

Université de Montréal

**Assemblage oligomérique des récepteurs couplés aux
protéines G avec les RAMPs**

par

Madeleine Héroux

Département de Biochimie,
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Faculté de Médecine

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

Mars 2009

© Madeleine Héroux, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Assemblage oligomérique des récepteurs couplés aux
protéines G avec les RAMPs**

présentée par :
Madeleine Héroux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Marc Servant, membre du jury
Kathleen Caron, examinateur externe
Nikolaus Heveker, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la plus grande classe de récepteurs membranaires impliqués dans la transmission des signaux extracellulaires. Traditionnellement, la transmission de la signalisation par les RCPGs implique l'activation d'une protéine G hétéro-trimérique qui pourra à son tour moduler l'activité de divers effecteurs intracellulaires. Ce schéma classique de signalisation s'est complexifié au fil des années et l'on sait maintenant qu'en plus d'interagir avec les protéines G, les RCPGs s'associent avec une panoplie d'autres protéines afin de transmettre adéquatement les signaux extracellulaires. En particulier, la découverte d'une famille de protéines transmembranaires modulant la fonction des RCPGs, baptisées protéines modifiant l'activité des récepteurs (« receptor activity-modifying proteins » ; RAMPs), a changé la façon de concevoir la signalisation par certains RCPGs. Dans le cas du récepteur similaire au récepteur de la calcitonine (« calcitonin-like receptor » ; CLR), l'association avec les RAMPs permet l'acheminement à la surface cellulaire du récepteur tout en modulant ses propriétés pharmacologiques. Lorsqu'il est associé avec RAMP1, le CLR fonctionne comme un récepteur du peptide relié au gène de la calcitonine (« calcitonin gene-related peptide » ; CGRP), alors qu'il devient un récepteur de l'adrénomedulline lorsqu'il interagit avec RAMP2 ou RAMP3. D'autre part, en plus d'interagir avec des protéines accessoires transmembranaires telles les RAMPs, les RCPGs peuvent aussi s'associer entre eux pour former des oligomères de récepteurs. Dans cette thèse, nous nous sommes penchés sur les interactions entre les RCPGs et les RAMPs, et plus particulièrement sur l'interrelation entre ce type d'association RCPG/RAMP et l'assemblage en oligomères de récepteurs, en utilisant le récepteur du CGRP comme modèle d'étude.

Une première étude nous a tout d'abord permis de confirmer l'interaction entre le récepteur CLR et RAMP1, dans un contexte de cellules vivantes. Nous avons démontré que ce complexe CLR/RAMP1 active la protéine G et recrute la protéine de signalisation β -arrestine suite à une stimulation par le CGRP. Ensuite, nous avons déterminé que même s'il

doit obligatoirement former un hétéro-oligomère avec les RAMPs pour être actif, le CLR conserve malgré tout sa capacité à interagir avec d'autres RCPGs. En plus d'observer la présence d'homo-oligomère de CLR, nous avons constaté que tout comme les RCPGs, les RAMPs peuvent eux-aussi s'associer entre eux pour former des complexes oligomériques pouvant comprendre différents sous-types (RAMP1/RAMP2 et RAMP1/RAMP3).

Cette observation de la présence d'homo-oligomères de CLR et de RAMP1, nous a amené à nous questionner sur la stœchiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1. Dans une deuxième étude ayant pour but d'établir la composition moléculaire du récepteur CGRP1 *in vivo*, nous avons développé une nouvelle approche permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines dans un contexte de cellules vivantes. Cette technique baptisée BRET/BiFC, est basée sur le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence entre un donneur luminescent, la *Renilla* luciférase, et un accepteur fluorescent, la protéine fluorescente jaune (YFP), reconstituée suite au ré-assemblage de ces deux fragments. En utilisant cette approche, nous avons pu déterminer que le récepteur CGRP1 est constitué d'un homo-oligomère de CLR interagissant avec un monomère de RAMP1.

En démontrant un assemblage oligomérique asymétrique pour le récepteur CGRP1 à partir d'une nouvelle approche biophysique, nous croyons que les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à élargir nos connaissances sur le fonctionnement de la grande famille des RCPGs, et seront utiles à la poursuite des recherches sur les complexes protéiques impliqués dans la signalisation.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G, RCPG; Protéines modifiant l'activité des récepteurs, RAMP; Récepteur similaire au récepteur de la calcitonine, CLR; Peptide relié au gène de la calcitonine, CGRP; Oligomérisation; Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence, BRET; Complémentation de fluorescence bimoléculaire, BiFC; BRET/BiFC.

