyclase is strongly inhibited by P-site inhibitors. Characteristic of potent P-site inhibitors is their higher potency observed in the presence of inorganic pyrophosphate [11]. It has been proposed that pyrophosphate (PPi), which is produced along with cAMP during catalysis, stabilizes a dead-end complex of adenylyl cyclase with the inhibitor [11]. It has been shown that soluble guanylyl cyclase is inhibited by 2'd3'GMP [15, 27], and by physiological concentrations of ATP (1-2 mM) [28]. However, no detailed structure-activity relationships of inhibition by purine derivatives have been reported for pGC. Since pGC is homodimeric with two active sites, inhibition patterns of pGC purine derivatives might depart from those for sGC and adenylyl cyclase, which provide only a single active site. We therefore explored inhibition of GC-WT catalytic activity by commercially available adenosine and guanosine analogs. Each nucleoside was examined in experiments where guanylyl cyclase activity was measured with varying concentrations of the nucleoside, with or without adding a cellular concentration of inorganic pyrophosphate (0.3 mM) [29].  $IC_{50}$  measured for each inhibitor is shown in Table 2. Inhibition curves in the presence of pyrophosphate are shown in Figure 3. Pyrophosphate (PPi) alone was characterized by an  $IC_{50}$  of 1.4 mM. ATP showed a weak  $IC_{50}$  of 3.3 mM, and addition of pyrophosphate did not improve its  $IC_{50}$ . Pyrophosphate did not improve inhibition by 2'd5'AMP or 2'd5'GMP (Table 2), and no inhibition was observed with 2'd3'AMP, with or without pyrophosphate. However, four

guanosine-containing compounds tested were potentiated when pyrophosphate was present. 2'3'dideoxyguanosine, guanosine, the isomer mixture guanosine-2'(3')-monophosphate, and 2'd3'GMP were all potentiated when 0.3 mM pyrophosphate was present, improving their  $IC_{50}$  2- to 8-fold (Table 2). The best inhibition for the available compounds was obtained with 2'd3'GMP in the presence of pyrophosphate (0.083 mM, Table 2). These experiments indicate that guanosine analogs of P-site agents inhibit pGC with micromolar potency. Favourable characteristics include a guanine moiety, a 2'-deoxy, the absence of 5'-phosphate and the presence of 3'-phosphate. The results are in agreement with P-site inhibition of adenylyl cyclase by adenosine analogs [10].

Further analysis reveals that 2'd3'GMP behaves as a mixed non-competitive inhibitor (Figure 4). 2'd3'GMP dose-dependently increases the  $S_{0.5}$  for GTP ( $p < 0.01$ ). Pyrophosphate at 0.3 mM also increases the  $S_{0.5}$  for GTP ( $p < 0.05$ ). In addition, pyrophosphate potentiates the effect of 2'd3'GMP on  $S_{0.5}$  from 2.3 to 8.7-fold ( $p < 0.01$ ). On the other hand, both 2'd3'GMP and pyrophosphate decrease the  $V_{max}$  for GTP ( $p < 0.01$  for both agents). However, pyrophosphate does not potentiate the inhibitory effect of 2'd3'GMP on  $V_{max}$  (26 % vs 17% decrease, NS). From this data the estimated  $K_i$  for 2'd3'GMP alone is  $0.49 \pm 0.01$  mM (Figure 4A) and  $0.068 \pm 0.015$  mM in the presence of PPi (Figure 4B). In the presence of 2'd3'GMP alone, the kinetic curves remain positively cooperative ( $n_H = 1.5 \pm 0.01$ ) with curvilinear double reciprocal plots (Figure 4A). The presence of pyrophosphate attenuates or abrogates ( $p < 0.05$ ) the positive cooperativity ( $n_H = 1.1 \pm 0.06$ ) of the enzyme kinetics, as documented by the linear double reciprocal plots (Figure 4B).

### **2'd3'GMP P-site mixed inhibition requires only one active site**

To further investigate the mechanism of 2'd3'GMP P-site inhibition on pGC, we compared its inhibitory effect on GC-WT (two active sites) and GC-HET (one active site). Inhibition curves with and without added pyrophosphate were obtained for GC-WT and GC-HET (Figure 5). The  $IC_{50}$  values found for GC-HET ( $0.38 \pm 0.06$  mM without added pyrophosphate and  $0.072 \pm 0.002$  mM with pyrophosphate, figure 5B) were similar to the values found for GC-WT ( $0.43 \pm 0.07$  mM in the absence of pyrophosphate and  $0.083 \pm 0.014$  mM with



pyrophosphate (Table 2 and figure 5A). Dixon plots shown to the right in figure 5 indicate that in each case the slope is increased when pyrophosphate is added, documenting that pyrophosphate greatly improves the effect of 2'd3'GMP and reduces to a great extent the estimated  $K_i$ . These results indicate that 2'd3'GMP inhibition requires only one active site on pGC and that 2'd3'GMP binds directly to the active site which it inhibits. Binding of GTP or 2'd3'GMP to the inactive site is however not excluded.

## **Discussion**

Positively cooperative GC enzyme kinetics in the presence of excess  $Mn^{2+}$  is a well-known property of crude or solubilized preparations of particulate guanylyl cyclase from various tissues [30-33]. A Hill slope of about 2.0 is commonly obtained [30].  $Mn^{2+}$  was initially used in studies of sGC or pGC because guanylyl cyclase activity in enzyme preparations was often undetectable in the presence of  $Mg^{2+}$  [31]. Positively cooperative enzyme kinetics is also observed, although less pronounced, when the natural substrate  $Mg^{2+}$ -GTP is used [30, 34]. Here, we demonstrate positively cooperative enzyme kinetics using  $Mg^{2+}$ -GTP with a Hill slope of 1.4, only requiring the guanylyl cyclase catalytic domain. Cooperativity was more obvious in  $Mn^{2+}$ -GTP with a Hill slope of 1.8 (Table 1). Our results also indicate that the helical hinge region and the catalytic guanylyl cyclase domain are sufficient to obtain a functional dimer with full cooperative properties. In the present study with pGC,  $Mn^{2+}$ -GTP behaved as a more potent substrate than  $Mg^{2+}$ -GTP. As described in the crystal structure of adenylyl cyclase,  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  ions generate distinct conformations of the active site. The AC- $\beta$ LddATP-Mn crystal generated by Tesmer et al. shows increased electron density at the described B metal site, which contains the phosphate side chain of the nucleotide and the  $Mn^{2+}$  ion [25]. However, sGC has been shown to catalyse the formation of cAMP from ATP when  $Mn^{2+}$  is present but not with  $Mg^{2+}$  [35].  $Mn^{2+}$  thus seems to reduce the nucleotide specificity of nucleotide cyclases by pulling the nucleotide away from the hydrophobic purine-binding pocket more towards the residues, which together with  $Mn^{2+}$ , coordinate the nucleotide phosphate chain. It is possible that reduction of both  $K_m$  and  $V_{max}$  with  $Mn^{2+}$ -GTP as substrate might be due to tighter binding of both the substrate GTP and the inhibitory by-product pyrophosphate.

Sunahara et al. previously documented that heterodimeric sGC is inhibited by 2'd3'GMP but not by 2'd3'AMP [15]. Substrate specificity between sGC and adenylyl cyclase can be exchanged by modification of two or three amino acid residues of the catalytic domain that interact with the purine moiety [27]. Interestingly, we were unsuccessful in converting the pGC (GC-A) into an adenylyl cyclase using these mutations (unpublished observations). When sGC was converted to an efficient adenylyl cyclase, specificity of P-site inhibitors was also altered, indicating that these agents target the substrate binding site of nucleotide cyclases [15].

In agreement with those reports based on heterodimeric sGC, our results indicate that P-site inhibition of homodimeric pGC is conserved in purified GC domain, and thus does not involve the nucleotide binding site of the KHD. The GC-HET construct was designed to contain mutations that inactivate one of the two potential active sites of pGC. One of these mutations (D<sup>849</sup>A) presumably also reduced binding of inorganic pyrophosphate and of the triphosphate chain of GTP to the inactive site. This is based on the crystal structure of adenylyl cyclase in the presence of ATP analogs, which indicates that the corresponding Asp<sup>396</sup> would effectively stabilize pyrophosphate binding [11, 25]. The fact that P-site inhibition was equally effective on GC-HET suggests that inhibition occurs directly on the remaining active site. Although catalysis is precluded at the second active site on GC-HET, we presume that nucleotide binding might still occur with a lower affinity, because the determinants of purine binding are still present. In this respect, GC-HET closely mimics sGC conformation and could also be allosterically inhibited by nucleotide binding to the inactive pseudo-site, but with lower potency. Consistent with this idea, a recent report by Chang et al. elegantly described occupation of the non-catalytic pseudo-symmetric site of sGC by nucleotides [2]. The inhibition of sGC by ATP $\gamma$ S was removed by a single mutation targeting the other aspartate residue that coordinates Mg<sup>2+</sup>. The mutation of two residues that are known to dictate nucleotide selectivity also lead to a loss of allosteric inhibition [2]. Interestingly, when the enzyme kinetics parameters obtained for the GC-WT and GC-HET are compared with those for the SNAP-activated sGC [2], the  $V_{\max}$  and  $S_{0.5}$  values obtained for the SNAP-activated sGC more closely resemble the values obtained for GC-HET. When  $S_{0.5}$  and  $V_{\max}$  are compared, the GC-WT shows an 18-fold and 20-fold difference, respectively,

whereas GC-HET shows only a 3-fold difference for both parameters. The reasons for these changes in  $K_m$  and  $V_{max}$  for GC-HET are not clear, although a reduction in  $k_{cat}$  would be expected to lead to a lower  $K_m$  since  $k_{cat}$  is part of the numerator of the expression for  $K_m$ . This might also suggest that pGC is a V-type cooperative dimer for which a single substrate-bound site is much less catalytic than when both sites are occupied [20]. A second binding site with lower affinity for nucleotides was recently documented for sGC [4]. This second binding is proposed to correspond to the non-catalytic pseudo-site. It is selectively competed by sGC activators like the YC-1 molecule, confirming the conclusions of Chang and collaborators [2].

We also document that the purified pGC catalytic domain is directly sensitive to P-site inhibition, which was initially documented for adenylyl cyclase. Since the GC domain used does not include the KHD, the potential indirect influence of nucleotides which can bind to the KHD can be excluded from these studies. Structure-function relationships for P-site inhibitors of pGC seem to be analogous to those documented for adenylyl cyclase, except for the requirement for a guanosine moiety. Inhibition of pGC by ATP is not potent in the presence of  $Mg^{2+}$ , is not increased by inorganic pyrophosphate, and is probably more typical of substrate analogues acting competitively. In contrast, 2'd3'GMP inhibition is sensitive to the addition of pyrophosphate, and behaves as an analogue of the product 3'5'cGMP.

P-site inhibition of adenylyl cyclase is typically considered as uncompetitive in the presence of  $Mg^{2+}$  and non-competitive when  $Mn^{2+}$  is present [11]. Thus with the natural divalent cation  $Mg^{2+}$ , the inhibitor would presumably bind only to the enzyme-substrate or enzyme-product complex but not to the free enzyme. However, more potent P-site inhibitors with 3'-triphosphates or tetraphosphates also bind to the free enzyme and then yield a mixed non-competitive pattern [11]. Pure competitive inhibition by 2'-deoxy-3'-AMP on adenylyl cyclase has also been reported [36]. P-site inhibitors therefore seem to display variability in their apparent mechanism of inhibition [11]. For pGC, the presence of two active and cooperative sites allows for multiple interactions of 2'd3'GMP, leading to mainly a mixed non-competitive inhibition pattern. Adding inorganic pyrophosphate drastically increased inhibition by 2'd3'GMP,

suggesting that 2'd3'GMP has higher affinity for the post-transition state of the enzyme bound to pyrophosphate following dissociation of cGMP. In addition, the presence of pyrophosphate reduced the cooperativity index  $n_H$ , while 2'd3'GMP only marginally altered  $n_H$ . According to the positively cooperative models B2a and B2b of Segel [20], a cooperative inhibitor is expected to reduce substrate cooperativity, while a non-cooperative inhibitor would not alter the cooperative kinetics. Thus our results suggest that 2'd3'GMP alone does not bind cooperatively to pGC. However, inorganic pyrophosphate might contribute to retain the enzyme in a non-cooperative post-transition state, thus leading to a reduction in  $n_H$ .

P-site inhibitors of adenylyl cyclase have greatly improved over the years. Adenosine analogs with  $IC_{50}$  of about 1  $\mu$ M on adenylyl cyclase were recently synthesized. The most potent compound,  $\beta$ -2',5'-dideoxy-2-fluoroadenosine, showed an  $IC_{50}$  of 0.9  $\mu$ M when tested on a detergent-dispersed preparation of adenylyl cyclase from rat brain [37]. Also, the pro-nucleotide inhibitor 2',5'-dd-3'-AMP-bis(t-Bu-SATE) was engineered as a cell permeable agent and was shown to block cAMP formation in intact preadipocytes with an  $IC_{50}$  of  $\sim$ 30 nM [38]. Phosphorylation of the 3'-end by nucleoside phosphokinases was proposed to be an important step for potent inhibition by this molecule, although no demonstration of intracellular 3'-polyphosphate formation was documented [38]. Such membrane-permeable agents, modified to contain a guanosine moiety, could be potent guanylyl cyclase inhibitors and be useful in studies on the role of this important family of enzymes. However P-site inhibitors so far reported appear to be either substrate or product analogues with affinity for the pre-transition or the post-transition state, respectively. Development of new analogues mimicking the transition state intermediate containing a penta-covalent phosphate [39] might also lead to a series of inhibitors with improved potency and specificity. The putative discovery of pGC-specific or sGC-specific inhibitors would be even more useful to investigate the exact role, in physiological processes, of enzymes that produce the same second messenger, cGMP. These agents could also become important in the treatment of acute pathologies where reduction of cGMP production could be beneficial, e.g. septic shock [40] or enterotoxin-induced secretory diarrhoea [41]. Moreover, these potent inhibitors could prove valuable to determine the crystal structure of guanylyl cyclases.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research. S. Joubert was supported by a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec.

## **References**

- [1] Wedel BJ, Garbers DL. The guanylyl cyclase family at W2K. *Annu Rev Physiol* 2001 ;63:215-233.
- [2] Chang FJ, Lemme S, Sun Q, Sunahara RK, Beuve A. Nitric oxide-dependent allosteric inhibitory role of a second nucleotide binding site in soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2005;280:11513-11519.
- [3] Lamothe M, Chang FJ, Balashova N, Shirokov R, Beuve A. Functional characterization of nitric oxide and YC-1 activation of soluble guanylyl cyclase: structural implication for the YC-1 binding site. *Biochemistry* 2004 ;43:3039-3048.
- [4] Yazawa S, Tsuchiya H, Hori H, Makino R. Functional characterization of two nucleotide-binding sites in soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 2006;281:21763-21770.
- [5] Padayatti PS, Pattanaik P, Ma X, Van den Akker F. Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther* 2004 ;104:83-99.
- [6] Morton DB. Invertebrates yield a plethora of atypical guanylyl cyclases. *Mol Neurobiol* 2004 ;29:97-115.
- [7] Fitzpatrick DA, O'Halloran DM, Burnell AM. Multiple lineage specific expansions within the guanylyl cyclase gene family. *BMC Evol Biol* 2006;6-23.
- [8] Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ;94:13414-13419.
- [9] Johnson RA, Shoshani I. Kinetics of "P"-site-mediated inhibition of adenylyl cyclase and the requirements for substrate. *J Biol Chem* 1990 ;265:11595-11600.

- [10] Johnson RA, Yeung SM, Stubner D, Bushfield M, Shoshani I. Cation and structural requirements for P site-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1989 ;35:681-688.
- [11] Dessauer CW, Tesmer JJG, Sprang SR, Gilman AG. The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ;20:205-210.
- [12] Desaubry L, Shoshani I, Johnson RA. 2'5'-Dideoxyadenosine 3'-polyphosphates are potent inhibitors of adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 1996 ;271:2380-2382.
- [13] Dessauer CW, Gilman A. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase: Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J Biol Chem* 1997 ;272:27787-27795.
- [14] Tesmer JJG, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR. Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 2000 ;39:14464-14471.
- [15] Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 1998 ;273:16332-16338.
- [16] Labrecque J, McNicoll N, Marquis M, De Léan A. A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem* 1999 ;274:9752-9759.
- [17] Wong S, Ma C-P, Foster DC, Chen A-Y, Garbers DL. The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *J Biol Chem* 1995 ;270:30818-30822.
- [18] Féthière J, Meloche S, Nguyen TT, Ong H, De Léan A. Distinct properties of atrial natriuretic factor receptor subpopulations in epithelial and fibroblast cell lines. *Mol Pharmacol* 1989 ;35:584-592.
- [19] De Léan A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 1978 ;235:97-102.
- [20] Segel IH. *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: Wiley-Interscience John Wiley and Sons 1993.
- [21] Wilson EM, Chinkers M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 1995 ;34:4696-4701.

- [22] Joubert S, Jossart C, McNicoll N, De Léan A. Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP binding site on the natriuretic peptide receptor-A. *FEBS J* 2005 ;272:5572-5583.
- [23] Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signalling. *Science* 1989 ;245:1392-1394.
- [24] Brandwein HJ, Lewicki JA, Waldman SA, Murad F. Effect of GTP analogues on purified soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 1982 ;257:1309-1311.
- [25] Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* 1999 ;285:756-760.
- [26] Yan S-Z, Huang Z-H, Shaw RS, Tang W-J. The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997 ;272:12342-12349.
- [27] Beuve A. Conversion of a guanylyl cyclase to an adenylyl cyclase. *Methods* 1999 ;19:545-550.
- [28] Ruiz-Stewart I, Tiyyagura SR, Lin JE, Kazerounian S, Pitari GM, Schulz S, Martin E, Murad F, Waldman SA. Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ;101:37-42.
- [29] Naeger LK, Miller MD. Mechanisms of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: is it all figured out? *Curr Opin Investig Drugs* 2001 2:335-339.
- [30] Ivanova K, Heim J-M, Gerzer R. Kinetic characterization of atrial natriuretic factor-sensitive particulate guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1990 ;189:317-326.
- [31] Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG. Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem* 1975 ;250:374-381.
- [32] Radany EW, Bellet RA, Garbers DL. The incorporation of a purified membrane-bound form of guanylate cyclase into phospholipid vesicles and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985 ;812:695-701.
- [33] Ramarao CS, Garbers DL. Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. *J Biol Chem* 1985 ;260:8390-8396.

- [34] Parkinson SJ, Carrithers SL, Waldman SA. Opposing adenine nucleotide-dependent pathways regulate guanylyl cyclase C in rat intestine. *J Biol Chem* 1994 ;269:22683-22690.
- [35] Gerzer R, Hofmann F, Schultz G. Purification of a soluble sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem* 1981 ;116:479-486.
- [36] Johnson RA, Shoshani I. Inhibition of Bordetella pertussis and Bacillus anthracis adenylyl cyclases by polyadenylate and "P"-site agonists. *J Biol Chem* 1990 ;265:19035-19039.
- [37] Ye S, Rezende MM, Deng W-P, Herbert B, Daly JW, Johnson RA Kirk KL. Synthesis of 2'5'-dideoxy-2-fluoroadenosine and 2'5'-dideoxy-25'-difluoroadenosine: potent P-site inhibitors of adenylyl cyclase. *J Med Chem* 2004 ;47:1207-1213.
- [38] Laux WHG, Pande P, Shoshani I, Gao J, Boudou-Vivet V, Gosselin G, Johnson RA. Pro-nucleotide inhibitors of adenylyl cyclases in intact cells. *J Biol Chem* 2004 ;279:13317-13332.
- [39] Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsa-GTPγS. *Science* 1997; 278:1907-1916.
- [40] Hama N, Itoh H, Shirakami G, Suga S-I, Komatsu Y, Yoshimasa T, Tanaka I, Mori K, Nakao K. Detection of C-type natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ;198 :1177-1182.
- [41] Forte LR Jr. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther* 2004 ;104:137-162.



**Table 7.1 : Kinetic parameters of GC-WT compared to mutated proteins D849A, N968S, and GC-HET.**

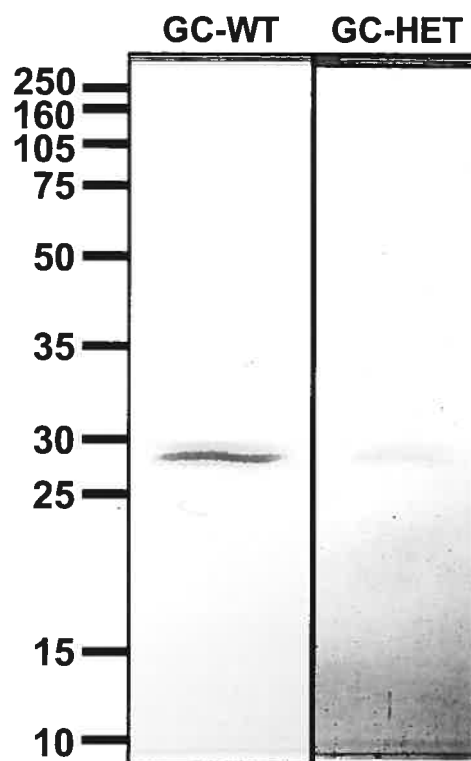
The  $S_{0.5}$  and  $V_{max}$  values were determined by kinetic analysis using Hill's equation. Production of cGMP was assessed with increasing concentration of the substrate GTP in the presence of excess  $Mg^{2+}$  unless otherwise stated, as described under Experimental procedures. Values are mean  $\pm$  S.E. of three to five separate experiments (indicated in parenthesis), with each measurement done in duplicate. When only two separate experiments are presented, both individual values are indicated in parenthesis.  $n_H$  is the cooperativity index, GC-HET is the double mutant D<sup>849</sup>A/N<sup>968</sup>S. ND, cannot be determined.