Abstract

G protein coupled receptors (GPCRs) constitute the largest family of membrane receptors involved in signal transduction. Traditionally, signal transduction by GPCRs involves the activation of a hetero-trimeric G protein which will then modulate the activity of several intracellular effectors. We can now appreciate the fact that in addition to their interaction with G proteins, GPCRs also associate with several other proteins, in order to allow proper signal transduction. In particular, the discovery of a family of proteins called receptor activity-modifying proteins (RAMPs) has challenged the traditional views of signal transduction by some GPCRs. In the case of the calcitonin-like receptor (CLR), the association with RAMPs allows the proper cell surface targeting of the receptor in addition to modulate its pharmacological properties. Co-expression of CLR with RAMP1 leads to a calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor, whereas CLR association with RAMP2 or RAMP3 promotes the formation of an adrenomedullin receptor. In addition to their interaction with transmembrane accessory proteins such as RAMPs, GPCRs can also interact with other receptors to form receptors oligomers. In this thesis, we were interested in the interactions between GPCRs and RAMPs, and particularly, in the link between these GPCR/RAMP interactions and the assembly of receptor oligomers, using CGRP1 receptor as a model.

We first confirmed the interaction between CLR and RAMP1 in living cells. We showed that this CLR/RAMP1 complex activates G proteins and recruits the signalling protein β -arrestin upon CGRP stimulation. Next, we demonstrated that even if the CLR requires hetero-oligomeric assembly with RAMPs in order to be active, this receptor can still interact with other GPCRs. In addition to CLR homo-oligomers, we observed that RAMPs can also self-associate to form oligomeric complexes which can involve different subtypes (RAMP1/RAMP2 and RAMP1/RAMP3).

This observation of the presence of CLR and RAMP1 homo-oligomers raised the question of the stoichiometry of interaction of the CLR/RAMP1 complex. In order to

establish the molecular composition of the CGRP1 receptor *in vivo*, we developed a novel approach allowing the detection of the interaction between three proteins in living cells. This method called BRET/BiFC is based on the bioluminescence resonance energy transfer between a luminescent energy donor, *Renilla* luciferase, and a fluorescent energy acceptor, the yellow fluorescent protein (YFP), reconstituted after the re-association of its two fragments. Using this approach, we showed that the CGRP1 receptor consist of a homodimer of CLR interacting with a monomer of RAMP1.

By demonstrating the asymmetrical organization of the CGRP1 receptor complex using a novel biophysical approach, we believe that the results presented herein have contributed to increase our knowledge of the mechanisms of function of the large family of GPCRs and will be useful for the pursuit of research on protein complexes involved in signalling pathways.

Keywords : G protein coupled receptors, GPCR; Receptor activity-modifying proteins, RAMP; Calcitonin-like receptor, CLR; Calcitonin gene-related peptide, CGRP; Oligomerization; Bioluminescence resonance energy transfer, BRET; Bimolecular fluorescence complementation, BiFC; BRET/BiFC.

Table des matières

AVANT-PROPOS	xvii
INTRODUCTION	1
1. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	3
1.1 Organisation structurale.....	3
1.2 Classification.....	6
1.3 Signalisation.....	8
1.3.1 Les protéines G hétéro-trimériques et leurs effecteurs.....	8
1.3.2 Autres partenaires des RCPGs.....	12
1.3.3 Régulation de la signalisation : désensibilisation, internalisation et recyclage	14
2. L'oligomérisation des RCPGs.....	18
2.1 Homo- et hétéro-oligomérisation avec d'autres RCPGs.....	18
2.1.1 Méthodes utilisées pour détecter l'oligomérisation des RCPGs.....	20
2.1.2 Rôles de l'oligomérisation entre les RCPGs.....	26
2.1.3 Évidences de l'oligomérisation entre les RCPGs <i>in vivo</i>	31
2.2 Hétéro-oligomérisation avec des protéines accessoires à 1TM.....	33
3. Les RAMPs.....	40
3.1 Organisation structurale.....	42
3.2 Récepteurs partenaires.....	48
3.3 Rôles.....	51
3.3.1 Chaperone pour les récepteurs.....	52
3.3.2 Pharmacologie des récepteurs.....	55
3.3.3 Régulation de la signalisation par les récepteurs.....	61
3.3.4 Régulation négative des récepteurs.....	61
3.4 Distribution tissulaire et importance physiologique.....	64

4. Le récepteur similaire au récepteur de la calcitonine (CLR) en tant que modèle d'étude.....	66
4.1 Les ligands : les peptides de la famille de la calcitonine	66
4.2 Le récepteur CLR.....	68
4.2.1 Distribution tissulaire et importance physiologique	68
4.2.2 Organisation structurale	68
4.2.3 Pharmacologie et signalisation.....	71
OBJECTIFS DE LA THÈSE	76
RÉSULTATS	77
Article 1.....	78
Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET.	78
Article 2.....	131
Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1	131
DISCUSSION	168
1. Utilisation du BRET pour l'étude d'interactions protéine-protéine.....	169
1.1 Technique de BRET appliquée à l'étude des interactions entre deux protéines	169
1.2 Approche de BRET/BiFC pour l'étude des interactions entre trois protéines	171
2. Modèle proposé pour l'assemblage oligomérique du CLR et de RAMP1	176
3. Homo-oligomérisation de RAMP1	181
3.1 Rôles de l'assemblage homo-oligomérique de RAMP1	183
4. Homo-oligomérisation du CLR	189
4.1 Rôles de l'assemblage homo-oligomérique du CLR	191
5. Assemblage et signalisation du complexe CLR/RAMP1	193
5.1 Interaction entre CLR et RAMP1	193
5.2 Signalisation du complexe CLR/RAMP1	197

6.	Stœchiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1	198
6.1	Une seule molécule de RAMP1 est présente chez le récepteur CGRP1	199
6.2	Asymétrie du complexe CLR/RAMP1	200
	CONCLUSION	203
	RÉFÉRENCES	204
	ANNEXES	234
	Article 3.....	234
	Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization.....	234
	Article 4.....	235
	Calcitonin gene-related peptide analogues with aza and indolizidinone amino acid residues reveal conformational requirements for antagonist activity at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor.	235

Liste des tableaux

Tableau I. Avantages et limitations des différentes approches basées sur la fluorescence utilisées pour l'étude de l'assemblage oligomérique des RCPGs.....	24
Tableau II. Interactions potentielles et confirmées entre différents RCPGs et les RAMPs.	50
Tableau III. Pharmacologie du récepteur CLR.	72

Liste des figures

Figure 1. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G.	2
Figure 2. Structure des RCPGs.	5
Figure 3. Les protéines G hétéro-trimériques.	10
Figure 4. Désensibilisation, internalisation et recyclage des RCPGs.	16
Figure 5. Rôles de l'assemblage oligomérique RCPG/RCPG dans le cycle de vie des récepteurs.	26
Figure 6. Structure hypothétique d'un dimère de RCPGs sous lequel se trouve une seule protéine G hétéro-trimérique.	30
Figure 7. Topographie de la surface cytoplasmique de la rhodopsine à partir de disques membranaires du segment externe des bâtonnets.	32
Figure 8. Comparaison de la topologie de structure des protéines accessoires à 1 TM.	34
Figure 9. Alignement de séquences de RAMP1, RAMP2 et RAMP3 humain.	43
Figure 10. Représentations du RAMP1 humain.	45
Figure 11. Rôles des RAMPs dans le cycle de vie des RCPGs.	52
Figure 12. Pharmacologie et localisation sub-cellulaire des récepteurs CLR et CTR, et de leurs protéines accessoires RAMP1, RAMP2 et RAMP3.	57
Figure 13. Ciblage du récepteur AM2 suite à son activation.	63
Figure 14. Alignement de séquences de l' α CGRP, AMY, CT, AM et IMD humain.	67
Figure 15. Représentation schématique de la séquence du CLR humain.	69
Figure 16. Modèle proposé pour l'assemblage oligomérique du CLR et de RAMP1.	177
Figure 17. Modèles proposés pour la formation du complexe entre un homo-oligomère de CLR et un monomère de RAMP1.	180
Figure 18. Influence de la co-expression du RAMP3 sauvage sur le ciblage à la membrane plasmique de RAMP1 Δ 8.	183
Figure 19. Homo-oligomérisation de RAMP1C104A.	188
Figure 20. Courbe de titration de BRET entre RAMP1 et CLR, CTR ou β_2 AR.	196