	$S_{0.5}$ (mM)	$n_H$	$V_{max}$ ( $\mu$ moles/mg/min)	$k_{cat} / S_{0.5}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
GC-WT	$0.37 \pm 0.07$ (3)	$1.4 \pm 0.01$ (3)	$28 \pm 2$ (3)	$8.5 \pm 2.2 \times 10^4$ (3)
GC-WT ( $Mn^{2+}$ -GTP)	0.017 (0.016-0.018)	1.8 (1.7-1.9)	19 (18-20)	$1.2 \times 10^6$ (1.1-1.3)
GC-D <sup>849</sup> A	ND	ND	ND	ND
GC-N <sup>968</sup> S	0.068 (0.055-0.082)	ND	0.32 (0.25-0.39)	$4.8 \times 10^2$ (4.7-4.9)
GC-HET	$0.068 \pm 0.004$ (5)	$1.0 \pm 0.06$ (5)	$4.1 \pm 0.6$ (5)	$6.4 \pm 0.8 \times 10^4$ (5)

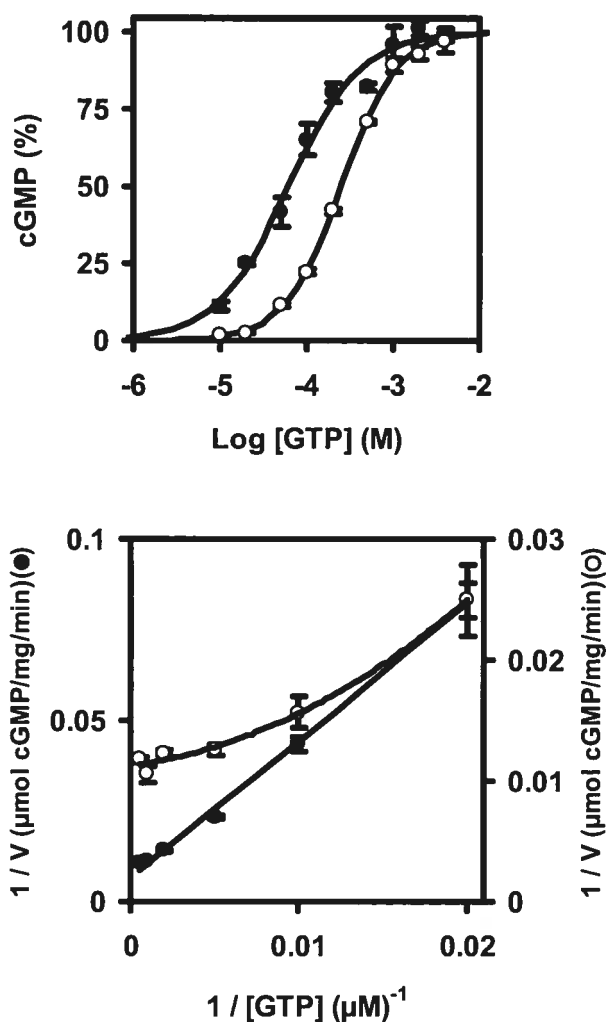
**Table 7.2 : Inhibition of particulate guanylyl cyclase domain by nucleosides and inorganic pyrophosphate.**

Inhibition of purified GC-WT was determined as described under Experimental procedures by including 1 mM GTP and varying concentrations of indicated nucleotides in the presence of excess  $Mg^{2+}$ . Activity was also determined in the presence of a physiological concentration of pyrophosphate (300  $\mu$ M). Values are mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments (indicated in parenthesis), with each measurement done in duplicate. When only two separate replicate experiments are presented, both mean values are indicated in parenthesis. (<sup>a</sup> =  $p < 0.05$ , <sup>b</sup> =  $p < 0.01$ )

	IC <sub>50</sub> (mM)	
	Control	+ 0.3 mM PPI
PPi	1.4 (1.3-1.4)	---
2'AMP	> 5 (2)	ND
3'AMP	> 5 (2)	ND
5'AMP	> 5 (2)	ND
Adenosine	> 5 (2)	ND
2'3'-dideoxyadenosine	> 5 (2)	ND
2'd3'AMP	> 5 (2)	> 5 (2)
ATP	3.3 (3.1-3.5)	5.3 (5.2-5.4) <sup>a</sup>
2'd5'AMP	2.3 (1.5-3.0)	1.9 (1.5-2.3)
5'GMP	> 5 (2)	ND
2'd5'GMP	1.8 (1.3-2.3)	2.2 (1.5-2.8)
2'3'dideoxyguanosine	2.2 $\pm$ 0.53 (3)	1.0 $\pm$ 0.094 (3) <sup>a</sup>
Guanosine	2.9 (2.4-3.3)	0.38 (0.34-0.41) <sup>a</sup>
Guanosine-2'(3)'-monophosphate	1.1 (0.94-1.3)	0.30 (0.21-0.38) <sup>a</sup>
2'd3'GMP	0.43 $\pm$ 0.07 (3)	0.083 $\pm$ 0.014 (3) <sup>b</sup>

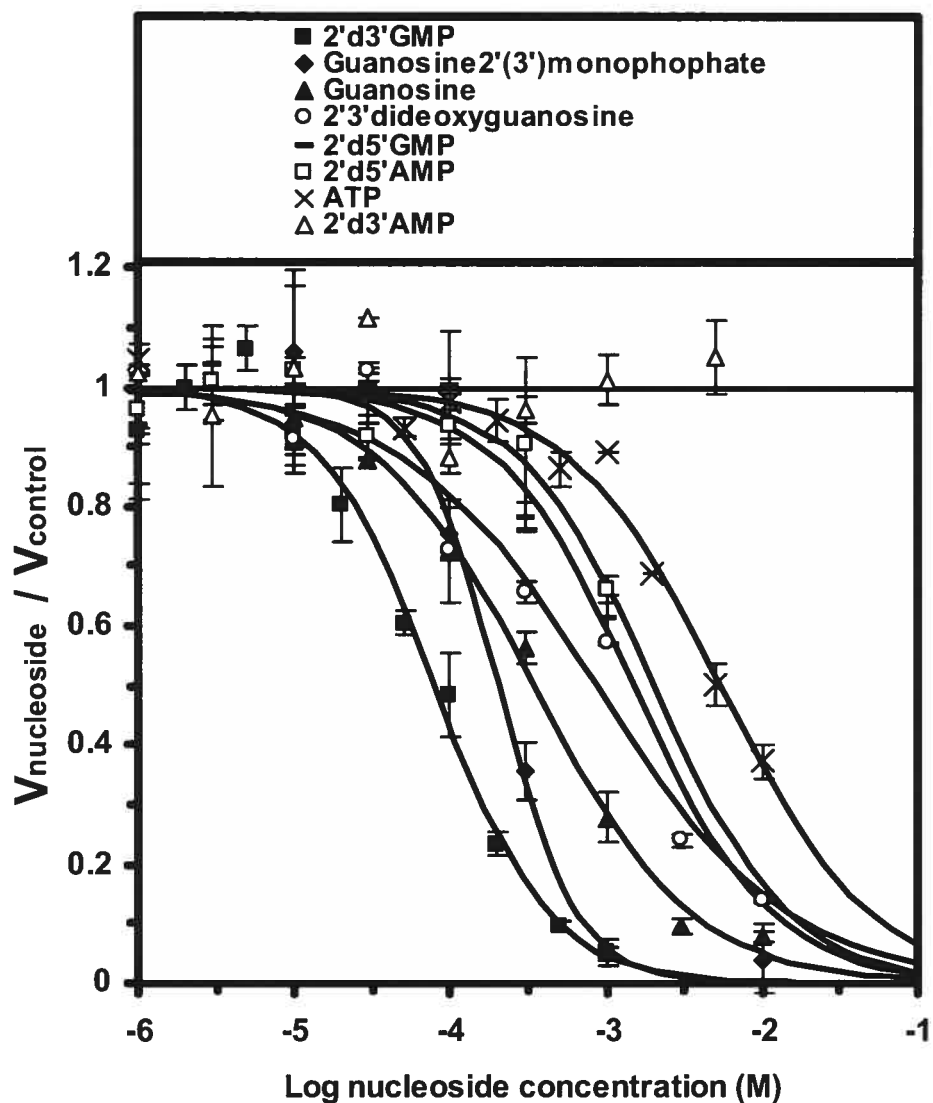


**Figure 7.1 :** SDS-PAGE analysis of purified pGC constructs. Purified pGC enzymes (GC-WT and GC-HET) were subjected to SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue, as described in Experimental procedures.

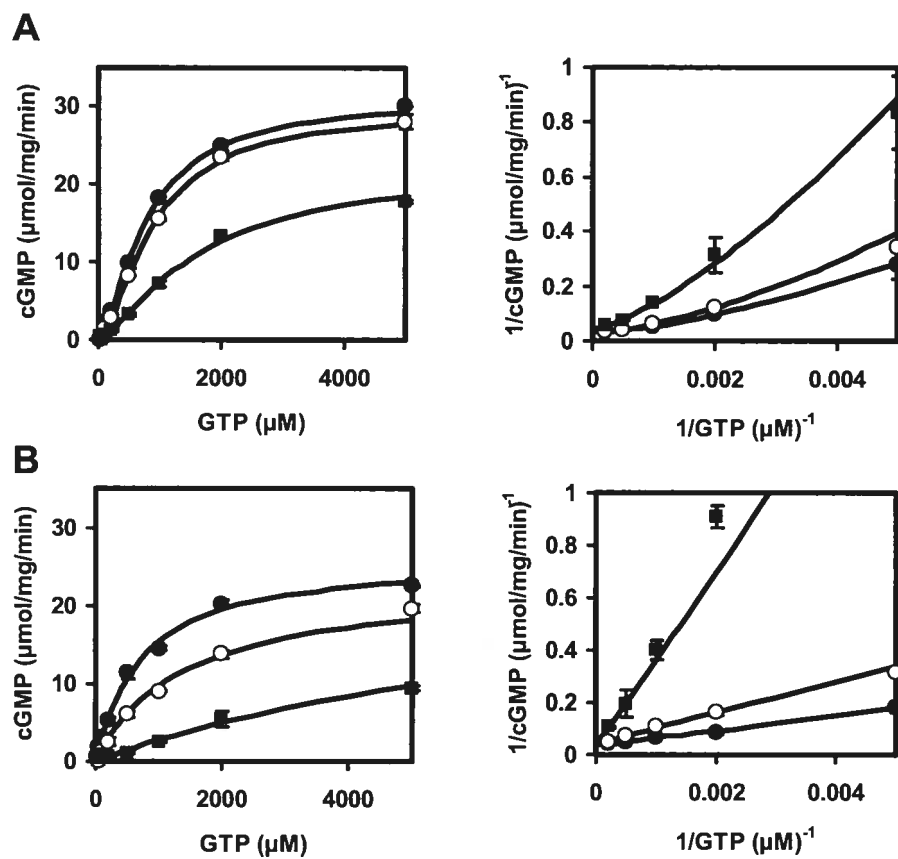


**Figure 7.2 :** Kinetic analysis of GC-WT and GC-HET.

Purified GC-WT (0.03 ng, open circle) and GC-HET (0.2 ng, closed circle) enzyme kinetics were measured as a function of GTP concentration.  $Mg^{2+}$  was present at 4 mM excess relative to GTP. Estimates of the kinetic parameters  $S_{0.5}$ ,  $V_{max}$  and  $n_H$  were obtained by nonlinear least squares using Hill's equation. The curves are portrayed as log-linear plot (upper panel) or Lineweaver-Burk double reciprocal (lower panel). cGMP production is expressed as 100 % of maximum ( $V_{max}$ ) for each curve.  $V_{max}$  for GC-WT and GC-HET was 28  $\mu\text{moles/mg/min}$  and 4.1  $\mu\text{moles/mg/min}$ , respectively. Assays were conducted as described in Experimental procedures. The results are representative of at least three separate replicate experiments.

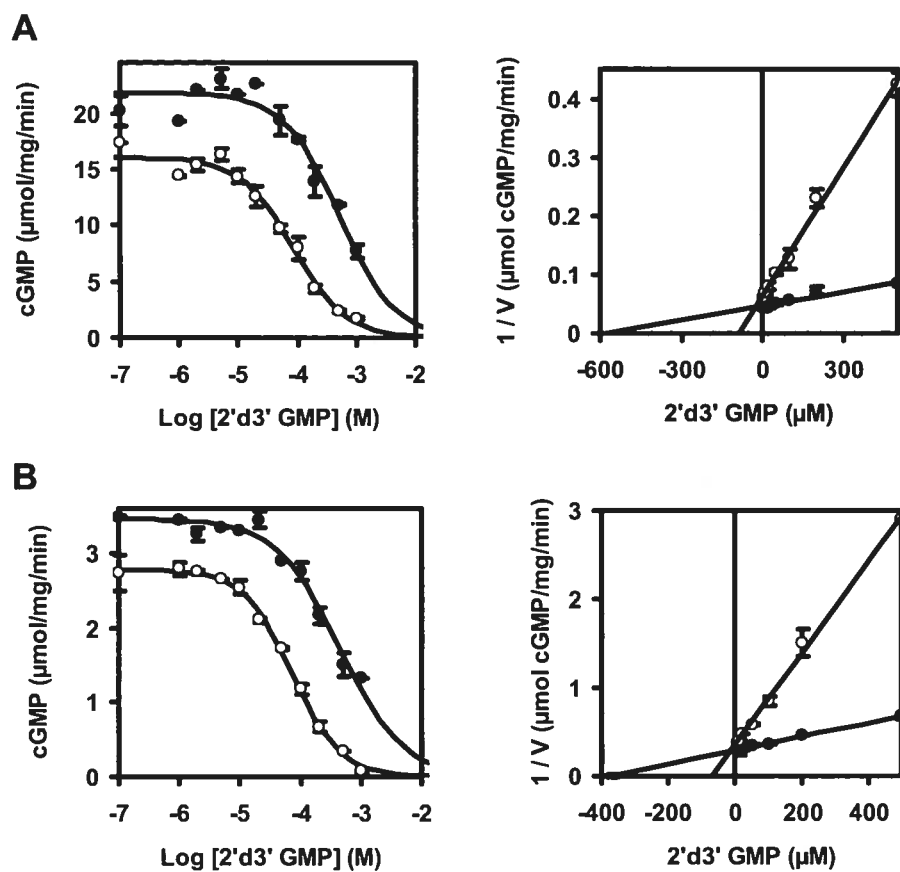


**Figure 7.3 :** Structure-activity relationships for the inhibition of pGC. Purified GC-WT was incubated as indicated in Experimental procedures with 1 mM GTP, 0.3 mM inorganic pyrophosphate, and increasing concentrations of indicated nucleosides. Values represent averages from at least two normalized experiments for each compound, each assayed in duplicate.  $IC_{50}$  values from these and other compounds are shown in Table 2.



**Figure 7.4 :** Kinetic analysis of inhibition by 2'd3'GMP.

(A) GC-WT (0.03 ng) kinetic profile was measured in the absence (closed circles) or in the presence of 0.1 mM (open circle) or 1 mM (closed squares) 2'd3'GMP, using Mg-GTP as substrate. (B) GC-WT (0.03 ng) kinetic profile was measured under the same conditions as in panel A, but with the addition of 0.3 mM pyrophosphate. The results are representative of at least three separate replicate experiments. Both experiments A and B are portrayed as linear (left) or double reciprocal plots (right). Enzyme kinetic analysis for each experiment was used to obtain estimated  $K_i$  values.



**Figure 7.5 :** Inhibition of (A) GC-WT and (B) GC-HET by 2'd3'GMP and pyrophosphate.

GC-WT (0.03 ng) activity was measured relative to 2'd3'GMP concentration in the presence of 0.5 mM GTP and 4 mM excess of  $Mg^{2+}$ , in the absence (closed circles) or the presence (open circles) of 0.3 mM inorganic pyrophosphate. The results are representative of three separate replicate experiments. GC-HET (0.2 ng) activity was measured relative to 2'd3'GMP concentration in the presence of 0.2 mM GTP and 4 mM excess of  $Mg^{2+}$ . The results are representative of two separate replicate experiments. Results are portrayed as linear (left) and Dixon (right) plots.

**TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET**  
**CONCLUSION**



## **Discussion**

Nous savons maintenant que le récepteur A des peptides natriurétiques est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques importantes. Plus important encore, le système ANP / BNP / NPR-A semble agir de façon à protéger l'organisme contre certaines pathologies comme l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, et l'hypertrophie cardiaque associée à ces conditions. Dans les dernières années, plusieurs études se sont penchées sur le rôle physiologique du NPR-A en utilisant des souris transgéniques. En effet, les techniques de la biologie moléculaire permettent maintenant la délétion sélective du gène NPR-A dans un tissu cible ou à un moment avancé du développement, ce qui n'était pas possible auparavant. Alors qu'on croyait que le NPR-A était surtout impliqué dans la régulation de la fonction cardiovasculaire, on découvre aussi un rôle majeur dans la régulation de la lipolyse chez l'homme (Sengenès et al., 2005). Cette découverte vient établir un pont important entre l'obésité et le système cardiovasculaire. Bien que de plus en plus d'études définissent les rôles physiologiques importants du NPR-A, la régulation moléculaire de l'activité de cette protéine membranaire reste peu étudiée.

### **I – Régulation du NPR-A par la phosphorylation**

Notre premier objectif était de comprendre le rôle de la phosphorylation du NPR-A dans la régulation de l'activité guanylate cyclase. Le NPR-A est phosphorylé à l'état de base. Lorsque l'agoniste ANP est présent de façon prolongée, le NPR-A est déphosphorylé. Cette observation suggère qu'il existe une ou plusieurs protéines kinases chargées de phosphoryler le NPR-A, et aussi une ou plusieurs phosphatases chargées de le déphosphoryler. Si on suppose que ces deux types d'enzymes sont présents à l'état de base, on peut dire que l'activité kinase domine l'activité phosphatase puisque le NPR-A est toujours pleinement phosphorylé à cette étape. Lorsque le NPR-A est stimulé par l'ANP, plusieurs scénarios sont envisageables quant à la perte des phosphates. Il est possible que l'activité phosphatase soit augmentée et supplante l'activité kinase, ce qui produirait une perte globale des phosphates. Il est aussi possible que l'activité kinase soit fortement diminuée, permettant à l'activité phosphatase présente de retirer les phosphates. Enfin, ces deux mécanismes pourraient se produire en

même temps et induire une perte rapide des phosphates. Dans le premier article présenté au chapitre 5, nous avons démontré que la perte des phosphates du NPR-A suite au traitement avec l'ANP est due à une baisse de l'activité protéine kinase associée au NPR-A (Joubert et al., 2001). L'activité phosphatase n'est pas modifiée de façon significative. Dans des études de « Pulse-Chase » en cellules entières, nous avons démontré que la présence d'ANP ne fait pas augmenter la vitesse de déphosphorylation du NPR-A. Cependant, dans des études de thiophosphorylation *in vitro*, nous avons démontré que le NPR-A traité avec ANP n'est presque pas phosphorylé dans des préparations membranaires comparé au récepteur non traité. Nous pouvons imaginer différents mécanismes qui expliqueraient cette baisse d'activité kinase : 1) La liaison de l'ANP sur le NPR-A induit un changement de conformation du KHD. Cette nouvelle conformation n'est pas un bon substrat pour la ou les kinases associées mais reste un bon substrat pour la ou les phosphatases associées. 2) À l'état de base, la ou les protéines kinases sont associées au domaine KHD. La liaison de l'ANP au NPR-A induit un changement de conformation du KHD qui produit une dissociation de la ou des kinases associées. Lorsqu'on prépare ensuite les membranes pour les expériences de thiophosphorylation, les kinases sont solubles et sont perdues dans les lavages, ce qui explique la baisse de phosphorylation *in vitro*.

Il y a plusieurs années, il a été démontré, par un test d'hybridation chez la levure, que la protéine phosphatase 5 (PP5) s'associe au KHD du NPR-A (Chinkers, 1994). Cependant cette association entre le NPR-A et la PP5 n'a jamais pu être démontrée dans des cellules de mammifère. Un an après la publication de notre article, une étude viendra confirmer en partie nos résultats. Cette étude avait pour but d'identifier la ou les protéines phosphatases impliquées dans la déphosphorylation du NPR-A dans les cellules de mammifère. Les auteurs ont montré que le NPR-A est déphosphorylé par deux protéines phosphatases (Bryan and Potter, 2002). Une de ces phosphatases est inhibée par la microcystine, un inhibiteur de certaines phosphatases, mais insensible à la présence de magnésium ou d'EDTA. L'autre phosphatase est insensible à la présence de microcystine, mais requiert la présence de magnésium ou de manganèse pour être active. Puisque les effets de l'EDTA et de la microcystine étaient additifs, et que la microcystine ne bloquait pas la désensibilisation magnésium-dépendante, il a été conclu que deux phosphatases différentes déphosphorylent le NPR-A. Les

phosphatases connues comme étant sensibles à la microcystine sont : la PP1, la PP2A, la PP4, la PP5, et la PP6 (Sheppeck et al., 1997). L'autre phosphatase est possiblement la PP2C ou la PP7, puisque ces deux enzymes ne requièrent pas le magnésium pour être actives et ne sont pas inhibées par la microcystine. De plus, les auteurs ont tenté de démontrer que l'activité phosphatase est augmentée dans des préparations membranaires de rein de souris (Bryan and Potter, 2002). Pour ce faire, ils ont préincubé les membranes avec l'ANP pour 30 minutes, et ensuite ils ont mesuré la capacité du NPR-A à produire du GMPc en présence d'ANP et d'ATP pour 3 minutes. Avec des préparations membranaires de cellules HEK293, la pré-incubation avec ANP n'a eu aucun effet sur l'activation subséquente avec (ANP+ATP), un résultat que nous avons aussi obtenu. Cependant, le prétraitement avec ANP sur des membranes de rein de souris a fait diminuer de 50% l'activation subséquente du NPR-A. Ils ont donc conclu que dans un contexte plus « physiologique », l'activité phosphatase est augmentée suite au traitement du NPR-A avec l'ANP. Cependant leurs résultats ne permettent pas de supporter cette conclusion. En effet, il est tout aussi plausible que le prétraitement de leurs membranes de rein de souris avec l'ANP soit plus efficace pour bloquer l'activité kinase présente associée au NPR-A que dans les membranes de HEK293, ce qui explique la baisse d'activité observée. Il est aussi possible que leur préparation de membranes de rein de souris ne contienne plus autant de protéines kinases, conséquence du lavage des membranes avec un tampon salin (Bryan and Potter, 2002). Ceci produirait une baisse de phosphorylation et expliquerait le déclin de l'activité guanylate cyclase. Bien que cette étude ait permis d'identifier des facteurs qui font varier le niveau d'activité du NPR-A dans des préparations membranaires, les traitements utilisés ont aussi pu modifier l'activité kinase associée au NPR-A présente dans ces membranes, ce qui vient brouiller les conclusions de l'étude. En effet, l'incubation est faite en présence d'ATP, le substrat des protéines kinases. Il pourrait donc y avoir phosphorylation du NPR-A et de plusieurs autres protéines dans ces préparations membranaires.