Liste des sigles et abréviations

Acides aminés

A	Alanine
C	Cystéine
D	Acide aspartique
E	Acide glutamique
N	Asparagine
R	Arginine
S	Sérine
W	Tryptophane
α_{1b} AR	Récepteur α_{1b} -adrénergique
ACTH	Adrénocorticotropine
ADNc	ADN complémentaire
AM	Adrénomédulline
AM1	Récepteur de l'adrénomédulline constitué de CLR et RAMP2
AM2	Récepteur de l'adrénomédulline constitué de CLR et RAMP3
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMY	Amyline
AMY1	Récepteur de l'amyline constitué de CLR et RAMP1
AMY2	Récepteur de l'amyline constitué de CLR et RAMP2
AMY3	Récepteur de l'amyline constitué de CLR et RAMP3
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
β_2 AR	Récepteur β_2 -adrénergique
BiFC	Complémentation de fluorescence bimoléculaire
BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence

CaSR	Récepteur sensible au calcium
CFP	Protéine fluorescente cyan
CFTR	Régulateur membranaire de la fibrose kystique
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine
CGRP1	Récepteur du CGRP constitué de CLR et RAMP1
CLR	Récepteur similaire au récepteur de la calcitonine
C-ter	Domaine carboxyl-terminal
CTR	Récepteur de la calcitonine
DTT	Dithiothreitol
e1-e3	Boucles extracellulaires 1 à 3
ECE-1	Enzyme convertissant l'endotheline-1
EGF	Facteur de croissance épidermique
FRET	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
Fz	Récepteur frizzled
GABA _B R	Récepteur pour l'acide γ -aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange du guanosine
GFP	Protéine fluorescente verte
GHRH	Hormone de libération de l'hormone de croissance
GIP	Protéines interagissant avec les récepteurs couplés aux protéines G
GLP	Peptide similaire au glucagon
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GRK	Kinases des récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Ion hydrogène
i1-i3	Boucles intracellulaires 1 à 3
IMD	Interméline
LRP5/6	Protéine reliée au récepteur des lipoprotéines de faible densité 5/6

MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MC2R	Récepteur mélanocortine 2 (MC2R)
mGluR	Récepteur métabotropique au glutamate
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MRAP	Protéine accessoire du récepteur mélanocortine 2
Na ⁺	Ion sodique
NHERF	Facteur de régulation de l'échange Na ⁺ -H ⁺
NSF	Facteur sensible au N-éthylmaléimide
N-ter	Domaine amino-terminal
OR	Récepteur olfactif
PDZ	Domaine semblable à la protéine de densité synaptique-95/Discs-large/ZO-1
PI	Phosphatidylinositol
PKA	Protéine kinase A
PTHr	Récepteur de l'hormone parathyroïde
R7TM	Récepteur à 7 domaines transmembranaires
RAMP	Protéine modifiant l'activité des récepteurs
RE	Réticulum endoplasmique
RET	Transfert d'énergie de résonance
RFP	Protéine fluorescente rouge
RGS	Régulateurs de la signalisation des protéines G
RTP	Protéine transportant les récepteurs
Smo	Récepteur smoothed
T1R	Récepteurs du goût 1
T2R	Récepteurs du goût 2
TM	Domaine transmembranaire
VPACR	Récepteur du polypeptide intestinal vasoactif/polypeptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire
YFP	Protéine fluorescente jaune

*«Qu'importe l'issue du chemin quand seul
compte le chemin parcouru»*

David Le Breton

Remerciements

Ces six années d'études ont été pour moi la source d'un grand apprentissage autant sur le plan scientifique que personnel. Au cours de ce périple, j'ai eu la chance de côtoyer des gens extraordinaires, qui me tiennent énormément à cœur. C'est maintenant à mon tour de pouvoir leur exprimer toute ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Michel Bouvier. Michel, ta passion pour la science et ton optimisme à toute épreuve, ont fait de toi un mentor exceptionnel. Je tiens aujourd'hui à t'exprimer toute ma gratitude d'avoir eu la chance d'effectuer ce grand voyage sous ta gouverne. Merci pour la confiance que tu m'as accordée.