Une étude récente a démontré que la région C-terminale du NPR-A interagit avec la PKG dans un test d'hybridation chez la levure (Airhart et al., 2003). Lorsque des cellules HEK293 exprimant le NPR-A sont transfectées avec un vecteur d'expression exprimant la PKG, le traitement avec ANP induit une plus grande concentration de la PKG à la membrane plasmique. Un inhibiteur

spécifique de PKG inhibe la translocation de la PKG à la membrane, suggérant que la PKG doit être activée pour être ciblée à la membrane. De plus, cette translocation ANP-dépendante de PKG se produit aussi avec une lignée primaire de cardiomyocytes de rat. La présence de PKG augmente de 2 fois la capacité du NPR-A à produire du GMPc en présence d'ANP. Les auteurs de cette publication suggèrent donc que la PKG est la kinase qui phosphoryle le NPR-A, mais ne présentent aucun résultat démontrant la phosphorylation du NPR-A par la PKG (Airhart et al., 2003). Dans une étude précédente, il avait pourtant été démontré que le traitement en cellule entière avec différents activateurs de PKG (8-bromo-GMPc, dibutyryl-GMPc, 8-PCPT-GMPc) ne produit aucun changement dans la capacité du NPR-A à produire du GMPc suite au traitement avec ANP (Potter and Garbers, 1994). De plus, une étude récente s'est attardée à mesurer l'effet de la PKG I $\alpha$  sur le contenu en phosphates et l'activité du NPR-A (Bryan et al., 2006). Ces deux paramètres n'étaient pas modifiés dans des cellules ayant une surexpression de PKG I $\alpha$ , ou dans des tissus de souris n'exprimant pas la PKGI. Il n'y a donc aucune évidence dans ce cas pour conclure à un rôle de la PKG dans la phosphorylation du NPR-A. De plus, des études menées dans notre laboratoire indiquent qu'une forte production de GMPc par la guanylate cyclase soluble ne produit aucun effet sur l'activité du NPR-A, ce qui suggère que la régulation de l'activation ou de la désensibilisation du NPR-A ne passe pas par la voie GMPc / PKG (Fortin and De Lean, 2006).

L'identification de la ou des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation du NPR-A était un objectif majeur de nos recherches. Dans un premier temps, nous avons pensé utiliser une banque d'ADNc implantée dans des phages T7 pour identifier une ou des protéines kinases qui phosphorylent le NPR-A *in vitro*. Pour ce faire nous avons besoin du substrat NPR-A purifié. Nous avons d'abord tenté de purifier le NPR-A membranaire entier sous forme solubilisée, mais le rendement de purification n'était pas assez élevé pour nous permettre de travailler avec cette protéine pure. Ensuite nous avons tenté de produire une protéine soluble en purifiant une forme recombinante du NPR-A ne comprenant que la région intracellulaire (ICD), exprimée d'abord dans les HEK293 et ensuite dans les cellules d'insecte Sf9. Dans les deux cas, l'étude des protéines a démontré que le domaine guanylate cyclase est fonctionnel, mais que

le domaine KHD ne se trouve pas dans la conformation originale et adéquate pour agir comme substrat pour la phosphorylation.

Un article portant sur la kinase dépendante de l'AMP (AMPK) et ses substrats connus nous a permis d'avancer dans notre recherche de la kinase du NPR-A (Scott et al., 2002). Le but de leur étude était de définir comment l'AMPK reconnaît son substrat et d'identifier les résidus du substrat nécessaires pour la reconnaissance. À la conclusion de cet article, il y avait donc un alignement de séquences de substrats connus de l'AMPK. Cette séquence avait plusieurs points communs avec la séquence du domaine de phosphorylation du NPR-A. Nous avons donc aligné la séquence du NPR-A avec les séquences des substrats connus de l'AMPK (**Figure 8.1**).

```

                                497
NPR-A:  LEKELASELWRVRWEDVEPSSLERHLRSAGSRLTSLGRGSNYGSLLTTE
rACC1:  ISALQDGLAFHMRSSMSGLHL
ACC1:   ISSLQDGLALHIRSSMSGLHL
ACC2:   TTGEAETRVPTMRPSMSGLHL
eNOS:   GLTLRTQEVTSRIRTQSFSLQ
nNOS:   GVTLRTYEVTNRLRSESIAFI
HSL:    SQKMSEPIAEPMRRSVSEAL
PFK2:   TNNFPKNQTPVRMRRNSEFTPL
HMGR:   ALAAGHLVKSHMIHNRSEKINL

```

**Figure 8.1** : Alignement de séquence du NPR-A humain avec les substrats connus de l'AMPK.

La sérine phosphorylée est indiquée en ombrage foncé. Les résidus requis pour la reconnaissance du substrat sont indiqués en ombrage léger. Les résidus phosphorylés dans le NPR-A sont soulignés. ACC = Acétyl CoA carboxylase, NOS = Synthase de l'oxyde nitrique, HSL = Lipase hormono-sensible, PFK = Phosphofructokinase, HMGR = HMG CoA réductase. L'alignement a été généré avec le programme ClustalX 1.83 et n'a pas été modifié.

Les conclusions de l'article de Scott et collaborateurs sont les suivantes : Les substrats de l'AMPK contiennent souvent : 1) Une hélice amphiphile dans les positions -16 à -5 par rapport à la sérine phosphorylée, représentée par des résidus hydrophobes à 3 ou 4 acides aminés d'intervalle. 2) Des résidus basiques en positions -6 et -4. 3) Une histidine en position +3. 4) Une leucine en position +4.

Il est intéressant de constater que la séquence du NPR-A contient plusieurs de ces éléments (**Figure 8.1**). En effet, cette région contient aussi plusieurs résidus hydrophobes à intervalle régulier en amont de la sérine phosphorylée. On note que la première sérine phosphorylée dans le NPR-A s'aligne parfaitement avec les séquences des substrats d'AMPK ACC, HSL, et HMGR. La séquence du NPR-A contient aussi des résidus basiques en positions -6 (His) et -4 (Arg), ainsi qu'une leucine en position +4. Il n'y a pas de résidu histidine en position +3 mais plutôt une thréonine phosphorylée. Cependant plusieurs autres substrats de l'AMPK n'ont pas d'histidine à cette position (**Figure 8.1**). Nous avons donc considéré l'AMPK comme une enzyme susceptible de phosphoryler le NPR-A. L'AMPK est une enzyme importante et ubiquitaire. Elle est composée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices,  $\beta$  et  $\gamma$ , nécessaires pour avoir une activité maximale et pour que l'enzyme soit régulée par l'AMP. L'AMPK est la dernière composante d'une cascade de kinases et agit comme un détecteur de l'énergie cellulaire, puisqu'elle est sensible aux niveaux d'AMP et d'ATP intracellulaires. Lorsqu'il y a surconsommation d'ATP et production subséquente d'AMP, l'AMPK est activée et phosphoryle plusieurs cibles qui activent les voies de production d'ATP et inactivent les processus consommateurs d'ATP. C'est une enzyme importante aussi puisque des agents pharmacologiques qui activent cette protéine sont utiles dans le traitement du diabète de type 2. Encore plus intéressant, des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités régulatrices de l'AMPK, essentielles à l'activité, produisent des maladies du cœur héréditaires (Scott et al., 2002).

Pour vérifier si l'AMPK phosphoryle le NPR-A, nous avons d'abord cloné l'AMPK par RT-PCR à partir d'hépatocytes de rat. La séquence a été validée et nous avons intégré l'AMPK dans un vecteur d'expression. La production d'une AMPK constitutivement active et d'une AMPK agissant comme un dominant négatif a déjà été décrite dans la littérature (Woods et al., 2000; Stein et al., 2000; Scott et al., 2002). Pour être active, l'AMPK doit être d'abord phosphorylée sur le résidu thréonine 172. La mutation de cette thréonine en aspartate produit une enzyme constitutivement active, mais il faut aussi enlever les 236 résidus en C-terminal chargés de l'interaction avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Nous avons d'abord produit une protéine contenant une GFP en N-terminal suivie de l'AMPK contenant la mutation T172D et ne contenant que 309 acides aminés. Comme

prévu, après purification, des essais de phosphorylation sur substrat peptidique ont démontré que cette enzyme est constitutivement active. Pour vérifier si l'AMPK régule l'activité du NPR-A, nous avons transfecté cette construction GFP-AMPK-T172D active dans des cellules HEK293 exprimant le NPR-A de façon stable. Nous avons ensuite mesuré la capacité du NPR-A à produire du GMPc en cellule entière suite au traitement avec ANP. Malheureusement, aucun changement de production de GMPc n'a été détecté pour les cellules transfectées comparées aux cellules contrôle. L'AMPK est souvent positionnée à la membrane par la sous-unité  $\gamma$  qui contient une ancre lipidique. Nous avons donc imaginé que notre résultat négatif était possiblement dû au fait que notre AMPK hyperactive ne se positionne pas à la membrane comme la protéine normale. Les cellules HEK293 utilisées contiennent bien l'AMPK endogène, puisqu'un immunobuvardage Western contre la sous-unité catalytique de l'AMPK, effectué sur un lysat cellulaire, a clairement montré la présence de l'enzyme. Nous avons donc produit un dominant négatif de l'AMPK. Nous avons introduit la mutation inactivatrice T172A dans la protéine AMPK originale de 548 acides aminés. Une fois dans la cellule, cette protéine accapare les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  endogènes et inactive ainsi la sous-unité catalytique  $\alpha$  endogène (Woods et al., 2000). Comme auparavant, nous avons transfecté cette forme inactive dans les cellules HEK293 et mesuré la capacité du NPR-A à produire du GMPc. Encore une fois, la présence de cet AMPK dominant négatif n'a eu aucun effet sur le NPR-A. De plus, nous avons tenté de montrer une activation du NPR-A suite à un traitement avec oligomycine. L'oligomycine active fortement l'AMPK dans les cellules HEK de façon transitoire (Marsin et al., 2000). Suite au traitement avec oligomycine, nous avons mesuré la production ANP-dépendante de GMPc dans les cellules HEK293. Le traitement avec oligomycine n'a eu aucun effet sur la production de GMPc. Finalement, nous avons tenté de phosphoryler le NPR-A *in vitro* avec l'AMPK. Des préparations membranaires contenant le NPR-A ont été incubées en présence d'ATP $\gamma$ [ $^{32}$ P] avec notre AMPK hyperactive purifiée ou avec une AMPK commerciale pouvant être activée de façon maximale en ajoutant une faible concentration d'AMP. Dans les conditions contrôle, sans ajout d'AMPK, il y avait déjà une certaine phosphorylation du NPR-A, indiquant que la ou les kinases qui phosphorylent le NPR-A sont présentes dans ces préparations membranaires, tel qu'observé auparavant (Joubert et al., 2001). Cependant, l'ajout de l'AMPK n'a

en aucun cas augmenté la cinétique de phosphorylation du NPR-A, et l'ajout d'AMP n'a eu aucun effet sur la phosphorylation.

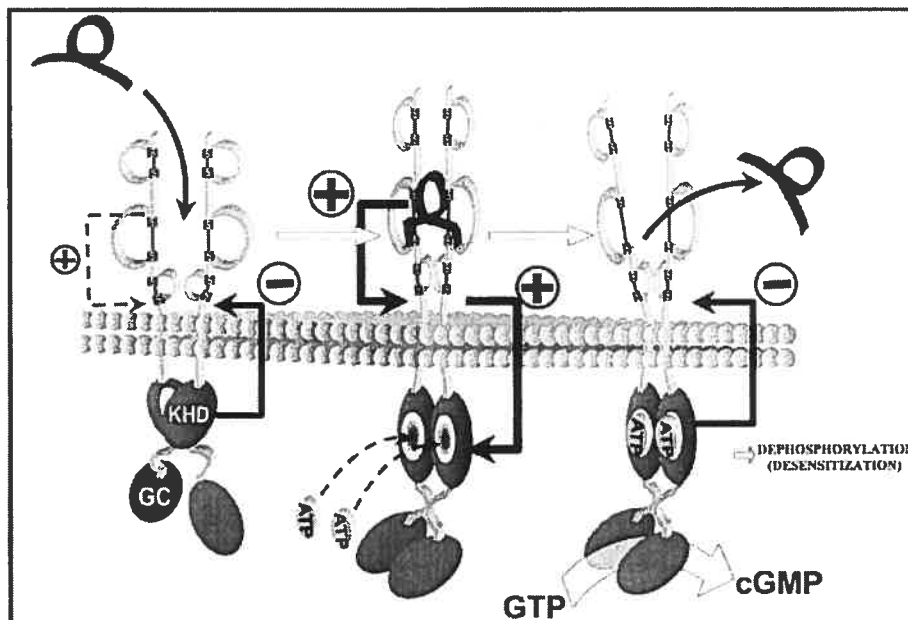
Ainsi, malgré l'alignement de séquence qui semblait prévoir un rôle pour l'AMPK dans la phosphorylation du NPR-A, nous n'avons pas été en mesure d'établir un lien entre les deux protéines. Il faut de plus mentionner que le NPR-A contient 6 sites de phosphorylation, et que le site présumé de phosphorylation par AMPK était le premier en N-terminal du KHD (Ser497). Ainsi, il est possible que cette phosphorylation se produise en différentes étapes et soit plutôt complexe. De plus, dans l'adipocyte, le fait que l'AMPK active le NPR-A serait quelque peu contradictoire. En effet, il a déjà été démontré que l'AMPK phosphoryle et inhibe la lipase hormono-sensible dans l'adipocyte (Watt et al., 2006). D'un autre côté, dans l'adipocyte, le GMPc produit par le NPR-A active la PKG qui phosphoryle et active la lipase hormono-sensible (Sengenès et al., 2005). Il serait donc étonnant que dans ce système, l'AMPK ait le rôle d'activer la LHS tout en l'inactivant. La ou les protéines kinases chargées de phosphoryler le NPR-A restent donc à être identifiées.

## **II – Régulation du NPR-A par l'ATP**

Dans les études précédentes menées dans notre laboratoire, nous avons toujours assumé que l'ATP se lie directement sur le domaine KHD du NPR-A (Larose et al., 1991; Labrecque et al., 2001). Ce faisant, il permet au domaine guanylate cyclase C-terminal d'adopter une conformation adéquate pour produire du GMPc de façon maximale. Cependant nous n'avons jamais démontré que le KHD lie l'ATP directement. L'évidence la plus claire indiquant ceci était plutôt indirecte et provenait d'une étude sur le NPR-A purifié. En effet, le NPR-A purifié montrait toujours une forte réponse à la présence d'ATP, indiquant que l'effet d'ATP se produit sur le NPR-A lui-même et ne passe pas par une autre protéine (Wong et al., 1995). L'article présenté au chapitre 6 démontre que l'ATP a un effet allostérique majeur sur le NPR-A (Joubert et al., 2005). Seul il n'a aucun effet sur l'activité du NPR-A, mais lorsqu'ajouté en présence d'ANP, il augmente de 18 fois l'activité du récepteur. L'ATP inhibe aussi la liaison d'ANP. Cette inhibition requiert le domaine intracellulaire et ne se produit pas lorsque le récepteur est désensibilisé. Nous avons aussi démontré qu'un analogue



photoactivable de l'ATP (8-azido-ATP-B) se lie directement sur le KHD du NPR-A. De plus, cette liaison est favorisée lorsqu'il y a prétraitement avec l'ANP. Cette liaison est spécifique puisque nous pouvons l'inhiber avec des doses croissantes d'ATP mais pas avec le GTP. Tout comme l'ATP, cet analogue inhibe la liaison d'ANP sur le récepteur, mais encore plus fortement que l'ATP. Inversement, un autre analogue d'ATP, le 8-azido-App(NH)p, fait augmenter la liaison de l'ANP au NPR-A. Cet analogue produit le même effet que la drogue diurétique amiloride, qui fait augmenter la liaison de l'ANP mais inhibe l'activité guanylate cyclase à des doses plus élevées (De Lean, 1986; Heim et al., 1988; Jewett et al., 1993). Nos résultats viennent donc confirmer la liaison d'ATP sur le KHD et valider notre modèle publié quelques années auparavant (**Figure 8.2**).



**Figure 8.2 :** Modèle schématique du processus d'activation du NPR-A.

Dans une première étape, l'ANP se lie sur l'ECD et induit un changement conformationnel. Ceci produit un signal qui se transmet à travers la membrane. Le KHD prend alors une conformation qui permet la liaison d'ATP. La liaison d'ATP a deux effets majeurs : une dérégulation de l'activité guanylate cyclase, et une augmentation de la vitesse de dissociation de l'ANP. Le NPR-A entre ensuite dans la phase de désensibilisation. Tiré de (Labrecque et al., 2001).

Juste avant la publication de notre étude, un article a tenté de démontrer que l'ATP n'est pas un activateur du NPR-A mais plutôt qu'il stabilise le récepteur sur de longues périodes, ce qui permet de noter une augmentation globale de l'activité (Antos et al., 2005). Tel que nous l'avons mentionné dans le chapitre 6, bien que cette étude soit intéressante d'un point de vue conceptuel, certaines interrogations demeurent. Dans un premier temps, l'étude définit l'activation du NPR-A ou du NPR-B sur une période très courte de 15 secondes. Dans ces conditions, les ligands CNP ou ANP à une dose massive de 1  $\mu\text{M}$ , activent la production de GMPc, mais l'ajout d'ATP n'a aucun effet. L'ATP n'a aucun effet non plus sur des courbes dose-réponse avec des concentrations de ligand de 10 nM à 10  $\mu\text{M}$ . Avec ce temps court de 15 secondes, même une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de peptide n'est pas suffisante pour produire une quantité maximale de GMPc et observer un plateau à droite de la courbe dose-réponse. Normalement, avec des temps plus longs, ces récepteurs sont activés de façon maximale avec 1 nM de ces peptides. Ensuite, les auteurs mesurent la production de GMPc à des temps différents en présence ou non d'AMPPNP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, pour éviter les effets dus à la phosphorylation du NPR-A. Dans ces conditions, l'effet de l'AMPPNP est inexistant avant 5 minutes d'incubation, et ensuite la présence de ce nucléotide permet l'accumulation du GMPc alors qu'il n'y a pas d'accumulation en son absence. C'est pour cette raison que les auteurs suggèrent que l'ATP, ou l'AMPPNP, stabilise l'activité guanylate sans aucune activation.

Cependant, en examinant de plus près les conditions de réaction catalytique utilisées, on observe certains faits anormaux. Tout d'abord, les réactions sont faites dans un tampon qui ne contient pas d'inhibiteurs de phosphodiesterases et aucun système régénérateur de nucléotide. Ces éléments sont normalement ajoutés lorsque l'essai d'activité guanylate cyclase est effectué avec une préparation non purifiée. Les inhibiteurs de PDEs permettent d'inhiber les enzymes qui dégradent le GMPc, et le système régénérateur permet de reformer le GTP s'il est dégradé en GMP ou en GDP. Ceci assure que le substrat est constamment en excès, ce qui est requis lorsqu'on effectue une cinétique enzymatique. De plus, le substrat total ajouté dans leurs tubes de réaction est 100 nmoles de GTP, en plus d'une petite quantité de substrat radioactif. Leurs résultats avec le NPR-A indiquent que la quantité de GMPc produit est de l'ordre de 50 à

150 nmoles de GMPc par milligramme de protéine entre 3 et 15 minutes. Il est donc possible que durant cette incubation le substrat GTP ait été complètement épuisé, ce qui expliquerait le fait qu'il n'y a pas d'accumulation significative de GMPc dans leur expérience. Donc dans ces conditions l'AMPPNP a possiblement un effet de protection du GTP contre la dégradation par les PDEs plutôt qu'un effet stabilisateur ou activateur du NPR-A. Les auteurs basent en partie leur conclusion sur une question de temps, comme si un activateur allostérique devait absolument produire un effet en 15 secondes. Selon le modèle actuel d'activation allostérique par l'ATP, l'ANP se lie d'abord au NPR-A, et l'ATP peut ensuite lier le KHD pour activer l'enzyme au maximum. C'est pourquoi l'ATP seul n'a aucun effet sur l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Mais combien de temps devrait prendre l'ATP pour lier le KHD ? Une véritable étude cinétique effectuée sur le NPR-A purifié a démontré, sur un temps court de 5 minutes, que l'ATP fait augmenter d'environ 40% le  $V_{max}$  de la guanylate cyclase en fonction de la concentration de GTP (Wong et al., 1995). À n'importe quelle concentration de GTP, la présence d'ATP faisait augmenter la production de GMPc. Si l'ATP avait seulement un rôle stabilisateur, le  $V_{max}$  n'aurait pas changé pour un temps si court. Ceci indique donc clairement que l'ATP a bel et bien un rôle d'activateur allostérique sur le NPR-A.