Merci à tous les membres du labo dont la très grande diversité a été pour moi la source d'une grande richesse. J'ai eu beaucoup de plaisir à vous côtoyer et je garderai de nombreux souvenirs du temps passé à vos côtés. Merci pour votre folie, qui a su agrémenter mon quotidien et les jours plus difficiles.

Plus particulièrement, je voudrais remercier Mireille Hogue, avec qui j'ai eu la chance de travailler. Mireille, ta rigueur scientifique a fait de toi une partenaire de travail hors pair. Je tiens également à remercier Monique Lagacé, sans qui le laboratoire ne serait pas ce qu'il est. Monique, le fait de savoir que je pouvais compter sur ton aide en tout temps, a été d'un grand secours tout au long de ces années.

Merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel durant toutes ces années d'études et merci surtout, de m'avoir fait confiance dans tous mes choix de vie et d'avoir su éveiller en moi la curiosité d'esprit, et le besoin de comprendre le monde qui m'entoure.

Merci enfin à Billy. Au-delà de la science, le laboratoire de Michel restera toujours pour moi l'endroit où l'on s'est rencontré. Merci pour toute ton aide et ton soutien. Tu as mis de la couleur dans ma vie et partager mon quotidien avec toi est la plus belle chose qui me soit arrivée.

AVANT-PROPOS

L'adaptation au changement constitue une caractéristique essentielle à la survie des espèces. Cette adaptation s'appuie sur l'échange d'informations entre l'organisme et le monde extérieur, permettant de percevoir et de répondre adéquatement aux divers changements. De façon similaire, l'unité de base du vivant, la cellule, doit continuellement s'adapter aux variations de son milieu environnant (changement de quantité d'oxygène, de nourriture, d'eau disponibles, présence d'agents pathogènes ou de d'autres cellules à proximité) afin de survivre. Cette adaptation est possible uniquement grâce à l'échange d'information entre la cellule et son milieu environnant. À l'échelle moléculaire, cette communication cellulaire repose entre autre sur la présence de protéines logées à la surface des cellules, appelées récepteurs, qui assurent la transmission des signaux de l'extérieur vers l'intérieur des cellules. Par le biais de leurs interactions avec d'autres protéines, ces récepteurs permettent à la cellule de répondre de façon appropriée aux différents stimuli. Ce travail de doctorat se penche sur l'étude de certains de ces récepteurs et des protéines avec lesquels ils s'associent.

INTRODUCTION

La plus grande classe de récepteurs membranaires impliquée dans la transmission des signaux est constituée des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Ces récepteurs permettent la reconnaissance de signaux aussi variés que les hormones, les neurotransmetteurs, les chimiokines, le calcium, la lumière, les odeurs et le goût. Non seulement ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques incluant la perception sensorielle des goûts, des odeurs et de la lumière, la neurotransmission, le métabolisme, la différenciation cellulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire, mais entre 30% (Robas et al., 2003) et 50% (Ma and Zimmel, 2002) de l'ensemble des médicaments prescrits sur le marché ciblent des RCPGs, illustrant ainsi l'importance de l'étude de cette classe de protéines. Comme leur nom l'indique, classiquement les RCPGs sont connus pour transmettre leurs signaux via l'activation de protéines G hétéro-trimériques. Suite à la liaison du ligand sur le récepteur, la protéine G hétéro-trimérique sera activée, ce qui entraînera alors l'activation de différents effecteurs intracellulaires, menant à la production de messagers intracellulaires, entraînant ainsi une réponse cellulaire appropriée (Figure 1). Toutefois, il a été démontré récemment que la signalisation par les RCPGs est beaucoup plus complexe que ce simple schéma classique de cascade de signalisation, et implique la formation de complexes multi-protéiques comprenant plusieurs RCPGs et toute une panoplie d'autres protéines différentes des protéines G hétéro-trimériques. Ces nouvelles protéines interagissant avec les RCPGs (appelées GIPs pour « GPCR interacting proteins ») sont impliquées dans divers aspects du cycle de vie des récepteurs, tout comme l'assemblage en oligomères de récepteurs qui joue un rôle à plusieurs niveaux dans l'activité des RCPGs. La présente thèse porte sur l'une de ces nouvelles classes de protéine régulant l'activité des RCPGs, appelées protéines modifiant l'activité des récepteurs (RAMPs), et plus spécifiquement sur la relation entre la formation de complexes RCPGs/RAMPs et l'assemblage en oligomères de récepteurs.

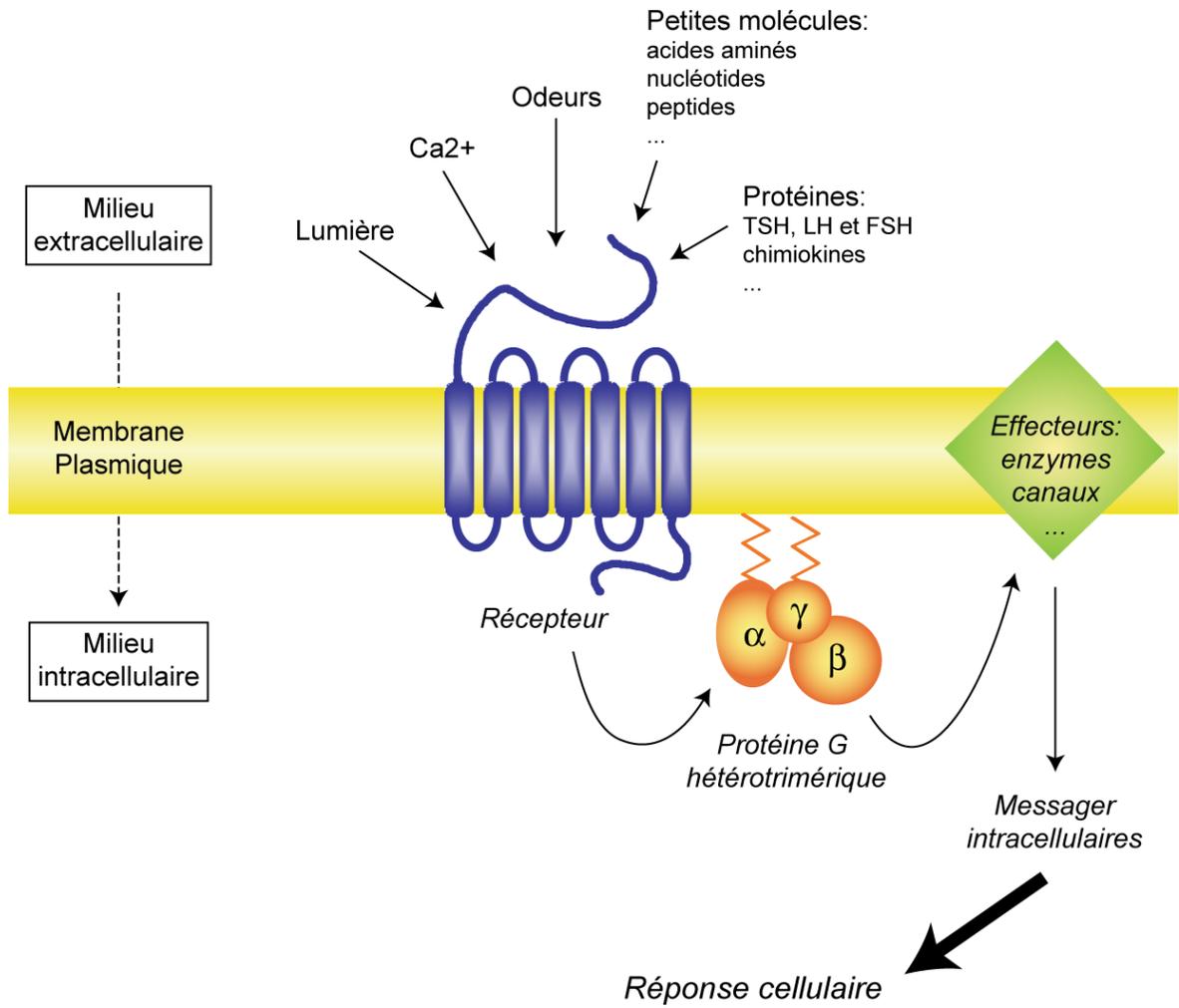


Figure 1. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G.