Récemment, une étude a démontré de façon convaincante la liaison d'ATP sur le KHD de la guanylate cyclase C (Jaleel et al., 2006). Cependant, les auteurs de cette étude ont travaillé avec une forme soluble recombinante du domaine intracellulaire de la guanylate cyclase C. Dans ces conditions, l'ATP agit plutôt comme un inhibiteur de l'activité guanylate cyclase, un résultat que nous avons déjà obtenu avec une forme soluble du domaine intracellulaire du NPR-A. Avec cette forme soluble, ce groupe de recherche a pu délimiter une région importante pour la liaison de l'ATP dans ces conditions. Ils proposent finalement un modèle d'activation pour la GC-C identique à celui que nous avons proposé il y a cinq ans pour le NPR-A (GC-A) (**Figure 8.2**) (Labrecque et al., 2001).

Un autre groupe de recherche propose un mode d'activation particulier où l'ATP doit d'abord lier le KHD pour permettre la phosphorylation du KHD (Duda et al., 2005). Cette hypothèse est basée sur un modèle estimé de la structure du KHD du NPR-A. En effet, ce groupe suggère que la séquence Gly503-X-Gly505-

X-X-X-Gly509 présente dans le KHD forme une structure importante pour la liaison de l'ATP. La liaison de l'ATP exposerait la sérine en position 506 qui serait alors phosphorylée. Cette phosphorylation serait nécessaire pour une activation maximale du NPR-A. En fait, la glycine en position 505 serait nécessaire pour avoir un changement conformationnel induit par l'ATP, qui exposerait tous les résidus propices à la phosphorylation. Cependant, une étude a démontré que la mutation en alanine des trois glycines ne modifie pas la capacité d'activation du NPR-A en cellule entière ou en préparation membranaire (Koller et al., 1993). La mutation de certains autres résidus hautement conservés dans les protéines kinases a par contre un effet inactivateur marqué. Le modèle proposé par ce groupe n'est pas non plus en accord avec le fait que le NPR-A est phosphorylé à l'état de base, et déphosphorylé suite au traitement avec ANP, une observation confirmée par plusieurs laboratoires.

Il est donc probable que la phosphorylation du KHD ainsi que la liaison de l'ATP sur le KHD soient deux facteurs nécessaires pour obtenir une activité guanylate cyclase maximale (Foster and Garbers, 1998). Nos résultats suggèrent que l'ATP se lie préférentiellement et de façon coopérative au KHD lorsque le NPR-A est activé avec l'ANP (Joubert et al., 2005). De plus, lorsque le NPR-A est ensuite déphosphorylé et désensibilisé, il conserve une haute affinité de liaison pour l'ANP en absence d'ATP. Ceci est en désaccord avec l'hypothèse voulant que la perte des phosphates soit responsable de la diminution de l'affinité du NPR-A pour l'ANP (Potthast and Potter, 2005). C'est plutôt la liaison de l'ATP au KHD qui produit une diminution de l'affinité de l'ANP pour le NPR-A (Joubert et al., 2005). On en arrive donc à un modèle actuel de l'activation du NPR-A qui arrive à expliquer les résultats obtenus jusqu'à maintenant (**Figure 8.3**). Tel que mentionné plus haut, on ne connaît toujours pas l'identité des protéines kinases et phosphatases impliquées dans les étapes de régulation de la phosphorylation du NPR-A. On ne connaît pas non plus le mécanisme exact par lequel le NPR-A se resensibilise. Il est probable que l'identification des enzymes de régulation du NPR-A permettra d'établir un modèle complet du cycle d'activation du NPR-A.

L'ATP est donc un régulateur important du NPR-A, du NPR-B, et de la GC-C. Une étude récente a de plus démontré que l'ATP joue un rôle crucial dans

la stimulation de la GC de la rétine (GC-E, GC-F) (Yamazaki et al., 2003). On croyait jusqu'alors que cette GC était activée seulement par les GCAPs, en fonction de la concentration de calcium. Cette étude a démontré que l'activation de la retGC par la GCAP est nettement plus grande lorsqu'il y a préincubation avec des nucléotides adénine. Tout comme pour le NPR-A, dans certaines conditions, l'ATP est deux fois plus efficace que l'AMPPNP. L'AMPPNP a un  $EC_{50}$  de 0.65 mM et augmente d'environ 3 fois l'activation par la GCAP. L'augmentation de l'activation est due à une augmentation du  $V_{max}$  de l'enzyme sans aucun changement dans l'affinité de la GCAP pour la retGC. Finalement les auteurs suggèrent que la retGC est activée par un mécanisme en deux étapes : 1) Il y a d'abord un changement conformationnel induit par la liaison de l'ATP sur le KHD de la retGC lorsque le calcium est en concentration élevée. 2) Cette modification permet une très haute activation de la retGC par la GCAP lorsque le calcium est en basse concentration (Yamazaki et al., 2003). Il semble donc que l'ATP pourrait avoir un rôle important dans l'activation de toutes les guanylates cyclases particulières.

La recherche de petites molécules analogues à l'ATP pourrait être intéressante pour moduler l'activité du NPR-A et d'autres guanylates cyclases particulières. Cependant, le risque d'observer des effets sur d'autres protéines de liaison à l'ATP est élevé. En effet, la régulation allostérique du NPR-A se produit à des concentrations élevées d'ATP (0.2-1 mM). À ces concentrations les analogues d'ATP pourraient se lier à plusieurs autres protéines : récepteurs d'adénosine, protéines kinases, adénylyl cyclases, canaux ioniques ATP-dépendants, etc. Ceci induirait des effets secondaires majeurs et ces agents ne pourraient donc pas être utilisés comme inhibiteurs spécifiques. Néanmoins, la structure tridimensionnelle adoptée par le KHD n'est pas connue. Il est possible que ce domaine pseudokinase adopte une conformation significativement différente de celle du domaine kinase classique. Dans ce cas, il serait peut-être concevable d'imaginer une petite molécule qui puisse lier ce domaine de façon spécifique pour inhiber ou activer la région guanylate cyclase du NPR-A.

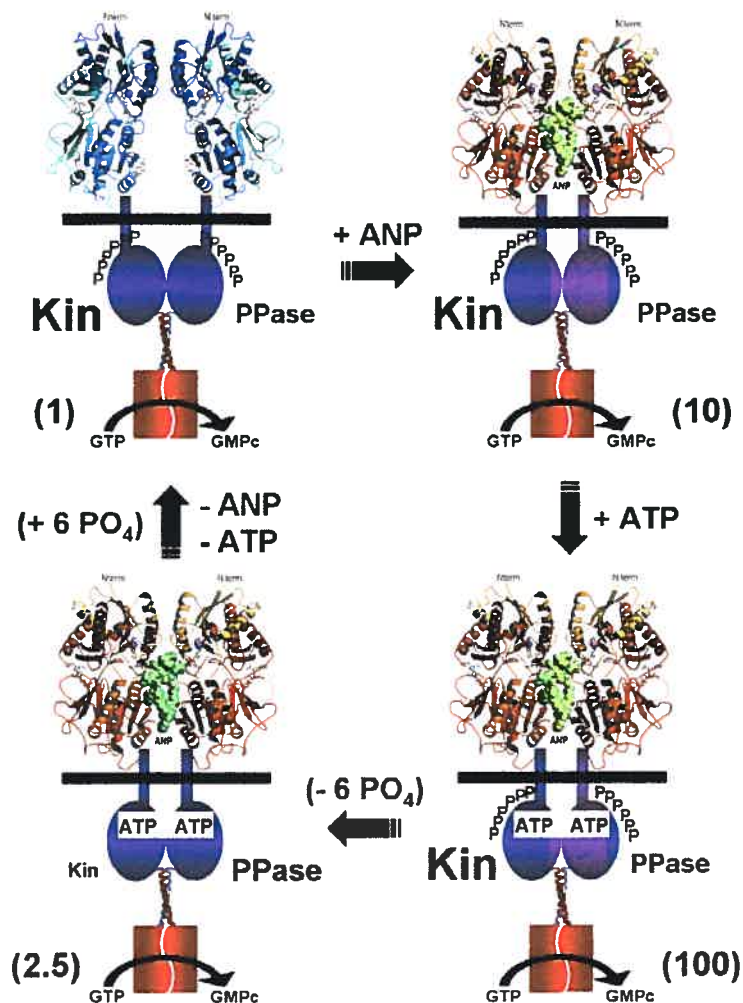


Figure 8.3 : Modèle actuel de l'activation du NPR-A.

À l'état de base (1), le NPR-A est phosphorylé sur son KHD puisque la ou les protéines kinases (Kin) chargées de phosphoryler le KHD sont plus actives que les phosphatases chargées de le déphosphoryler (PPase). La liaison de l'ANP au domaine extracellulaire produit un changement de conformation de tout le domaine intracellulaire qui active la guanylate cyclase d'environ 10 fois. Ce changement conformationnel permet la liaison de l'ATP sur le KHD. Ceci provoque un deuxième changement conformationnel qui active maximalelement la guanylate cyclase à 100 fois par rapport au niveau de base. Le domaine KHD est ensuite déphosphorylé puisque la ou les protéines kinases associées sont moins actives, ce qui mène à un état désensibilisé très peu actif et qui ne répond plus à l'ajout d'ANP (2.5). La liaison d'ATP fait augmenter la vitesse de dissociation de

l'ANP. Lorsque l'ANP est retiré, l'ATP se dissocie, et la ou les protéines kinases rephosphorylent le KHD pour resensibiliser le NPR-A.

### **III – Production de GMPC par le domaine guanylate cyclase du NPR-A**

Dans le projet présenté au chapitre 7, nous avons voulu étudier spécifiquement le domaine guanylate cyclase du NPR-A. Nous avons voulu aussi examiner les propriétés d'inhibiteurs appelés « P-site inhibitors » (PSIs), qui ont d'abord été caractérisés comme inhibiteurs de l'adénylyl cyclase, sur cette enzyme. Nous avons travaillé avec une forme recombinante soluble du domaine GC du NPR-A exprimée dans les cellules d'insecte, et purifiée. Cette enzyme était pleinement active et ressemblait donc à l'enzyme du NPR-A activé avec ANP. Nous avons déterminé que, tout comme pour le 2'd3'AMP avec l'adénylyl cyclase, le 2'd3'GMP est un inhibiteur efficace de notre GC et qu'il agit de façon similaire aux PSIs. Lors d'expériences de production de GMPC en fonction de la concentration de GTP, nous avons obtenu une courbe typique d'une cinétique enzymatique, formant une hyperbole avec un maximum formant un plateau. L'enzyme native, un homodimère, montre une coopérativité positive pour la production de produit, et cet effet disparaît lorsqu'on inactive un des deux sites catalytiques par mutagenèse. Nous avons ensuite identifié le 2'd3'GMP comme le meilleur inhibiteur de GCp disponible commercialement. Le 2'd3'GMP avait pour effet de déplacer la courbe de cinétique enzymatique vers la droite (effet sur le  $S_{0,5}$ ) et faisait aussi baisser le maximum de la courbe (effet sur le  $V_{max}$ ). Il avait donc pour effet de faire baisser autant l'affinité de l'enzyme pour le substrat que la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction. Cependant, l'effet sur le  $S_{0,5}$  était plus marqué, avec une variation de 130 %, comparativement à 26 % pour le  $V_{max}$ . En condition plus « physiologique », c'est-à-dire avec l'addition du co-produit pyrophosphate, l'effet sur le  $S_{0,5}$  était encore plus marqué, avec une hausse de 870 %, comparativement à une baisse du  $V_{max}$  de seulement 16 %. Le 2'd3'GMP est donc un inhibiteur compétitif avec une légère composante non-compétitive. On doit donc le considérer comme un inhibiteur mixte. Seul, le 2'd3'GMP ne bloque pas la coopérativité positive de l'enzyme. Mais l'ajout de pyrophosphate inhibe cette composante coopérative.

Nous avons identifié un modèle de coopérativité positive décrit par Irwin Segel, qui peut expliquer ces résultats. Ce modèle indique qu'un inhibiteur coopératif a pour effet de faire diminuer la coopérativité du substrat, alors qu'un inhibiteur non-coopératif n'a pas d'effet sur la cinétique de coopérativité. Ceci suggère que le 2'd3'GMP en soi n'est pas un inhibiteur coopératif. Le pyrophosphate aurait donc pour effet de stabiliser l'enzyme dans un état non-coopératif post-catalyse, et aiderait ainsi la liaison du 2'd3'GMP. Ceci expliquerait la hausse importante du  $S_{0.5}$  en présence de pyrophosphate. Nos résultats suggèrent aussi que l'enzyme, dans un contexte cellulaire, n'aurait pas une cinétique coopérative importante, puisque le pyrophosphate est présent. En accord avec cette hypothèse, il est intéressant de constater qu'un modèle structural de la GCp suggère que deux molécules de GTP fixées dans les deux sites actifs se positionnent à seulement 3 Angstroms l'une de l'autre (Liu et al., 1997). Nous pouvons spéculer qu'en présence de pyrophosphate, la conformation des sites actifs ne permette la liaison que d'une molécule de GTP à la fois. Nous devons donc en conclure que le 2'd3'GMP agit comme un « P-site inhibitor » sur la GCp, puisque le second produit pyrophosphate augmente beaucoup l'effet inhibiteur du 2'd3'GMP. Cependant, cette combinaison n'agit pas selon un mode non-compétitif ou incompétitif comme pour les PSIs décrits avec l'adénylyl cyclase (Dessauer et al., 1999), mais plutôt selon un mode mixte (compétitif et non-compétitif), avec une large composante compétitive. Cette molécule semble stabiliser l'état de pré-transition en compétition avec la liaison du substrat GTP. Il serait intéressant de créer un inhibiteur sans compétition directe avec le GTP, qui stabiliserait l'état de transition de l'enzyme dans une conformation inactive. Le développement d'un nouvel analogue contenant un groupement mimétique analogue de phosphate penta-covalent, tel que décrit dans la structure de l'adénylyl cyclase (Tesmer et al., 1997), et qui imiterait ainsi l'état de transition de l'enzyme, pourrait fournir la base d'un inhibiteur très puissant et spécifique.

Récemment, un article intéressant a décrit la structure cristalline d'une adénylyl cyclase bactérienne, nommée Rv1900c (Sinha et al., 2005). Cette enzyme particulière est composée d'un domaine N-terminal  $\alpha/\beta$ -hydrolase et d'un domaine C-terminal homologue aux cyclases (CHD). Le domaine CHD ne fonctionne qu'en présence de manganèse et produit 7% de GMPc en présence d'un mélange des substrats ATP et GTP. Il est intéressant de constater que la GCp

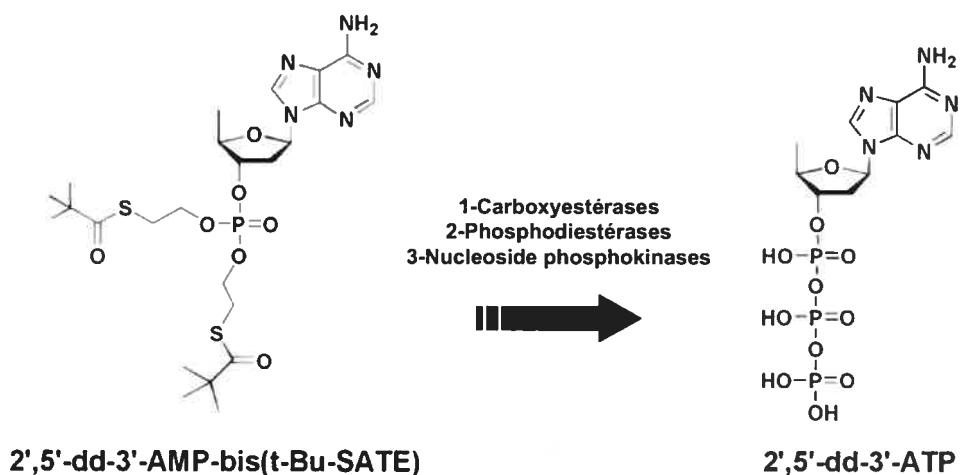


ne peut pas produire d'AMPc en présence d'ATP lorsque son ion divalent naturel, le magnésium, est présent. Cependant, en présence de manganèse, la GC peut produire des quantités significatives d'AMPc (Gerzer et al., 1981). Ceci s'explique structurellement par le fait que le manganèse déplace le nucléotide dans la fente catalytique et réduit l'impact des déterminants de la spécificité de la base purinergique (Tesmer et al., 1999). Certains résidus conservés dans l'adénylyl cyclase et nécessaires pour la reconnaissance (Lys) et le positionnement du substrat (Asn), sont modifiés dans la Rv1900c (K342N et N402H). D'ailleurs ces résidus ne sont pas essentiels à l'activité du CHD. La structure de ce domaine en absence et en présence d'un analogue d'ATP montre des homodimères asymétriques mais similaires en structure. Les résidus modifiés Asn et His n'interagissent pas avec le substrat, ce qui explique la baisse de spécificité pour la base adénine. Les sous-unités du dimère subissent un changement de conformation important lorsque l'ATP se lie. Elles forment alors un dimère fermé semblable à la structure de l'adénylyl cyclase de mammifère. C'est-à-dire que un des deux sites actifs est occupé par un ligand pendant que l'autre est sous une forme fermée inaccessible. Cette asymétrie indique que les deux sites actifs ne peuvent pas être catalytiquement actifs en même temps (Sinha et al., 2005). Ce mécanisme dans l'enzyme bactérienne suggère que les adénylyls cyclases hétérodimériques ont peut être pour ancêtre une cyclase procaryote qui a perdu sa fonction catalytique sur un des deux sites actifs.

Cet article est intéressant puisqu'il montre qu'une cyclase homodimérique ne lie qu'un seul substrat à la fois, ce qui est en accord avec nos résultats qui suggèrent que la GCp, qui est également un homodimère, ne lie qu'une molécule de GTP à la fois lors de la catalyse. D'ailleurs le coefficient de Hill mesuré pour notre domaine GC (1.35) est presque identique au coefficient de Hill mesuré pour l'homodimère de Rv1900c (1.4). Ceci suggère que bien qu'une cyclase puisse avoir un coefficient de Hill supérieur à 1.00 *in vitro*, ceci ne garantit pas la catalyse de deux molécules de substrat à la fois *in vivo*. Ces mécanismes de « réactivité de la moitié des sites » (« Half-of-sites-reactivity »), ont déjà été observés pour différentes enzymes telles que les adénylyls transférases (Izard and Geerlof, 1999), la tyrosyl-tRNA synthétase (First and Fersht, 1993), et les déshydrogénases (Nichols et al., 2004), ainsi que pour les récepteurs d'aspartate (Biemann and Koshland, 1994). Cependant, pour ces protéines, le phénomène de

« réactivité de la moitié des sites » produit de la coopérativité négative. Ici, pour la protéine Rv1900c ainsi que pour notre GCp, on observe plutôt une légère coopérativité positive *in vitro*. Sinha et collaborateurs ont suggéré que cette coopérativité pourrait provenir d'une faible liaison non catalytique de l'ATP agissant en tant qu'activateur allostérique sur le site pseudosymétrique (Sinha et al., 2005). Nos résultats suggèrent que cette hypothèse est plausible puisque nous avons totalement perdu la coopérativité lorsque nous avons inactivé par mutagenèse un des deux sites catalytique liant le GTP sur notre GCp. Nous pouvons imaginer que dans l'enzyme native, le site momentanément non catalytique est lié préférentiellement par le pyrophosphate, qui inhibe la coopérativité positive. En absence de pyrophosphate, le GTP peut lier ce site et ainsi provoquer une légère coopérativité.

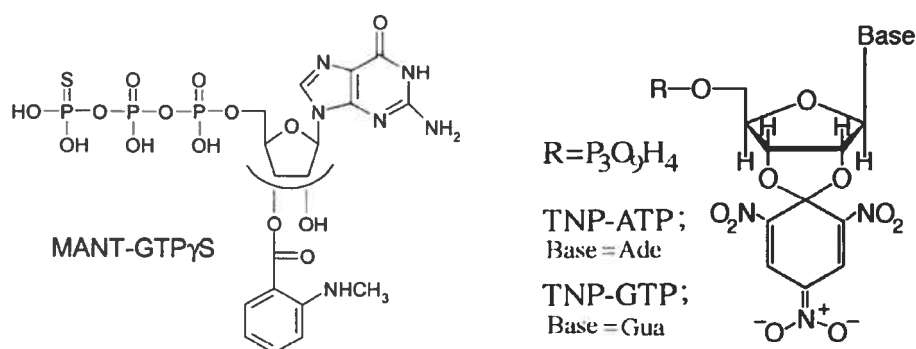
Tel que décrit au chapitre 7, les analogues d'adénosine inhibiteurs de l'adénylyl cyclase ont passablement évolué dans les dernières années. Une attention particulière a été apportée au design de molécules perméables à la cellule. C'est ainsi que la molécule 2',5'-dd-3'-AMP-bis(t-Bu-SATE) a été créé. Il avait déjà été démontré que la présence de trois ou quatre phosphates en position 3' de l'adénosine était un facteur important à avoir pour observer une inhibition importante de l'adénylyl cyclase purifiée (Shoshani et al., 1999). L'absence de groupement hydroxyle sur les positions 2' et 5' du ribose était aussi un facteur important pour l'inhibition. Cependant, ce type de molécule ne peut pas être utilisée sur des cellules ou un tissu puisque la présence des charges négatives des phosphates inhibe sa perméabilité cellulaire. C'est pourquoi Laux et collaborateurs ont synthétisé une molécule d'adénosine ayant des groupements protecteurs hydrophobes attachés au 3'-phosphate (Laux et al., 2004). Ce composé entre dans la cellule et subit deux modifications : 1) Les carboxyestérases et les phosphodiesterases retirent les groupements protecteurs. 2) Les nucléosides phosphokinases phosphorylent la position 3'. La nouvelle molécule, 2',5'-dd-3'-ATP, formée dans la cellule, inhibe fortement l'adénylyl cyclase avec un  $IC_{50}$  de 30 nM (**Figure 8.4**) (Laux et al., 2004).



**Figure 8.4** : Transformation cellulaire du 2',5'-dd-3'-AMP-bis(t-Bu-SATE) en 2',5'-dd-3'-ATP, inhibiteur de l'adénylyl cyclase.

Un autre groupe d'inhibiteurs puissants de l'adénylyl cyclase a été décrit récemment. Les nucléotides purinergiques dérivés avec un groupement MANT (N-méthylantraniloyl) en position 2' ou 3' inhibent l'adénylyl cyclase purifiée avec un  $K_i$  de 110 nM (Mou et al., 2005). Étonnamment, l'inhibiteur était trois fois plus puissant lorsque le MANT était dérivé sur le GTP plutôt que sur l'ATP (**Figure 8.5**) (Gille et al., 2004). En effet, la structure cristalline de l'adénylyl cyclase en complexe avec le GTP-MANT a démontré que le nucléotide est positionné dans une orientation inverse de celle adoptée par les analogues d'adénosine qui n'ont pas de larges groupements en position 2' ou 3' (Mou et al., 2005). Ce changement d'orientation est dû à l'intercalation du groupement MANT dans une poche hydrophobe localisée entre les domaines C1 et C2 de l'adénylyl cyclase. Il semble que le site catalytique de l'adénylyl cyclase montre une baisse de spécificité pour la base purinergique des nucléotides MANT par comparaison à d'autres analogues d'ATP. Cette baisse de spécificité est possiblement due à l'élargissement de la fente de liaison de l'inhibiteur suite à l'intercalation du groupement MANT entre les sous-domaines (Mou et al., 2006). Mou et collaborateurs ont d'ailleurs récemment démontré que les dérivés MANT possèdent un pharmacophore à trois positions (Mou et al., 2006). La dérivation en position 2' ou 3' du ribose a une très grande importance. La dérivation sur cette position d'un groupement trinitrophénylé (TNP) (**Figure 8.5**) produit un inhibiteur analogue au MANT-GTP mais sept fois moins puissant. La dérivation

du groupement MANT sur l'adénine ou l'ajout d'atomes de carbone entre le ribose et le dérivé MANT font diminuer drastiquement la puissance d'inhibition. La chaîne de trois phosphates en position 5' est la deuxième en importance, et la nature de la base a peu d'importance, puisque le dérivé de pyrimidine TNP-UTP a essentiellement la même affinité que les dérivés avec purine (Mou et al., 2006). La substitution en 2' ou 3' fournit une contribution à la puissance d'inhibition 20 fois plus importante que celle de la chaîne de phosphates, et presque 1000 fois plus que celle de la base. Ces inhibiteurs sont prometteurs puisqu'ils sont plus résistants à l'hydrolyse, et ils stabilisent une conformation de l'adénylyl cyclase qui n'a rien à voir avec la conformation de l'enzyme catalytiquement active.



**Figure 8.5 :** Dérivé méthylanthraniloyle (MANT) du GTP $\gamma$ S, et dérivé TNP.

La molécule MANT-GTP $\gamma$ S est retrouvée sous forme d'isomères avec le groupement MANT en 2' ou en 3' du ribose.

Il serait intéressant de vérifier l'effet de ces molécules sur la GCp, ou de tenter diverses substitutions en positions 2' ou 3', dans le but de créer un inhibiteur « intercalant » tel que décrit pour l'adénylyl cyclase. Le site hydrophobe de liaison de l'inhibiteur dans l'adénylyl cyclase contient certains résidus non polaires conservés mais aussi certains résidus non conservés parmi les isoformes d'adénylyls cyclases (Mou et al., 2006). Il serait donc peut-être possible de créer un groupement en position 2' ou 3' ayant une affinité préférentielle pour la GCp. D'ailleurs, les résidus qui interagissent avec l'inhibiteur dans cette poche hydrophobe de l'AC ne sont pas strictement conservés dans le NPR-A. En alignant les séquences, on remarque que le tryptophane 1020 de l'AC correspond à la phénylalanine 963 du NPR-A, l'alanine 409 correspond à la proline 862 du

NPR-A, et l'isoleucine 1006 correspond à la cystéine 949 du NPR-A. La mutation de l'alanine 409 en proline et de l'isoleucine 1006 en valine a justement fait chuter de 10 fois la puissance d'inhibition du GTP-MANT sur l'AC (Mou et al., 2005). Il serait donc envisageable de créer une molécule analogue au GTP-MANT, ayant une affinité préférentielle pour la GCp comparée à l'AC. Ce type de composé pourrait servir de molécule de départ pour le développement d'inhibiteurs spécifiques à la GCp, puissants, et biodisponibles.

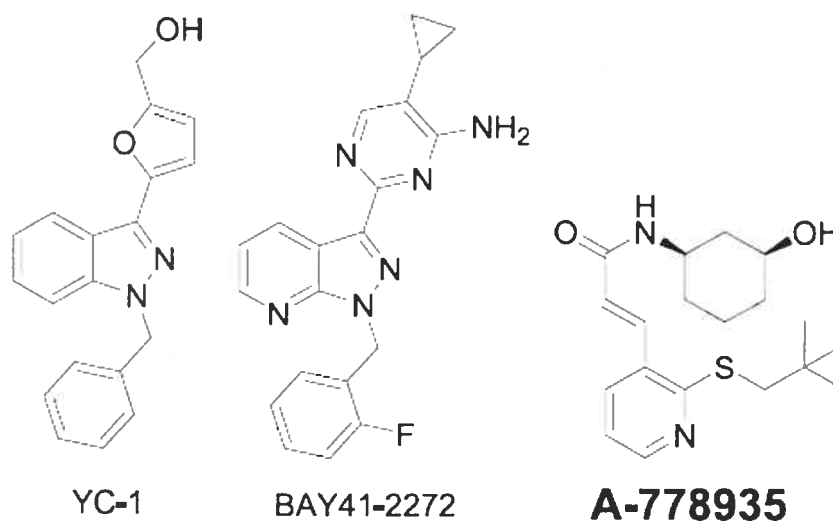
Tel qu'indiqué au chapitre 7, les paramètres de cinétique enzymatique de la GCp obtenus en présence de manganèse étaient très différents de ceux mesurés en présence de magnésium. De plus, les études des dérivés MANT et plusieurs études sur les inhibiteurs de sites P ont été largement effectuées en utilisant le manganèse en haute concentration (3-4 mM) comme ion divalent (Dessauer et al., 1999; Mou et al., 2006). Ceci limite la capacité de choisir les molécules ayant le meilleur potentiel d'inhibition dans un contexte cellulaire. En effet, les concentrations de cet ion divalent dans les tissus humains sont finement régulées, puisque, bien que nécessaire à l'activité de certaines enzymes, de hautes concentrations de manganèse sont toxiques dans certains tissus (Roth and Garrick, 2003). C'est pourquoi les niveaux de manganèse cellulaire dépassent rarement 20  $\mu\text{M}$  (Roth and Garrick, 2003). Il serait donc important d'effectuer les études d'inhibition *in vitro* en présence de l'ion magnésium.

Analogue à la guanylate cyclase particulaire, la guanylate cyclase soluble, activée par l'oxyde nitrique (NO), est une protéine hautement étudiée. Plusieurs démonstrations cliniques et expérimentales indiquent que la diminution de la réponse au NO de cette enzyme contribue au développement de la dysfonction érectile et de maladies cardiovasculaires, pulmonaires, endothéliales, rénales, et hépatiques (Evgenov et al., 2006). Certaines de ces conditions sont présentement traitées avec des dérivés nitrés qui relâchent du NO dans la circulation. Cependant, l'usage de ces molécules est limité pour trois raisons : 1) Elles sont parfois mal métabolisées par l'aldéhyde déhydrogénase-2 chez certains individus, surtout les asiatiques, ce qui limite hautement son efficacité (Li et al., 2006). 2) Les sujets traités à long terme développent une tolérance (Munzel et al., 2005). 3) Le NO à haute dose peut former, en s'associant à l'anion superoxyde, une forme réactive de peroxy-nitrite qui contribue à l'inactivation de la GCs et au dommage

tissulaire (Dikalov et al., 1998). De plus, bien que ces dérivés nitrés éliminent les symptômes chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires, ils ne réduisent pas la mortalité associée à ces maladies. C'est pourquoi plusieurs groupes de recherche ont tenté de trouver une façon d'activer la GCs, indépendamment du NO.

Tel que décrit au chapitre deux, la sous-unité  $\beta$  de la GCs contient le site de liaison de l'hème. Celui-ci est essentiel pour la liaison du NO, et il est stabilisé par sa liaison à quatre acides aminés importants (His-105, Tyr-135, Ser-137, Arg-139) (Schmidt et al., 2004). Le groupement hème doit être complexé à un atome de fer sous forme réduite ( $Fe^{2+}$ ) pour lier le NO. La forme oxydée ( $Fe^{3+}$ ) ne lie pas le NO. D'ailleurs, les inhibiteurs connus de la GCs sont des agents oxydants de la GCs (ODQ, NS2028, bleu de méthylène, ferricyanure) (Zhao et al., 2000). Suite aux recherches de petites molécules activatrices de la GCs, on distingua deux classes de molécules : 1) Les stimulateurs de GCs, qui activent directement la GCs et augmentent la sensibilité de l'enzyme réduite à de faibles niveaux de NO. 2) Les activateurs de GCs, qui ne modulent pas la signalisation du NO, mais activent plutôt la forme oxydée ou sans groupement hème, non activée par le NO. Le premier stimulateur stable de GCs, une molécule nommée YC-1, a été découvert en 1994 (Ko et al., 1994). Il a été suggéré que YC-1 se lie au domaine catalytique de la GCs, et active l'enzyme de façon analogue à l'activation de l'adénylyl cyclase par la forskoline (Mayer and Koesling, 2001). Cette hypothèse a été supportée récemment par une étude qui démontre que YC-1 et d'autres molécules analogues interagissent avec le domaine catalytique de la GCs (Yazawa et al., 2006). En effet, la GCs contient un seul site catalytique et un site pseudosymétrique non catalytique. Yazawa et collaborateurs, en utilisant la dialyse à l'équilibre, ont montré la présence de deux sites de liaison avec haute et basse affinité pour le GMP-CPP, un analogue de GTP (Yazawa et al., 2006). Contrairement au GMP-CPP, le 2'-dADP occupait les deux sites avec la même affinité. L'AMP-PNP, un analogue d'ATP inhibiteur de la catalyse, se liait seulement sur le site de haute affinité. Les stimulateurs de GCs YC-1 et BAY 41-2272 (**Figure 8.6**) avaient pour effet de déplacer les nucléosides du site non catalytique de liaison de faible affinité. Dans ce contexte, ils stabiliseraient l'enzyme dans une conformation propice à l'activité du site catalytique (Yazawa et al., 2006). D'autres stimulateurs de GCs ont été décrits, et présentent une

structure différente, analogue à l'acrylamide (Nakane et al., 2006). De ceux-ci, le A-778935 a le même  $EC_{50}$  sur la GCs purifiée que le BAY 41-2272 (0.3  $\mu$ M) mais présente une structure très différente (**Figure 8.6**). Le site de liaison de ces agents n'est pas connu. Pour ce qui est des activateurs de GCs, ils agiraient plutôt comme des analogues de la forme réduite du groupement hème ferreux, qui peuvent déplacer la forme oxydée pour lier avec haute affinité la poche de liaison de l'hème, et induire ainsi une conformation de l'enzyme propice à la catalyse (Evgenov et al., 2006).



**Figure 8.6** : Structure chimique de stimulateurs de la GCs.

La structure de la GCs étant analogue à celle de la GCp, nous pouvons imaginer le design ou le criblage d'une petite molécule spécifique analogue de YC-1 ou de BAY 41-2272, qui stabiliserait la GCp sous une forme constitutivement active. Cette molécule aurait la propriété d'agir comme un activateur allostérique nettement plus puissant que la légère activation coopérative allostérique induite par le GTP dans nos études de cinétique enzymatique. Tout comme pour la GCs avec la combinaison YC-1 / NO, il est probable que l'augmentation de l'activité catalytique de la GCp dans ce cas serait dépendante de l'activateur naturel (ANP) et agirait de façon synergique lorsque combiné à celui-ci. Puisque la désensibilisation *in vitro* du NPR-A n'est pas complète même suite à un traitement avec une dose massive d'ANP (1  $\mu$ M) (Potter and Garbers, 1992; Joubert et al., 2001), il est tentant de penser qu'un tel stimulateur pour le

NPR-A pourrait faire augmenter radicalement les niveaux de GMPc produits et agir comme inhibiteur de la désensibilisation / tolérance pour ce récepteur. Les activateurs de GCs indépendants de l'hème ont été découverts en utilisant un essai cellulaire simple qui couple l'activité guanylate cyclase au canal à calcium GMPc-dépendant (Wunder et al., 2005). Ces cellules contiennent aussi l'aequorine, une photoprotéine qui émet de la lumière bleue lorsqu'elle lie le calcium en présence du substrat coelenterazine. Une autre plate forme de criblage de composés spécifiques à la GCp pourrait donc être créée en utilisant des cellules exprimant plutôt cette protéine. Ces investigations pourraient mener à la découverte d'activateurs spécifiques à la GCp.



## Conclusion

Nos travaux ont conduit à l'identification de nouveaux modes de régulation de l'activité du NPR-A. Nous avons d'abord détaillé le mécanisme de déphosphorylation du NPR-A, un phénomène qui mène à la désensibilisation. La ou les protéines kinases chargées de phosphoryler le NPR-A ont un rôle important puisqu'elles contrôlent l'entrée du récepteur dans sa phase de désensibilisation. L'identité des protéines impliquées dans ce mécanisme est par contre toujours inconnue, mais nous avons démontré que la PKG et l'AMPK ne sont pas impliquées. Nous avons de plus démontré que l'ATP est un régulateur allostérique important du NPR-A, et qu'il produit ses effets, sur la liaison du ligand ANP et sur l'activité guanylate cyclase, en se liant directement sur le domaine pseudokinase KHD central de la protéine NPR-A. Finalement, nous avons déterminé que le domaine GC du NPR-A peut être inhibé efficacement par des analogues des inhibiteurs PSIs d'abord décrits comme inhibiteurs de l'adénylyl cyclase. Basé sur des résultats de cinétique enzymatique avec ce domaine GC, nous avons suggéré un modèle enzymatique qui ajoute un bémol à ce qui était suggéré jusqu'à maintenant dans la littérature. En effet, cette enzyme avait toujours été décrite comme ayant un mode de catalyse coopératif, où la liaison et la catalyse d'une molécule de GTP sur un des deux sites actifs favorisent la liaison et la catalyse sur l'autre site actif. Nous avons plutôt démontré qu'en présence du second produit pyrophosphate, la catalyse par la GCp ne montre presque plus de coopérativité, ce qui suggère qu'en condition physiologique, la GCp fonctionne surtout de façon asymétrique, en catalysant la formation du GMPc une molécule à la fois. Nos résultats vont de pair avec une réactivité de la moitié des sites (« Half-of-sites-reactivity ») avec la possibilité d'une légère coopérativité positive *in vitro*. De plus, contrairement aux inhibiteurs de site P étudiés avec l'adénylyl cyclase, nous avons montré que le 2'd3'GMP inhibe la GCp selon un mode mixte hautement compétitif. Le développement d'un analogue de GTP contenant, en position 2' ou 3', un mimétique de phosphate pentacovalent, qui imiterait ainsi l'état de transition de l'enzyme, pourrait fournir la base d'un inhibiteur plus puissant et spécifique.

La connaissance des mécanismes de régulation du NPR-A est importante puisqu'elle pourrait permettre l'activation ou l'inactivation du NPR-A avec des agents pharmacologiques. Nous connaissons maintenant diverses situations pathologiques où il serait possiblement profitable de jouer sur le niveau d'activité de cette voie.

Dans certaines situations pathologiques, comme l'insuffisance cardiaque ou l'hypertension, les niveaux des peptides natriurétiques circulants sont très élevés. Malgré cela, le cœur entre dans une phase critique de croissance menant à une hypertrophie marquée. Cette situation où le NPR-A est en présence de concentrations élevées de peptides ANP ou BNP mène possiblement à sa désensibilisation. L'inhibition du processus de désensibilisation du NPR-A pourrait donc permettre d'inhiber la croissance des cellules cardiaques et agirait positivement sur le système cardiovasculaire en général.

Une étude récente a soulevé une situation où il serait plutôt utile de bloquer la voie ANP / BNP / NPR-A (Izumi et al., 2001). L'infarctus du myocarde aigu est une cause majeure de décès dans les pays développés. Bien que la reperfusion des artères coronaires réduit la mortalité, elle provoque un dommage tissulaire important. Cette blessure de reperfusion est causée par une infiltration de neutrophiles dans l'endothélium, médiée par les sélectines P. Le mécanisme d'induction de l'expression des sélectines P n'était pas connu. Les auteurs de l'étude ont montré que la taille de la blessure était moins grande chez des souris n'exprimant pas le NPR-A. Il y avait aussi moins d'infiltration de neutrophiles et l'expression de sélectine P était diminuée. Le traitement avec un inhibiteur du NPR-A, le HS-142-1, a eu le même effet. Les souris n'exprimant pas le NPR-A ne montrent pas non plus d'activation de la voie NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription qui promeut l'expression de sélectine P. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition du NPR-A diminue la blessure de reperfusion en supprimant l'activation NF- $\kappa$ B-dépendante de l'expression de sélectine P. Il serait donc intéressant de bloquer la voie du NPR-A dans le traitement clinique du dommage induit par la reperfusion suite à un infarctus (Izumi et al., 2001). L'inhibition du NPR-A et du NPR-B pourrait également être bénéfique pour les patients en choc septique. En effet, les trois peptides natriurétiques, ANP, BNP, et CNP sont

nettement augmentés dans la circulation chez ces patients et ont probablement un rôle à jouer dans l'hypotension sévère observée dans cette pathologie.

Les résultats obtenus en étudiant le domaine GC du NPR-A nous permettent aussi d'imaginer le design d'inhibiteurs spécifiques de la GC-C, impliquée dans la pathologie de la diarrhée sécrétoire induite par les entérotoxines bactériennes. Les entérotoxines sécrétées suite à cette intoxication bactérienne peuvent s'avérer dangereuses pour les jeunes enfants et les personnes âgées, et sont aussi très désagréables pour l'adulte. Cette maladie, communément appelée « Tourista », affecte d'ailleurs des milliers de voyageurs chaque année.

## **Bibliographie**

Abbey-Hosch, S.E., Cody, A.N., and Potter, L.R. (2004). Sphingosine-1-phosphate inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase B (GC-B/NPR-B). *Hypertension* 43, 1103-9.

Abbey, S.E. and Potter, L.R. (2002). Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *J Biol Chem* 277, 42423-30.

Abbey, S.E. and Potter, L.R. (2003). Lysophosphatidic acid inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase-B. *Endocrinology* 144, 240-6.

Agui, T., Xin, X., Cai, Y., Shim, G., Muramatsu, Y., Yamada, T., Fujiwara, H., and Matsumoto, K. (1995). Opposite actions of transforming growth factor-beta 1 on the gene expression of atrial natriuretic peptide biological and clearance receptors in a murine thymic stromal cell line. *J Biochem (Tokyo)* 118, 500-7.

Airhart, N., Yang, Y.F., Roberts, C.T. Jr, and Silberbach, M. (2003). Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *J Biol Chem* 278, 38693-8.

Almeida, F.A., Suzuki, M., and Maack, T. (1986). Atrial natriuretic factor increases hematocrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats. *Life Sci* 39, 1193-9.

Anand-Srivastava, M.B. (2005). Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26, 1044-59.

Anand-Srivastava, M.B., Sairam, M.R., and Cantin, M. (1990). Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem* 265, 8566-72.

Anand-Srivastava, M.B., Sehl, P.D., and Lowe, D.G. (1996). Cytoplasmic domain

of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem* 271, 19324-9.

Anand-Srivastava, M.B., Srivastava, A.K., and Cantin, M. (1987). Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 262, 4931-4.

Antos, L.K., Abbey-Hosch, S.E., Flora, D.R., and Potter, L.R. (2005). ATP-independent activation of natriuretic peptide receptors. *J Biol Chem* 280, 26928-32.

Antunes-Rodrigues, J., McCann, S.M., Rogers, L.C., and Samson, W.K. (1985). Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8720-3.

Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M., and Price, T.D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11, 330-4.

Barbee, R.W., Perry, B.D., Re, R.N., Murgu, J.P., and Field, L.J. (1994). Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 74, 747-51.

Barrett, P.Q. and Isales, C.M. (1988). The role of cyclic nucleotides in atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of aldosterone secretion. *Endocrinology* 122, 799-808.

Bartels, C.F., Bukulmez, H., Padayatti, P., Rhee, D.K., van Ravenswaaij-Arts, C., Pauli, R.M., Mundlos, S., Chitayat, D., Shih, L.Y., Al-Gazali, L.I., Kant, S., Cole, T., Morton, J., Cormier-Daire, V., Faivre, L., Lees, M., Kirk, J., Mortier, G.R., Leroy, J., Zabel, B., Kim, C.A., Crow, Y., Braverman, N.E., van den Akker, F., and Warman, M.L. (2004). Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet* 75, 27-34.

Bennett, B.D., Bennett, G.L., Vitangcol, R.V., Jewett, J.R., Burnier, J., Henzel, W., and Lowe, D.G. (1991). Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem* 266, 23060-7.

Berl, T., Mansour, J., and Teitelbaum, I. (1991). ANP stimulates phospholipase C in cultured RIMCT cells: roles of protein kinases and G protein. *Am J Physiol* 260, F590-5.

Biemann, H.P. and Koshland, D.E. Jr (1994). Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry* 33, 629-34.

Boerrigter, G. and Burnett, J.C. Jr (2004). Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 13, 643-52.

Brown, J., Chen, Q., and Hong, G. (1997). An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair. *Am J Physiol* 272, H2919-31.

Bryan, P.M. and Potter, L.R. (2002). The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *J Biol Chem* 277, 16041-7.

Bryan, P.M., Smirnov, D., Smolenski, A., Feil, S., Feil, R., Hofmann, F., Lohmann, S., and Potter, L.R. (2006). A Sensitive Method for Determining the Phosphorylation Status of Natriuretic Peptide Receptors: cGK-Ialpha Does Not Regulate NPR-A. *Biochemistry* 45, 1295-1303.

Burnett, J.C. Jr, Granger, J.P., and Opgenorth, T.J. (1984). Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am J Physiol* 247, F863-6.

Calderone, A., Thaik, C.M., Takahashi, N., Chang, D.L., and Colucci, W.S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin*

Invest *101*, 812-8.

Cao, L., Chen, S.C., Cheng, T., Humphreys, M.H., and Gardner, D.G. (1998). Ligand-dependent regulation of NPR-A gene expression in inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* *275*, F119-25.

Cao, L. and Gardner, D.G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* *25*, 227-34.

Cao, L., Wu, J., and Gardner, D.G. (1995). Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* *270*, 24891-7.

Carini, R., De Cesaris, M.G., Splendore, R., Domenicotti, C., Nitti, M.P., Pronzato, M.A., and Albano, E. (2003). Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology* *37*, 277-85.

Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P., and Weiner, C.P. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* *184*, 409-20.

Cauliez, B., Berthe, M.C., and Lavoigne, A. (2005). [Brain natriuretic peptide: physiological, biological and clinical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* *63*, 15-25.

Chan, J.C., Knudson, O., Wu, F., Morser, J., Dole, W.P., and Wu, Q. (2005). Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 785-90.

Chang, F.J., Lemme, S., Sun, Q., Sunahara, R.K., and Beuve, A. (2005). Nitric oxide-dependent allosteric inhibitory role of a second nucleotide binding site in soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* *280*, 11513-9.

Chang, M.S., Lowe, D.G., Lewis, M., Hellmiss, R., Chen, E., and Goeddel, D.V. (1989). Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* *341*, 68-72.

Chartier, L., Schiffrin, E., Thibault, G., and Garcia, R. (1984). Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II, ACTH and potassium in vitro and angiotensin II-induced steroidogenesis in vivo. *Endocrinology* *115*, 2026-8.

Chauhan, S.D., Hobbs, A.J., and Ahluwalia, A. (2004). C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarising factor. *Int J Biochem Cell Biol* *36*, 1878-81.

Chauhan, S.D., Nilsson, H., Ahluwalia, A., and Hobbs, A.J. (2003). Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1426-31.

Chen, Z.J., Song, D.L., Miao, Z., and Chang, C.H. (2001). Proteolytic activation of membrane-bound guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* *61*, 915-20.

Chikuda, H., Kugimiya, F., Hoshi, K., Ikeda, T., Ogasawara, T., Shimoaka, T., Kawano, H., Kamekura, S., Tsuchida, A., Yokoi, N., Nakamura, K., Komeda, K., Chung, U.I., and Kawaguchi, H. (2004). Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* *18*, 2418-29.

Chinkers, M. (1994). Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 11075-9.

Chinkers, M. and Garbers, D.L. (1989). The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* *245*, 1392-4.

Chinkers, M., Garbers, D.L., Chang, M.S., Lowe, D.G., Chin, H.M., Goeddel, D.V., and Schulz, S. (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* *338*, 78-83.

Chinkers, M., Singh, S., and Garbers, D.L. (1991). Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J Biol Chem* *266*, 4088-93.



Chinkers, M. and Wilson, E.M. (1992). Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 267, 18589-97.

Chrisman, T.D. and Garbers, D.L. (1999). Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 4293-9.

Chrisman, T.D., Perkins, D.T., and Garbers, D.L. (2003). Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Commun Signal* 1, 4.

Chun, T.H., Itoh, H., Ogawa, Y., Tamura, N., Takaya, K., Igaki, T., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Korenaga, R., Ando, J., and Nakao, K. (1997). Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension* 29, 1296-302.

Chun, Y.S., Hyun, J.Y., Kwak, Y.G., Kim, I.S., Kim, C.H., Choi, E., Kim, M.S., and Park, J.W. (2003). Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J* 370, 149-57.

Chusho, H., Ogawa, Y., Tamura, N., Suda, M., Yasoda, A., Miyazawa, T., Kishimoto, I., Komatsu, Y., Itoh, H., Tanaka, K., Saito, Y., Garbers, D.L., and Nakao, K. (2000). Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology* 141, 3807-13.

Chusho, H., Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Suda, M., Miyazawa, T., Nakamura, K., Nakao, K., Kurihara, T., Komatsu, Y., Itoh, H., Tanaka, K., Saito, Y., Katsuki, M., and Nakao, K. (2001). Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4016-21.

Cody, R.J., Atlas, S.A., Laragh, J.H., Kubo, S.H., Covit, A.B., Ryman, K.S., Shaknovich, A., Pondolfino, K., Clark, M., Camargo, M.J., and et, a.l. (1986). Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels

and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 78, 1362-74.

Cohen, D., Koh, G.Y., Nikonova, L.N., Porter, J.G., and Maack, T. (1996). Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J Biol Chem* 271, 9863-9.

Collins, E., Bracamonte, M.P., Burnett, J.C. Jr, and Miller, V.M. (2000). Mechanism of relaxations to dendroaspis natriuretic peptide in canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 35, 614-8.

Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., and Ornitz, D.M. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12, 390-7.

Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., and Lincoln, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40, 923-31.

Crook, R.B. and Chang, A.T. (1997). Differential regulation of natriuretic peptide receptors on ciliary body epithelial cells. *Biochem J* 324 (Pt 1), 49-55.

Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L., and Smith, C.E. (1992). Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 947-51.

Currie, M.G., Geller, D.M., Cole, B.R., Siegel, N.R., Fok, K.F., Adams, S.P., Eubanks, S.R., Galluppi, G.R., and Needleman, P. (1984). Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science* 223, 67-9.

Day, M.L., Schwartz, D., Wiegand, R.C., Stockman, P.T., Brunnert, S.R., Tolunay, H.E., Currie, M.G., Standaert, D.G., and Needleman, P. (1987). Ventricular atriopeptin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. *Hypertension* 9, 485-91.

de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., and Sonnenberg, H. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28, 89-94.

de Bold, A.J., de Bold, M.L., and Sarda, I.R. (1986). Functional-morphological studies on in vitro cardionatriin release. *J Hypertens Suppl* 4, S3-7.

De Lean, A. (1986). Amiloride potentiates atrial natriuretic factor inhibitory action by increasing receptor binding in bovine adrenal zona glomerulosa. *Life Sci* 39, 1109-16.

De Lean, A., McNicoll, N., and Labrecque, J. (2003). Natriuretic peptide receptor A activation stabilizes a membrane-distal dimer interface. *J Biol Chem* 278, 11159-66.

De Lean, A., Racz, K., Gutkowska, J., Nguyen, T.T., Cantin, M., and Genest, J. (1984). Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 115, 1636-8.

De Lean, A., Thibault, G., Seidah, N.G., Lazure, C., Gutkowska, J., Chretien, M., Genest, J., and Cantin, M. (1985). Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). III. Correlation of receptor affinity with relative potency on aldosterone production in zona glomerulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 132, 360-7.

Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., and Gilman, A.G. (1999). The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 20, 205-10.

Dikalov, S., Fink, B., Skatchkov, M., Stalleicken, D., and Bassenge, E. (1998). Formation of reactive oxygen species by pentaerythryltetranitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 938-44.

Doi, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Igaki, T., Chun, T.H., Takaya, K., Yamashita, J.,

Inoue, M., Yoshimasa, T., and Nakao, K. (1996). Vascular endothelial growth factor suppresses C-type natriuretic peptide secretion. *Hypertension* 27, 811-5.

Drewett, J.G., Fendly, B.M., Garbers, D.L., and Lowe, D.G. (1995). Natriuretic peptide receptor-B (guanylyl cyclase-B) mediates C-type natriuretic peptide relaxation of precontracted rat aorta. *J Biol Chem* 270, 4668-74.

Duda, T., Jankowska, A., Venkataraman, V., Nagele, R.G., and Sharma, R.K. (2001). A novel calcium-regulated membrane guanylate cyclase transduction system in the olfactory neuroepithelium. *Biochemistry* 40, 12067-77.

Duda, T., Venkataraman, V., Ravichandran, S., and Sharma, R.K. (2005). ATP-regulated module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Peptides* 26, 969-84.

Duda, T., Yadav, P., Jankowska, A., Venkataraman, V., and Sharma, R.K. (2000). Three dimensional atomic model and experimental validation for the ATP-Regulated Module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Mol Cell Biochem* 214, 7-14.

Edwards, B.S., Zimmerman, R.S., Schwab, T.R., Heublein, D.M., and Burnett, J.C. Jr (1988). Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 62, 191-5.

Elferink, J.G. and De Koster, B.M. (1995). Atrial natriuretic factor stimulates migration by human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 288, 335-40.

Erdo, E.G. and Skidgel, R.A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 3, 145-51.

Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Hasko, G., Schmidt, H.H., and Stasch, J.P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 5, 755-68.

Evrard, A., Hober, C., Racadot, A., Lefebvre, J., and Vantuyghem, M.C. (1999). [Atrial natriuretic hormone and endocrine functions]. *Ann Biol Clin (Paris)* 57,

149-55.

Fan, D., Bryan, P.M., Antos, L.K., Potthast, R.J., and Potter, L.R. (2005). Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol Pharmacol* 67, 174-83.

Fenrick, R., Bouchard, N., McNicoll, N., and De Lean, A. (1997). Glycosylation of asparagine 24 of the natriuretic peptide receptor-B is crucial for the formation of a competent ligand binding domain. *Mol Cell Biochem* 173, 25-32.

Fenrick, R., McNicoll, N., and De Lean, A. (1996). Glycosylation is critical for natriuretic peptide receptor-B function. *Mol Cell Biochem* 165, 103-9.

Field, M., Graf, L.H. Jr, Laird, W.J., and Smith, P.L. (1978). Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2800-4.

Fifer, M.A., Molina, C.R., Quiroz, A.C., Giles, T.D., Herrmann, H.C., De Scheerder, I.R., Clement, D.L., Kubo, S., Cody, R.J., Cohn, J.N., and et, a.l. (1990). Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 65, 211-6.

First, E.A. and Fersht, A.R. (1993). Mutation of lysine 233 to alanine introduces positive cooperativity into tyrosyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 32, 13651-7.

Fluckiger, J.P., Waeber, B., Matsueda, G., Delaloye, B., Nussberger, J., and Brunner, H.R. (1986). Effect of atriopeptin III on hematocrit and volemia of nephrectomized rats. *Am J Physiol* 251, H880-3.

Flynn, T.G., de Bold, M.L., and de Bold, A.J. (1983). The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 117, 859-65.

Fonarow, G.C. (2003). B-type natriuretic peptide: spectrum of application.

Nesiritide (recombinant BNP) for heart failure. *Heart Fail Rev* 8, 321-5.

Forssmann, W., Meyer, M., and Forssmann, K. (2001). The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovasc Res* 51, 450-62.

Forte, L.R. Jr (2004). Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther* 104, 137-62.

Fortin, Y. and De Lean, A. (2006). Role of cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 539-46.

Foster, D.C. and Garbers, D.L. (1998). Dual role for adenine nucleotides in the regulation of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A. *J Biol Chem* 273, 16311-8.

Franco, F., Dubois, S.K., Peshock, R.M., and Shohet, R.V. (1998). Magnetic resonance imaging accurately estimates LV mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 274, H679-83.

Friebe, A. and Koesling, D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93, 96-105.

Fujii, K., Ishimatsu, T., and Kuriyama, H. (1986). Mechanism of vasodilation induced by alpha-human atrial natriuretic polypeptide in rabbit and guinea-pig renal arteries. *J Physiol* 377, 315-32.

Fujio, N., Gossard, F., Bayard, F., and Tremblay, J. (1994). Regulation of natriuretic peptide receptor A and B expression by transforming growth factor-beta 1 in cultured aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 23, 908-13.

Fuller, F., Porter, J.G., Arfsten, A.E., Miller, J., Schilling, J.W., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A., and Schenk, D.B. (1988). Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 263, 9395-401.

Furuya, M., Yoshida, M., Hayashi, Y., Ohnuma, N., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1991). C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 927-31.

Gagelmann, M., Hock, D., and Forssmann, W.G. (1988). Urodilatin (CDD/ANP-95-126) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide/cardiodylatin (alpha-hANP/CDD-99-126). *FEBS Lett* 233, 249-54.

Galitzky, J., Sengenès, C., Thalamas, C., Marques, M.A., Senard, J.M., Lafontan, M., and Berlan, M. (2001). The lipid-mobilizing effect of atrial natriuretic peptide is unrelated to sympathetic nervous system activation or obesity in young men. *J Lipid Res* 42, 536-44.

Gambaryan, S., Wagner, C., Smolenski, A., Walter, U., Poller, W., Haase, W., Kurtz, A., and Lohmann, S.M. (1998). Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9003-8.

Ganguly, A., Chiou, S., West, L.A., and Davis, J.S. (1989). Atrial natriuretic factor inhibits angiotensin-induced aldosterone secretion: not through cGMP or interference with phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 148-54.

Garcia, R., Thibault, G., Seidah, N.G., Lazure, C., Cantin, M., Genest, J., and Chretien, M. (1985). Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). II. Effect of chain-length modifications on vascular reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 178-84.

Garg, R., Oliver, P.M., Maeda, N., and Pandey, K.N. (2002). Genomic structure, organization, and promoter region analysis of murine guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A gene. *Gene* 291, 123-33.

Garg, R. and Pandey, K.N. (2003). Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription. *Hypertension* 41, 730-6.

Gerbes, A.L., Dagnino, L., Nguyen, T., and Nemer, M. (1994). Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1307-11.

Gerzer, R., Hofmann, F., and Schultz, G. (1981). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem* 116, 479-86.

Giblin, M.F., Gali, H., Sieckman, G.L., Owen, N.K., Hoffman, T.J., Forte, L.R., and Volkert, W.A. (2004). In vitro and in vivo comparison of human *Escherichia coli* heat-stable peptide analogues incorporating the <sup>111</sup>In-DOTA group and distinct linker moieties. *Bioconjug Chem* 15, 872-80.

Gille, A., Lushington, G.H., Mou, T.C., Doughty, M.B., Johnson, R.A., and Seifert, R. (2004). Differential inhibition of adenylyl cyclase isoforms and soluble guanylyl cyclase by purine and pyrimidine nucleotides. *J Biol Chem* 279, 19955-69.

Goy, M.F., Oliver, P.M., Purdy, K.E., Knowles, J.W., Fox, J.E., Mohler, P.J., Qian, X., Smithies, O., and Maeda, N. (2001). Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochem J* 358, 379-87.

Gravel, M., Di Polo, A., Valera, P.B., and Braun, P.E. (1998). Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice. *J Neurosci Res* 53, 393-404.

Grepin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T., and Nemer, M. (1994). A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 14, 3115-29.

Grepin, C., Nemer, G., and Nemer, M. (1997). Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 124, 2387-95.

Hagiwara, H., Inoue, A., Yamaguchi, A., Yokose, S., Furuya, M., Tanaka, S., and



Hirose, S. (1996). cGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Am J Physiol* 270, C1311-8.

Hagiwara, H., Sakaguchi, H., Itakura, M., Yoshimoto, T., Furuya, M., Tanaka, S., and Hirose, S. (1994a). Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. *J Biol Chem* 269, 10729-33.

Hagiwara, H., Sakaguchi, H., Lodhi, K.M., Suda, K., and Hirose, S. (1994b). Subtype switching of natriuretic peptide receptors in rat chondrocytes during in vitro culture. *J Biochem (Tokyo)* 116, 606-9.

Hamad, A.M., Clayton, A., Islam, B., and Knox, A.J. (2003). Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L973-83.

Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S.C., Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M., and Genest, J. (1984). Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 515-27.

Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tompkins, J.A., Fok, K.F., Smith, C.E., and et, a.l. (1993). Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10464-8.

Haneda, M., Kikkawa, R., Maeda, S., Togawa, M., Koya, D., Horide, N., Kajiwar, N., and Shigeta, Y. (1991). Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int* 40, 188-94.

Harris, P.J., Thomas, D., and Morgan, T.O. (1987). Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 326, 697-8.

Hartt, D.J., Ogiwara, T., Ho, A.K., and Chik, C.L. (1995). Cyclic GMP stimulates growth hormone release in rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 918-26.

Hashimoto, Y., Nakao, K., Hama, N., Imura, H., Mori, S., Yamaguchi, M., Yasuhara, M., and Hori, R. (1994). Clearance mechanisms of atrial and brain natriuretic peptides in rats. *Pharm Res* 11, 60-4.

Hatcher, C.J., Kim, M.S., and Basson, C.T. (2000). Atrial form and function: lessons from human molecular genetics. *Trends Cardiovasc Med* 10, 93-101.

He, P., Zeng, M., and Curry, F.E. (1998). cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of. *Am J Physiol* 274, H1865-74.

He, X.L., Chow, D.C., Martick, M.M., and Garcia, K.C. (2001). Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* 293, 1657-62.

Heim, J.M., Ivanova, K., and Gerzer, R. (1988). Amiloride increases the sensitivity of particulate guanylate cyclase to atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 152, 1263-8.

Heim, J.M., Singh, S., and Gerzer, R. (1996). Effect of glycosylation on cloned ANF-sensitive guanylyl cyclase. *Life Sci* 59, PL61-8.

Hempel, A., Noll, T., Bach, C., Piper, H.M., Willenbrock, R., Hohnel, K., Haller, H., and Luft, F.C. (1998). Atrial natriuretic peptide clearance receptor participates in modulating endothelial permeability. *Am J Physiol* 275, H1818-25.

Henry, J.P., Gauer, O.H., and Reeves, J.L. (1956). Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 4, 85-90.

Henry, J.P. and Pearce, J.W. (1956). The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *J Physiol* 131, 572-85.

Herman, J.P., Dolgas, C.M., Rucker, D., and Langub, M.C. Jr (1996). Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369, 165-87.

Hirose, S., Akiyama, F., Shinjo, M., Ohno, H., and Murakami, K. (1985).

Solubilization and molecular weight estimation of atrial natriuretic factor receptor from bovine adrenal cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 130, 574-9.

Hirsch, J.R., Skutta, N., and Schlatter, E. (2003). Signaling and distribution of NPR-Bi, the human splice form of the natriuretic peptide receptor type B. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F370-4.

Hobbs, A., Foster, P., Prescott, C., Scotland, R., and Ahluwalia, A. (2004). Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation* 110, 1231-5.

Holliday, L.S., Dean, A.D., Greenwald, J.E., and Glucks, S.L. (1995). C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated mouse bone marrow cultures. *J Biol Chem* 270, 18983-9.

Hollister, A.S., Tanaka, I., Imada, T., Onrot, J., Biaggioni, I., Robertson, D., and Inagami, T. (1986). Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels. *Hypertension* 8, 1106-11.

Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Potthast, R., Zetsche, B., Hammer, R.E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7142-7.

Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B.V., Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., and Kuhn, M. (2003). Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111, 1399-407.

Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., and Kangawa, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35, 19-24.

Houweling, A.C., van Borren, M.M., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2005). Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene

Nppa during development and disease. *Cardiovasc Res* 67, 583-93.

Hughes, J.M., Murad, F., Chang, B., and Guerrant, R.L. (1978). Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* 271, 755-6.

Hum, D., Besnard, S., Sanchez, R., Devost, D., Gossard, F., Hamet, P., and Tremblay, J. (2004). Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension* 43, 1270-8.

Hunt, P.J., Richards, A.M., Espiner, E.A., Nicholls, M.G., and Yandle, T.G. (1994). Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1428-35.

Huxley, V.H., Tucker, V.L., Verburg, K.M., and Freeman, R.H. (1987). Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide. *Circ Res* 60, 304-7.

Igaki, T., Itoh, H., Suga, S., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Doi, K., Yoshimasa, T., and Nakao, K. (1996). Insulin suppresses endothelial secretion of C-type natriuretic peptide, a novel endothelium-derived relaxing peptide. *Diabetes* 45 Suppl 3, S62-4.

Iida, H. and Shibata, Y. (1994). Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture. *Circ Res* 74, 659-68.

Itakura, M., Iwashina, M., Mizuno, T., Ito, T., Hagiwara, H., and Hirose, S. (1994). Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 269, 8314-8.

Itoh, H., Nakao, K., Katsuura, G., Morii, N., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Yamada, T., Saito, Y., Matsushita, A., and et, a.l. (1986). Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 59, 342-7.

Itoh, T., Nagaya, N., Murakami, S., Fujii, T., Iwase, T., Ishibashi-Ueda, H., Yutani, C., Yamagishi, M., Kimura, H., and Kangawa, K. (2004). C-type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1204-11.

Izard, T. and Geerlof, A. (1999). The crystal structure of a novel bacterial adenylyltransferase reveals half of sites reactivity. *EMBO J* 18, 2021-30.

Izumi, T., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Hamanaka, I., Takahashi, N., Kawakami, R., Li, Y., Takemura, G., Fujiwara, H., Garbers, D.L., Mochizuki, S., and Nakao, K. (2001). Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 108, 203-13.

Jaiswal, R.K. (1992). Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 395-402.

Jaleel, M., Saha, S., Shenoy, A.R., and Visweswariah, S.S. (2006). The kinase homology domain of receptor guanylyl cyclase C: ATP binding and identification of an adenine nucleotide sensitive site. *Biochemistry* 45, 1888-98.

Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M., and Walter, U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9426-30.

Jaubert, J., Jaubert, F., Martin, N., Washburn, L.L., Lee, B.K., Eicher, E.M., and Guenet, J.L. (1999). Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10278-83.

Jeandel, L., Okamura, H., Belles-Isles, M., Chabot, J.G., Dihl, F., Morel, G., Kelly, P.A., and Heisler, S. (1989). Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 62, 69-78.

Jeon, Y.H., Heo, Y.S., Kim, C.M., Hyun, Y.L., Lee, T.G., Ro, S., and Cho, J.M. (2005). Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci* 62, 1198-220.

Jewett, J.R., Koller, K.J., Goeddel, D.V., and Lowe, D.G. (1993). Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J* 12, 769-77.

John, S.W., Kregge, J.H., Oliver, P.M., Hagaman, J.R., Hodgins, J.B., Pang, S.C., Flynn, T.G., and Smithies, O. (1995). Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267, 679-81.

John, S.W., Veress, A.T., Honrath, U., Chong, C.K., Peng, L., Smithies, O., and Sonnenberg, H. (1996). Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP. *Am J Physiol* 271, R109-14.

Jossart, C., Coupal, M., McNicoll, N., Fournier, A., Wilkes, B.C., and De Lean, A. (2005). Photolabeling study of the ligand binding domain of natriuretic peptide receptor A: development of a model. *Biochemistry* 44, 2397-408.

Joubert, S., Jossart, C., McNicoll, N., and De Lean, A. (2005). Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A. *FEBS J* 272, 5572-83.

Joubert, S., Labrecque, J., and De Lean, A. (2001). Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* 40, 11096-105.

Juilfs, D.M., Fulle, H.J., Zhao, A.Z., Houslay, M.D., Garbers, D.L., and Beavo, J.A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3388-95.

Kangawa, K., Tawaragi, Y., Oikawa, S., Mizuno, A., Sakuragawa, Y., Nakazato, H., Fukuda, A., Minamino, N., and Matsuo, H. (1984). Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding

its precursor. *Nature* 312, 152-5.

Kapoun, A.M., Liang, F., O'Young, G., Damm, D.L., Quon, D., White, R.T., Munson, K., Lam, A., Schreiner, G.F., and Protter, A.A. (2004). B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 94, 453-61.

Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824.

Kenny, A.J., Bourne, A., and Ingram, J. (1993). Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 291 ( Pt 1), 83-8.

Kiemer, A.K., Hartung, T., and Vollmar, A.M. (2000). cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J Immunol* 165, 175-81.

Kiemer, A.K., Lehner, M.D., Hartung, T., and Vollmar, A.M. (2002). Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 143, 846-52.

Kiemer, A.K. and Vollmar, A.M. (1998). Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 273, 13444-51.

Kisch, B. (1956). Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 14, 99-112.

Kishimoto, I., Dubois, S.K., and Garbers, D.L. (1996). The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6215-9.

Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D.L. (2001). A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A)

inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2703-6.

Kitashiro, S., Sugiura, T., Takayama, Y., Tsuka, Y., Izuoka, T., Tokunaga, S., and Iwasaka, T. (1999). Long-term administration of atrial natriuretic peptide in patients with acute heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 33, 948-52.

Klinger, J.R., Petit, R.D., Curtin, L.A., Warburton, R.R., Wrenn, D.S., Steinhilper, M.E., Field, L.J., and Hill, N.S. (1993). Cardiopulmonary responses to chronic hypoxia in transgenic mice that overexpress ANP. *J Appl Physiol* 75, 198-205.

Klinger, J.R., Warburton, R.R., Pietras, L.A., Smithies, O., Swift, R., and Hill, N.S. (1999). Genetic disruption of atrial natriuretic peptide causes pulmonary hypertension in normoxic and hypoxic mice. *Am J Physiol* 276, L868-74.

Knowles, J.W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J.R., Fox, J.E., Smithies, O., Rockman, H.A., and Maeda, N. (2001). Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 107, 975-84.

Ko, F.N., Wu, C.C., Kuo, S.C., Lee, F.Y., and Teng, C.M. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84, 4226-33.

Koh, G.Y., Nussenzveig, D.R., Okolicany, J., Price, D.A., and Maack, T. (1992). Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem* 267, 11987-94.

Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Kano, H., Minami, M., Ueda, M., and Yoshikawa, J. (1997). Effect of natriuretic peptide family on the oxidized LDL-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 81, 585-90.

Koller, K.J., de Sauvage, F.J., Lowe, D.G., and Goeddel, D.V. (1992). Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the



natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biol* 12, 2581-90.

Koller, K.J., Lipari, M.T., and Goeddel, D.V. (1993). Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *J Biol Chem* 268, 5997-6003.

Koller, K.J., Lowe, D.G., Bennett, G.L., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., and Goeddel, D.V. (1991). Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252, 120-3.

Komalavilas, P. and Lincoln, T.M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 271, 21933-8.

Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A., and Murad, F. (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 62, 505-15.

Kudo, T. and Baird, A. (1984-1985). Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* 312, 756-7.

Kumar, R., Grammatikakis, N., and Chinkers, M. (2001). Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 276, 11371-5.

Kuno, T., Andresen, J.W., Kamisaki, Y., Waldman, S.A., Chang, L.Y., Saheki, S., Leitman, D.C., Nakane, M., and Murad, F. (1986). Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 261, 5817-23.

Kurose, H., Inagami, T., and Ui, M. (1987). Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylate cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS Lett* 219, 375-9.

Labrecque, J., Deschenes, J., McNicoll, N., and De Lean, A. (2001). Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A

documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J Biol Chem* 276, 8064-72.

Labrecque, J., Mc Nicoll, N., Marquis, M., and De Lean, A. (1999). A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem* 274, 9752-9.

Lachance, D., Garcia, R., Gutkowska, J., Cantin, M., and Thibault, G. (1986). Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. *Biochem Biophys Res Commun* 135, 1090-8.

Lalli, M.J., Shimizu, S., Sutliff, R.L., Kranias, E.G., and Paul, R.J. (1999).  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol* 277, H963-70.

Langenickel, T., Buttgereit, J., Pagel, I., Dietz, R., Willenbrock, R., and Bader, M. (2004). Forced homodimerization by site-directed mutagenesis alters guanylyl cyclase activity of natriuretic peptide receptor B. *Hypertension* 43, 460-5.

Lanier-Smith, K.L. and Currie, M.G. (1991). Glucocorticoid regulation of atrial natriuretic peptide receptors on cultured endothelial cells. *Endocrinology* 129, 2311-7.

LaPointe, M.C. (2005). Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* 26, 944-56.

Larose, L., McNicoll, N., Ong, H., and De Lean, A. (1991). Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions. *Biochemistry* 30, 8990-5.

Laux, W.H., Pande, P., Shoshani, I., Gao, J., Boudou-Vivet, V., Gosselin, G., and Johnson, R.A. (2004). Pro-nucleotide inhibitors of adenylyl cyclases in intact cells. *J Biol Chem* 279, 13317-32.

Leitman, D.C., Andresen, J.W., Kuno, T., Kamisaki, Y., Chang, J.K., and Murad,

F. (1986). Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 261, 11650-5.

Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., and Castelli, W.P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322, 1561-6.

Li, Y., Zhang, D., Jin, W., Shao, C., Yan, P., Xu, C., Sheng, H., Liu, Y., Yu, J., Xie, Y., Zhao, Y., Lu, D., Nebert, D.W., Harrison, D.C., Huang, W., and Jin, L. (2006). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest* 116, 506-11.

Light, D.B., Corbin, J.D., and Stanton, B.A. (1990). Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* 344, 336-9.

Lincoln, T.M. (1989). Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 41, 479-502.

Lisy, O., Jougasaki, M., Heublein, D.M., Schirger, J.A., Chen, H.H., Wennberg, P.W., and Burnett, J.C. (1999). Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide. *Kidney Int* 56, 502-8.

Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., and Hurley, J.H. (1997). Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13414-9.

Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., and De Jonge, H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22, 307-12.

Lopez, M.J., Garbers, D.L., and Kuhn, M. (1997). The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 272, 23064-8.

Lopez, M.J., Wong, S.K., Kishimoto, I., Dubois, S., Mach, V., Friesen, J.,

Garbers, D.L., and Beuve, A. (1995). Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378, 65-8.

Lorell, B.H. and Carabello, B.A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470-9.

Lowe, D.G., Chang, M.S., Hellmiss, R., Chen, E., Singh, S., Garbers, D.L., and Goeddel, D.V. (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J* 8, 1377-84.

Lowe, D.G. and Fendly, B.M. (1992). Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms. *J Biol Chem* 267, 21691-7.

Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., and Waldman, S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-414.

Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., and Harvey, R.P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9, 1654-66.

Ma, K.K., Banas, K., and de Bold, A.J. (2005). Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept* 128, 169-76.

Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F.A., Nussenzweig, D., Scarborough, R.M., McEnroe, G.A., and Lewicki, J.A. (1987). Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238, 675-8.

MacFarland, R.T., Zelus, B.D., and Beavo, J.A. (1991). High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 266, 136-42.

Makikallio, A.M., Makikallio, T.H., Korpelainen, J.T., Vuolteenaho, O., Tapanainen, J.M., Ylitalo, K., Sotaniemi, K.A., Huikuri, H.V., and Myllyla, V.V. (2005). Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke* 36, 1016-20.

Mann, E.A., Steinbrecher, K.A., Stroup, C., Witte, D.P., Cohen, M.B., and Giannella, R.A. (2005). Lack of guanylyl cyclase C, the receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin, results in reduced polyp formation and increased apoptosis in the multiple intestinal neoplasia (Min) mouse model. *Int J Cancer* 116, 500-5.

Marala, R.B., Sitaramayya, A., and Sharma, R.K. (1991). Dual regulation of atrial natriuretic factor-dependent guanylate cyclase activity by ATP. *FEBS Lett* 281, 73-6.

Marin-Grez, M., Fleming, J.T., and Steinhausen, M. (1986). Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324, 473-6.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10, 1247-55.

Matsukawa, N., Grzesik, W.J., Takahashi, N., Pandey, K.N., Pang, S., Yamauchi, M., and Smithies, O. (1999). The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7403-8.

Mayer, B. and Koesling, D. (2001). cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci* 22, 546-8.

McArdle, C.A., Poch, A., and Kappler, K. (1993). Cyclic guanosine monophosphate production in the pituitary: stimulation by C-type natriuretic peptide and inhibition by gonadotropin-releasing hormone in alpha T3-1 cells. *Endocrinology* 132, 2065-72.

McGrath, M.F. and de Bold, A.J. (2005). Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides* 26, 933-43.

McGrath, M.F., de Bold, M.L., and de Bold, A.J. (2005). The endocrine function

of the heart. *Trends Endocrinol Metab* 16, 469-77.

McKay, M.K. and Huxley, V.H. (1995). ANP increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition. *Am J Physiol* 268, H1139-48.

McNicoll, N., Gagnon, J., Rondeau, J.J., Ong, H., and De Lean, A. (1996). Localization by photoaffinity labeling of natriuretic peptide receptor-A binding domain. *Biochemistry* 35, 12950-6.

Meloche, S., McNicoll, N., Liu, B., Ong, H., and De Lean, A. (1988). Atrial natriuretic factor R1 receptor from bovine adrenal zona glomerulosa: purification, characterization, and modulation by amiloride. *Biochemistry* 27, 8151-8.

Meloche, S., Ong, H., and De Lean, A. (1987). Functional heterogeneity of atrial natriuretic factor receptor in bovine adrenal zona glomerulosa is explained by an amiloride-sensitive high affinity molecular complex. *J Biol Chem* 262, 10252-8.

Misono, K.S., Fukumi, H., Grammer, R.T., and Inagami, T. (1984a). Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 119, 524-9.

Misono, K.S., Grammer, R.T., Fukumi, H., and Inagami, T. (1984b). Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 444-51.

Misono, K.S., Grammer, R.T., Rigby, J.W., and Inagami, T. (1985). Photoaffinity labeling of atrial natriuretic factor receptor in bovine and rat adrenal cortical membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 130, 994-1001.

Misono, K.S., Ogawa, H., Qiu, Y., and Ogata, C.M. (2005). Structural studies of the natriuretic peptide receptor: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *Peptides* 26, 957-68.

Misono, K.S., Sivasubramanian, N., Berkner, K., and Zhang, X. (1999). Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the

atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. *Biochemistry* 38, 516-23.

Miyagi, M. and Misono, K.S. (2000). Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1478, 30-8.

Miyagi, M., Zhang, X., and Misono, K.S. (2000). Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding. *Eur J Biochem* 267, 5758-68.

Miyazawa, T., Ogawa, Y., Chusho, H., Yasoda, A., Tamura, N., Komatsu, Y., Pfeifer, A., Hofmann, F., and Nakao, K. (2002). Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology* 143, 3604-10.

Mohapatra, S.S., Lockey, R.F., Vesely, D.L., and Gower, W.R. Jr (2004). Natriuretic peptides and genesis of asthma: an emerging paradigm? *J Allergy Clin Immunol* 114, 520-6.

Molkentin, J.D. (2003). A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest* 111, 1275-7.

Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1997). GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation* 96, 3833-5.

Morin, S., Paradis, P., Aries, A., and Nemer, M. (2001). Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol* 21, 1036-44.

Morisco, C., Zebrowski, D.C., Vatner, D.E., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2001). Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33, 561-73.

Morita, R., Ukyo, N., Furuya, M., Uchiyama, T., and Hori, T. (2003). Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting

phenotype through its receptor guanylyl cyclase-coupled receptor A. *J Immunol* 170, 5869-75.

Mou, T.C., Gille, A., Fancy, D.A., Seifert, R., and Sprang, S.R. (2005). Structural basis for the inhibition of mammalian membrane adenylyl cyclase by 2'(3')-O-(N-Methylantraniloyl)-guanosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 280, 7253-61.

Mou, T.C., Gille, A., Suryanarayana, S., Richter, M., Seifert, R., and Sprang, S.R. (2006). Broad specificity of mammalian adenylyl cyclase for interaction with 2',3'-substituted purine- and pyrimidine nucleotide inhibitors. *Mol Pharmacol* 70, 878-86.

Mukoyama, M., Nakao, K., Hosoda, K., Suga, S., Saito, Y., Ogawa, Y., Shirakami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., and et, a.l. (1991). Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87, 1402-12.

Mukoyama, M., Nakao, K., Saito, Y., Ogawa, Y., Hosoda, K., Suga, S., Shirakami, G., Jougasaki, M., and Imura, H. (1990). Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 335, 801-2.

Muller, D., Mukhopadhyay, A.K., Speth, R.C., Guidone, G., Potthast, R., Potter, L.R., and Middendorff, R. (2004). Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* 145, 1392-401.

Munzel, T., Daiber, A., and Mulsch, A. (2005). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 97, 618-28.

Murakami, S., Nagaya, N., Itoh, T., Fujii, T., Iwase, T., Hamada, K., Kimura, H., and Kangawa, K. (2004). C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1172-7.

Murthy, K.S., Teng, B.Q., Zhou, H., Jin, J.G., Grider, J.R., and Makhlof, G.M. (2000). G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G974-



80.

Nagase, M., Katafuchi, T., Hirose, S., and Fujita, T. (1997). Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* *15*, 1235-43.

Nagaya, N., Nishikimi, T., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Kakishita, M., Fukushima, K., Okano, Y., Nakanishi, N., Miyatake, K., and Kangawa, K. (2000). Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* *102*, 865-70.

Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S., and Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* *11*, 671-6.

Nakane, M. (2003). Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin Chem Lab Med* *41*, 865-70.

Nakane, M., Kolasa, T., Chang, R., Miller, L.N., Moreland, R.B., and Brioni, J.D. (2006). Acrylamide analog as a novel nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase activator. *J Pharmacol Sci* *102*, 231-8.

Nakashima, S., Tohmatsu, T., Hattori, H., Okano, Y., and Nozawa, Y. (1986). Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, polyphosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* *135*, 1099-104.

Nakayama, T., Soma, M., Mizutani, Y., Xinjuan, X., Honye, J., Kaneko, Y., Rahmutula, D., Aoi, N., Kosuge, K., Saito, S., Ozawa, Y., Kanmatsuse, K., and Kokubun, S. (2002). A novel missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene: possible association with essential hypertension. *Hypertens Res* *25*, 395-401.

Nakayama, T., Soma, M., Saito, S., Honye, J., Sato, M., Aoi, N., Kosuge, K.,

Haketa, A., Kanmatsuse, K., and Kokubun, S. (2003). Missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction. *Med Sci Monit* 9, CR505-10.

Nakayama, T., Soma, M., Takahashi, Y., Rehemudula, D., Kanmatsuse, K., and Furuya, K. (2000). Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 86, 841-5.

Nambi, P., Whitman, M., Gessner, G., Aiyar, N., and Crooke, S.T. (1986). Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an established smooth muscle cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8492-5.

Nichols, C.E., Dhaliwal, B., Lockyer, M., Hawkins, A.R., and Stammers, D.K. (2004). High-resolution structures reveal details of domain closure and "half-of-sites-reactivity" in *Escherichia coli* aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase. *J Mol Biol* 341, 797-806.

Nuglozeh, E., Mbikay, M., Stewart, D.J., and Legault, L. (1997). Rat natriuretic peptide receptor genes are regulated by glucocorticoids in vitro. *Life Sci* 61, 2143-55.

Nussenzveig, D.R., Lewicki, J.A., and Maack, T. (1990). Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 265, 20952-8.

Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C.M., and Misono, K.S. (2004). Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* 279, 28625-31.

Ogawa, Y., Itoh, H., Tamura, N., Suga, S., Yoshimasa, T., Uehira, M., Matsuda, S., Shiono, S., Nishimoto, H., and Nakao, K. (1994). Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* 93, 1911-21.

Ogihara, T., Shima, J., Hara, H., Tabuchi, Y., Hashizume, K., Nagano, M., Katahira, K., Kangawa, K., Matsuo, H., and Kumahara, Y. (1986). Significant increase in plasma immunoreactive atrial natriuretic polypeptide concentration during head-out water immersion. *Life Sci* 38, 2413-8.

Ohta, S., Takeuchi, M., Deguchi, M., Tsuji, T., Gahara, Y., and Nagata, K. (2000). A novel transcriptional factor with Ser/Thr kinase activity involved in the transforming growth factor (TGF)-beta signalling pathway. *Biochem J* 350 Pt 2, 395-404.

Okamura, H., Kelly, P.A., Chabot, J.G., Morel, G., Belles-Isles, M., and Heisler, S. (1988). Atrial natriuretic peptide receptors are present in brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 1000-6.

Oliver, P.M., Fox, J.E., Kim, R., Rockman, H.A., Kim, H.S., Reddick, R.L., Pandey, K.N., Milgram, S.L., Smithies, O., and Maeda, N. (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14730-5.

Oliver, P.M., John, S.W., Purdy, K.E., Kim, R., Maeda, N., Goy, M.F., and Smithies, O. (1998). Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2547-51.

Olson, L.J., Ho, B.Y., Cashdollar, L.W., and Drewett, J.G. (1998). Functionally active catalytic domain is essential for guanylyl cyclase-linked receptor mediated inhibition of human aldosterone synthesis. *Mol Pharmacol* 54, 761-9.

Ornitz, D.M. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 205-13.

Padayatti, P.S., Pattanaik, P., Ma, X., and van den Akker, F. (2004). Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther* 104, 83-99.

Pagano, M. and Anand-Srivastava, M.B. (2001). Cytoplasmic domain of

natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity. *J Biol Chem* 276, 22064-70.

Pandey, K.N. (2005). Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A. *Peptides* 26, 985-1000.

Pandey, K.N., Nguyen, H.T., Garg, R., Khurana, M.L., and Fink, J. (2005). Internalization and trafficking of guanylyl (guanylate) cyclase/natriuretic peptide receptor A is regulated by an acidic tyrosine-based cytoplasmic motif GDAY. *Biochem J* 388, 103-13.

Parkes, D.G., Coghlan, J.P., McDougall, J.G., and Scoggins, B.A. (1988). Long-term hemodynamic actions of atrial natriuretic factor (99-126) in conscious sheep. *Am J Physiol* 254, H811-5.

Pedram, A., Razandi, M., Hu, R.M., and Levin, E.R. (1997). Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 272, 17097-103.

Pedro, L., Fenrick, R., Marquis, M., McNicoll, N., and De Lean, A. (1998). Characterization of the phosphorylation state of natriuretic peptide receptor-C. *Mol Cell Biochem* 178, 95-101.

Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., and Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274, 2082-6.

Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 17, 3045-51.

Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., and Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 105-49.

Pikkarainen, S., Tokola, H., Majalahti-Palviainen, T., Kerkela, R., Hautala, N., Bhalla, S.S., Charron, F., Nemer, M., Vuolteenaho, O., and Ruskoaho, H. (2003). GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem* 278, 23807-16.

Porter, J.G., Arfsten, A., Fuller, F., Miller, J.A., Gregory, L.C., and Lewicki, J.A. (1990). Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 796-803.

Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., and Dickey, D.M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27, 47-72.

Potter, L.R. and Garbers, D.L. (1992). Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem* 267, 14531-4.

Potter, L.R. and Garbers, D.L. (1994). Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 269, 14636-42.

Potter, L.R. and Hunter, T. (1998). Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 273, 15533-9.

Potter, L.R. and Hunter, T. (1999a). A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Mol Biol Cell* 10, 1811-20.

Potter, L.R. and Hunter, T. (1999b). Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods* 19, 506-20.

Potter, L.R. and Hunter, T. (2000). Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem* 275, 31099-106.

Potter, L.R. and Hunter, T. (2001). Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem* 276, 6057-60.

Potthast, R. and Potter, L.R. (2005). Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides* 26, 1001-8.

Prins, B.A., Weber, M.J., Hu, R.M., Pedram, A., Daniels, M., and Levin, E.R. (1996). Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271, 14156-62.

Qiu, Y., Ogawa, H., Miyagi, M., and Misono, K.S. (2004). Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling. *J Biol Chem* 279, 6115-23.

Rahmutula, D., Nakayama, T., Soma, M., Kosuge, K., Aoi, N., Izumi, Y., Kanmatsuse, K., and Ozawa, Y. (2002). Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. *Endocrine* 17, 85-90.

Ramamurthy, V., Tucker, C., Wilkie, S.E., Daggett, V., Hunt, D.M., and Hurley, J.B. (2001). Interactions within the coiled-coil domain of RetGC-1 guanylyl cyclase are optimized for regulation rather than for high affinity. *J Biol Chem* 276, 26218-29.

Ramarao, C.S. and Garbers, D.L. (1985). Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. *J Biol Chem* 260, 8390-6.

Rehemudula, D., Nakayama, T., Soma, M., Takahashi, Y., Uwabo, J., Sato, M., Izumi, Y., Kanmatsuse, K., and Ozawa, Y. (1999). Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res* 84, 605-10.

Resink, T.J., Scott-Burden, T., Baur, U., Jones, C.R., and Buhler, F.R. (1988). Atrial natriuretic peptide induces breakdown of phosphatidylinositol phosphates in cultured vascular smooth-muscle cells. *Eur J Biochem* 172, 499-505.

Richards, A.M., Lainchbury, J.G., Troughton, R.W., Espiner, E.A., and Nicholls, M.G. (2004). Clinical applications of B-type natriuretic peptides. *Trends Endocrinol Metab* 15, 170-4.

Richards, A.M., McDonald, D., Fitzpatrick, M.A., Nicholls, M.G., Espiner, E.A., Ikram, H., Jans, S., Grant, S., and Yandle, T. (1988a). Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 1134-9.

Richards, A.M., Tonolo, G., Montorsi, P., Finlayson, J., Fraser, R., Inglis, G., Towrie, A., and Morton, J.J. (1988b). Low dose infusions of 26- and 28-amino acid human atrial natriuretic peptides in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 465-72.

Rondeau, J.J., McNicoll, N., Gagnon, J., Bouchard, N., Ong, H., and De Lean, A. (1995). Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa. *Biochemistry* 34, 2130-6.

Rosenzweig, A., Halazonetis, T.D., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1991). Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circulation* 84, 1256-65.

Roth, J.A. and Garrick, M.D. (2003). Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol* 66, 1-13.

Russwurm, M., Wittau, N., and Koesling, D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive  $\alpha_2\beta_1$  guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 276, 44647-52.

Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E., and Beavo, J.A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93, 280-91.

Sabrane, K., Kruse, M.N., Fabritz, L., Zetsche, B., Mitko, D., Skryabin, B.V., Zwiener, M., Baba, H.A., Yanagisawa, M., and Kuhn, M. (2005). Vascular

endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest* 115, 1666-74.

Sackner-Bernstein, J.D., Kowalski, M., Fox, M., and Aaronson, K. (2005). Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 293, 1900-5.

Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., and Sugishita, Y. (1996). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384, 353-5.

Samson, W.K., Aguila, M.C., Martinovic, J., Antunes-Rodrigues, J., and Norris, M. (1987). Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. *Peptides* 8, 449-54.

Schachner, T., Zou, Y., Oberhuber, A., Mairinger, T., Tzankov, A., Laufer, G., Ott, H., and Bonatti, J. (2004). Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg* 25, 585-90.

Schenk, D.B., Phelps, M.N., Porter, J.G., Fuller, F., Cordell, B., and Lewicki, J.A. (1987). Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1521-5.

Schirger, J.A., Heublein, D.M., Chen, H.H., Lisy, O., Jougasaki, M., Wennberg, P.W., and Burnett, J.C. Jr (1999). Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc* 74, 126-30.

Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 404, 197-201.

Schlossmann, J., Feil, R., and Hofmann, F. (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci* 10, 1279-89.



Schmidt, P.M., Schramm, M., Schroder, H., Wunder, F., and Stasch, J.P. (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 279, 3025-32.

Schultz, H.D., Gardner, D.G., Deschepper, C.F., Coleridge, H.M., and Coleridge, J.C. (1988). Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 255, R6-13.

Schultz, H.D., Steele, M.K., and Gardner, D.G. (1990). Central administration of atrial peptide decreases sympathetic outflow in rats. *Am J Physiol* 258, R1250-6.

Schulz-Knappe, P., Forssmann, K., Herbst, F., Hock, D., Pipkorn, R., and Forssmann, W.G. (1988). Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 66, 752-9.

Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S., and Garbers, D.L. (1990). Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63, 941-8.

Schulz, S., Singh, S., Bellet, R.A., Singh, G., Tubb, D.J., Chin, H., and Garbers, D.L. (1989). The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58, 1155-62.

Schulz, S., Wedel, B.J., Matthews, A., and Garbers, D.L. (1998). The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem* 273, 1032-7.

Schweitz, H., Vigne, P., Moinier, D., Frelin, C., and Lazdunski, M. (1992). A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 267, 13928-32.

Scotland, R.S., Ahluwalia, A., and Hobbs, A.J. (2005a). C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacol Ther* 105, 85-93.

Scotland, R.S., Cohen, M., Foster, P., Lovell, M., Mathur, A., Ahluwalia, A., and Hobbs, A.J. (2005b). C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 102, 14452-7.

Scott, J.W., Norman, D.G., Hawley, S.A., Kontogiannis, L., and Hardie, D.G. (2002). Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J Mol Biol* 317, 309-23.

Seidman, C.E., Wong, D.W., Jarcho, J.A., Bloch, K.D., and Seidman, J.G. (1988). Cis-acting sequences that modulate atrial natriuretic factor gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4104-8.

Seilhamer, J.J., Arfsten, A., Miller, J.A., Lundquist, P., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A., and Porter, J.G. (1989). Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 650-8.

Sengenes, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 14, 1345-51.

Sengenes, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278, 48617-26.

Sengenes, C., Moro, C., Galitzky, J., Berlan, M., and Lafontan, M. (2005). [Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells]. *Med Sci (Paris)* 21, 61-5.

Sengenes, C., Stich, V., Berlan, M., Hejnova, J., Lafontan, M., Pariskova, Z., and Galitzky, J. (2002a). Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 24-32.

Sengenes, C., Zakaroff-Girard, A., Moulin, A., Berlan, M., Bouloumie, A., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2002b). Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283,

R257-65.

Shailubhai, K. (2002). Therapeutic applications of guanylate cyclase-C receptor agonists. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5, 261-8.

Shailubhai, K., Yu, H.H., Karunanandaa, K., Wang, J.Y., Eber, S.L., Wang, Y., Joo, N.S., Kim, H.D., Miedema, B.W., Abbas, S.Z., Boddupalli, S.S., Currie, M.G., and Forte, L.R. (2000). Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the Apc(Min/+) mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res* 60, 5151-7.

Shepeck, J.E. 2nd, Gauss, C.M., and Chamberlin, A.R. (1997). Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem* 5, 1739-50.

Shi, S.J., Nguyen, H.T., Sharma, G.D., Navar, L.G., and Pandey, K.N. (2001). Genetic disruption of atrial natriuretic peptide receptor-A alters renin and angiotensin II levels. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, F665-73.

Shimekake, Y., Ohta, S., and Nagata, K. (1994). C-type natriuretic peptide stimulates secretion of growth hormone from rat-pituitary-derived GH3 cells via a cyclic-GMP-mediated pathway. *Eur J Biochem* 222, 645-50.

Shimomura, H., Dangott, L.J., and Garbers, D.L. (1986). Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J Biol Chem* 261, 15778-82.

Shimonaka, M., Saheki, T., Hagiwara, H., Ishido, M., Nogi, A., Fujita, T., Wakita, K., Inada, Y., Kondo, J., and Hirose, S. (1987). Purification of atrial natriuretic peptide receptor from bovine lung. Evidence for a disulfide-linked subunit structure. *J Biol Chem* 262, 5510-4.

Shinomiya, M., Tashiro, J., Saito, Y., Yoshida, S., Furuya, M., Oka, N., Tanaka, S., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1994). C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1051-6.

Shoshani, I., Boudou, V., Pierra, C., Gosselin, G., and Johnson, R.A. (1999). Enzymatic synthesis of unlabeled and beta-(32)P-labeled beta-L-2', 3'-dideoxyadenosine-5'-triphosphate as a potent inhibitor of adenylyl cyclases and its use as reversible binding ligand. *J Biol Chem* 274, 34735-41.

Shubeita, H.E., McDonough, P.M., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Glembotski, C.C., Brown, J.H., and Chien, K.R. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 265, 20555-62.

Singh, S., Lowe, D.G., Thorpe, D.S., Rodriguez, H., Kuang, W.J., Dangott, L.J., Chinkers, M., Goeddel, D.V., and Garbers, D.L. (1988). Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* 334, 708-12.

Sinha, S.C., Wetterer, M., Sprang, S.R., Schultz, J.E., and Linder, J.U. (2005). Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO J* 24, 663-73.

Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R., and Erdos, E.G. (1984). Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5, 769-76.

Soeki, T., Kishimoto, I., Okumura, H., Tokudome, T., Horio, T., Mori, K., and Kangawa, K. (2005). C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 45, 608-16.

Soualmia, H., Barthelemy, C., Masson, F., Maistre, G., Eurin, J., and Carayon, A. (1997). Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 29, 605-11.

Stasch, J.P., Hirth-Dietrich, C., Kazda, S., and Neuser, D. (1989). Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci* 45, 869-75.

Steele, M.K., Gardner, D.G., Xie, P.L., and Schultz, H.D. (1991). Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *Am J Physiol* 260, R1145-51.

Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., and Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3, 437-43.

Steinbrecher, K.A., Tuohy, T.M., Heppner Goss, K., Scott, M.C., Witte, D.P., Groden, J., and Cohen, M.B. (2000). Expression of guanylin is downregulated in mouse and human intestinal adenomas. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 225-30.

Steinhilper, M.E., Cochrane, K.L., and Field, L.J. (1990). Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 16, 301-7.

Stingo, A.J., Clavell, A.L., Heublein, D.M., Wei, C.M., Pittelkow, M.R., and Burnett, J.C. Jr (1992). Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 263, H1318-21.

Stoupakis, G. and Klapholz, M. (2003). Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure. *Heart Dis* 5, 215-23.

Stults, J.T., O'Connell, K.L., Garcia, C., Wong, S., Engel, A.M., Garbers, D.L., and Lowe, D.G. (1994). The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer. *Biochemistry* 33, 11372-81.

Suda, M., Ogawa, Y., Tanaka, K., Tamura, N., Yasoda, A., Takigawa, T., Uehira, M., Nishimoto, H., Itoh, H., Saito, Y., Shiota, K., and Nakao, K. (1998). Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2337-42.

Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., and Matsuo, H. (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332, 78-81.

Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 863-70.

Suga, S., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Yoshimasa, T., and Nakao, K. (1993). Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 133, 3038-41.

Suga, S., Nakao, K., Hosoda, K., Mukoyama, M., Ogawa, Y., Shirakami, G., Arai, H., Saito, Y., Kambayashi, Y., Inouye, K., and et, a.l. (1992a). Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130, 229-39.

Suga, S., Nakao, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., and Imura, H. (1992b). Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 90, 1145-9.

Sugiyama, S., Kugiyama, K., Matsumura, T., Suga, S., Itoh, H., Nakao, K., and Yasue, H. (1995). Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1968-74.

Swayze, R.D. and Braun, A.P. (2001). A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem* 276, 19729-37.

Takahashi, N., Saito, Y., Kuwahara, K., Harada, M., Kishimoto, I., Ogawa, Y., Kawakami, R., Nakagawa, Y., Nakanishi, M., and Nakao, K. (2003). Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. *Hypertens Res* 26, 847-53.

Takahashi, Y., Nakayama, T., Soma, M., Izumi, Y., and Kanmatsuse, K. (1998). Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys*

Res Commun 246, 736-9.

Takeuchi, H., Ohmori, K., Kondo, I., Oshita, A., Shinomiya, K., Yu, Y., Takagi, Y., Mizushige, K., Kangawa, K., and Kohno, M. (2003). Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats. *Cardiovasc Res* 58, 231-8.

Tamura, N., Doolittle, L.K., Hammer, R.E., Shelton, J.M., Richardson, J.A., and Garbers, D.L. (2004). Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17300-5.

Tamura, N. and Garbers, D.L. (2003). Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. *J Biol Chem* 278, 48880-9.

Tamura, N., Itoh, H., Ogawa, Y., Nakagawa, O., Harada, M., Chun, T.H., Suga, S., Yoshimasa, T., and Nakao, K. (1996). cDNA cloning and gene expression of human type Ialpha cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 27, 552-7.

Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H., and Katsuki, M. (2000). Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4239-44.

Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N., and Izumo, S. (1999). The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126, 1269-80.

Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S. *Science* 278, 1907-16.

Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1999). Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* 285, 756-60.

Thuerlauf, D.J., Hanford, D.S., and Glembotski, C.C. (1994). Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 269, 17772-5.

Tokudome, T., Horio, T., Soeki, T., Mori, K., Kishimoto, I., Suga, S., Yoshihara, F., Kawano, Y., Kohno, M., and Kangawa, K. (2004). Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* 145, 2131-40.

Trachte, G.J. (2000). Depletion of natriuretic peptide C receptors eliminates inhibitory effects of C-type natriuretic peptide on evoked neurotransmitter efflux. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 210-5.

Trachte, G.J. (2003). Natriuretic peptides suppress protein kinase C activity to reduce evoked dopamine efflux from pheochromocytoma (PC12) cells. *Endocrinology* 144, 94-100.

Tsang, D., Tung, C.S., Yeung, V.T., and Cockram, C.S. (1997). Endothelin-3 reduces C-type natriuretic peptide-induced cyclic GMP formation in C6 glioma cells. *Regul Pept* 70, 91-6.

Tsuji, T. and Kunieda, T. (2005). A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in *cn/cn* mouse. *J Biol Chem* 280, 14288-92.

Tsuneyoshi, H., Nishina, T., Nomoto, T., Kanemitsu, H., Kawakami, R., Unimonh, O., Nishimura, K., and Komeda, M. (2004). Atrial natriuretic peptide helps prevent late remodeling after left ventricular aneurysm repair. *Circulation* 110, III174-9.

Tsuruda, T., Boerrigter, G., Huntley, B.K., Noser, J.A., Cataliotti, A., Costello-Boerrigter, L.C., Chen, H.H., and Burnett, J.C. Jr (2002). Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 91, 1127-34.



Uhler, M.D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268, 13586-91.

van den Akker, F. (2001). Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J Mol Biol* 311, 923-37.

van den Akker, F., Zhang, X., Miyagi, M., Huo, X., Misono, K.S., and Yee, V.C. (2000). Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* 406, 101-4.

Vandlen, R.L., Arcuri, K.E., and Napier, M.A. (1985). Identification of a receptor for atrial natriuretic factor in rabbit aorta membranes by affinity cross-linking. *J Biol Chem* 260, 10889-92.

Vellaichamy, E., Khurana, M.L., Fink, J., and Pandey, K.N. (2005). Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A. *J Biol Chem* 280, 19230-42.

Vieira, M.A., Gao, M., Nikonova, L.N., and Maack, T. (2001). Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. *J Biol Chem* 276, 36438-45.

Vollmar, A.M. (2005). The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. *Peptides* 26, 1086-94.

Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., and Kurtz, A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102, 1576-82.

Waldman, S.A., Rapoport, R.M., and Murad, F. (1984). Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* 259, 14332-4.

Wang, D., Oparil, S., Feng, J.A., Li, P., Perry, G., Chen, L.B., Dai, M., John,

S.W., and Chen, Y.F. (2003). Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension* 42, 88-95.

Watt, M.J., Holmes, A.G., Pinnamaneni, S.K., Garnham, A.P., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., and Febbraio, M.A. (2006). Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E500-8.

Wazni, O.M., Martin, D.O., Marrouche, N.F., Latif, A.A., Ziada, K., Shaaraoui, M., Almahameed, S., Schweikert, R.A., Saliba, W.I., Gillinov, A.M., Tang, W.H., Mills, R.M., Francis, G.S., Young, J.B., and Natale, A. (2004). Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* 110, 124-7.

Weder, A.B., Sekkarie, M.A., Takiyyuddin, M., Schork, N.J., and Julius, S. (1987). Antihypertensive and hypotensive effects of atrial natriuretic factor in men. *Hypertension* 10, 582-9.

Westendorp, R.G., Draijer, R., Meinders, A.E., and van Hinsbergh, V.W. (1994). Cyclic-GMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Vasc Res* 31, 42-51.

Wilcox, J.N., Augustine, A., Goeddel, D.V., and Lowe, D.G. (1991). Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol* 11, 3454-62.

Wilson, E.M. and Chinkers, M. (1995). Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34, 4696-701.

Winquist, R.J., Faison, E.P., Waldman, S.A., Schwartz, K., Murad, F., and Rapoport, R.M. (1984). Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7661-4.

Wolfe, H.R., Mendizabal, M., Lleong, E., Cuthbertson, A., Desai, V., Pullan, S.,

Fujii, D.K., Morrison, M., Pither, R., and Waldman, S.A. (2002). In vivo imaging of human colon cancer xenografts in immunodeficient mice using a guanylyl cyclase C--specific ligand. *J Nucl Med* 43, 392-9.

Wong, S.K., Ma, C.P., Foster, D.C., Chen, A.Y., and Garbers, D.L. (1995). The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *J Biol Chem* 270, 30818-22.

Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Fougere, F., and Carling, D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20, 6704-11.

Wu, C., Wu, F., Pan, J., Morser, J., and Wu, Q. (2003). Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem* 278, 25847-52.

Wu, C.F., Bishopric, N.H., and Pratt, R.E. (1997). Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272, 14860-6.

Wu, F., Yan, W., Pan, J., Morser, J., and Wu, Q. (2002). Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277, 16900-5.

Wunder, F., Stasch, J.P., Hutter, J., Alonso-Alija, C., Huser, J., and Lohrmann, E. (2005). A cell-based cGMP assay useful for ultra-high-throughput screening and identification of modulators of the nitric oxide/cGMP pathway. *Anal Biochem* 339, 104-12.

Yamazaki, A., Yu, H., Yamazaki, M., Honkawa, H., Matsuura, I., Usukura, J., and Yamazaki, R.K. (2003). A critical role for ATP in the stimulation of retinal guanylyl cyclase by guanylyl cyclase-activating proteins. *J Biol Chem* 278, 33150-60.

Yan, W., Wu, F., Morser, J., and Wu, Q. (2000). Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8525-9.

- Yandle, T.G. (1994). Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med* 235, 561-76.
- Yang, R.H., Jin, H.K., Wyss, J.M., Chen, Y.F., and Oparil, S. (1992). Pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 19, 198-205.
- Yap, L.B., Mukerjee, D., Timms, P.M., Ashrafian, H., and Coghlan, J.G. (2004). Natriuretic peptides, respiratory disease, and the right heart. *Chest* 126, 1330-6.
- Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M., Tamura, N., Ogawa, Y., and Nakao, K. (2004). Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10, 80-6.
- Yasoda, A., Ogawa, Y., Suda, M., Tamura, N., Mori, K., Sakuma, Y., Chusho, H., Shiota, K., Tanaka, K., and Nakao, K. (1998). Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J Biol Chem* 273, 11695-700.
- Yasunari, K., Kohno, M., Murakawa, K., Yokokawa, K., and Takeda, T. (1990). Glucocorticoids and atrial natriuretic factor receptors on vascular smooth muscle. *Hypertension* 16, 581-6.
- Yazawa, S., Tsuchiya, H., Hori, H., and Makino, R. (2006). Functional characterization of two nucleotide-binding sites in soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 281, 21763-70.
- Ye, Q., Chen, S., and Gardner, D.G. (2003). Endothelin inhibits NPR-A and stimulates eNOS gene expression in rat IMCD cells. *Hypertension* 41, 675-81.
- Yeung, V.T., Ho, S.K., Nicholls, M.G., and Cockram, C.S. (1996a). Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides* 17, 101-6.
- Yeung, V.T., Ho, S.K., Tsang, D.S., Nicholls, M.G., and Cockram, C.S. (1996b).

Endothelin-3 attenuates the cyclic GMP responses to C-type natriuretic peptide in cultured mouse astrocytes. *J Neurosci Res* 46, 686-96.

Yip, C.C., Laing, L.P., and Flynn, T.G. (1985). Photoaffinity labeling of atrial natriuretic factor receptors of rat kidney cortex plasma membranes. *J Biol Chem* 260, 8229-32.

---

Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., and Hurley, J.H. (1997). Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386, 247-53.

Zhao, Y., Brandish, P.E., DiValentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T., and Marletta, M.A. (2000). Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39, 10848-54.

\*\*\*\*\*