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Il y a seulement 40 ans, bien que les éléments importants de la cascade de signalisation tels les protéines G hétéro-trimériques et l'effecteur adénylate cyclase, aient été identifiés, l'existence de récepteurs membranaires en tant qu'unité moléculaire restait spéculative (Lefkowitz, 2007). Bien avant qu'un RCPG soit isolé et séquencé, plusieurs médicaments ciblant cette classe de protéines étaient disponibles sur le marché, incluant entre autre les β -bloqueurs et les analgésiques opiacés (Jacoby et al., 2006). Le développement de la chromatographie d'affinité permettant la purification des récepteurs adrénergiques (Caron et al., 1979) et subséquemment dans les années 80, la reconstitution de la signalisation dans des vésicules de phospholipides à partir de ces récepteurs purifiés (Cerione et al., 1983), a permis de démontrer hors de tout doute l'existence d'une molécule réceptrice. Par la suite, le clonage du récepteur β_2 -adrénergique (Dixon et al., 1986) révélant la présence de 7 domaines transmembranaires (7TM) ayant une homologie avec la rhodopsine, a ouvert la porte à un vaste champ d'étude. Il est alors apparu évident que les 7TM représentent une signature structurale pour les RCPGs et rapidement de nombreux autres membres de cette famille ont été clonés. Aujourd'hui, cette famille de récepteurs compte plus de 800 membres dont environ 375 qui ne sont ni des récepteurs olfactifs, ni des récepteurs du goût. De cette sous-famille de 375 récepteurs, il subsiste toujours 160 RCPGs pour lesquels aucun ligand n'est connu à ce jour, baptisés récepteurs orphelins (Armbruster and Roth, 2005).

1.1 Organisation structurale

Les membres de la grande famille des RCPGs ont tous en commun une topologie similaire constituée de 7 TM (TMI-VII), un domaine amino-terminal (N-ter) extracellulaire

et un domaine carboxyl-terminal (C-ter) intracellulaire, formant ainsi 3 boucles extracellulaires (e1-e3) et 3 boucles intracellulaires (i1-i3) (Figure 2a). Le premier récepteur de cette famille dont la structure de haute résolution a été déterminée en 2000 par cristallographie est la rhodopsine, un récepteur pour la lumière que l'on retrouve en abondance dans la rétine (Palczewski et al., 2000) (Figure 2b). La rhodopsine est un récepteur particulier puisque contrairement aux autres RCPGs, son ligand est un chromophore, le 11-cis-rétinal, lié de façon covalente au récepteur, qui le stabilise dans un état inactif en absence de lumière. Suite à l'absorption d'un photon, il y a isomérisation du 11-cis-rétinal entraînant un changement de conformation du récepteur qui permet de produire une réponse biologique. L'élucidation de la structure de la rhodopsine a permis de confirmer la présence des 7 hélices α traversant la membrane plasmique constituant les 7TM du récepteur. De façon surprenante, la cristallographie a aussi révélé la présence d'une 8^e hélice α dans le domaine carboxyl-terminal, parallèle au plan de la membrane plasmique.

Dans le cas des autres RCPGs pour lesquels le ligand est diffusible et non covalent, la cristallographie a représenté un défi de taille étant donné la flexibilité structurale inhérente à ces récepteurs. Ce n'est que tout récemment que l'équipe du Dr Kobilka a réalisé une percée dans ce domaine en rapportant la cristallographie du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007; Rasmussen et al., 2007) (Figure 2c), un récepteur pour l'adrénaline, archétype de la famille des RCPGs. Afin d'obtenir des cristaux du β_2 AR, les auteurs ont dû recourir à différentes stratégies pour stabiliser la structure de ce récepteur. Notamment, la 3^e boucle intracellulaire étant l'une des régions les plus dynamique, ils ont soit utilisé un anticorps dirigé contre cette portion du récepteur (Rasmussen et al., 2007), soit remplacé le domaine i3 par le lysozyme T4 (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). De plus, toujours dans le but d'augmenter la stabilité du récepteur, la cristallisation a été réalisée en présence du ligand carazolol. Deux éléments structuraux principaux diffèrent entre la rhodopsine et le β_2 AR. Premièrement, la poche de liaison où est attaché de façon covalente le 11-cis-rétinal chez la

rhodopsine est couverte par la boucle e2 et le N-ter. Cette structure limiterait l'accès à des ligands diffusibles et n'est donc pas présente chez le β_2 AR, où le domaine e2 forme une hélice retenue par deux ponts disulfures, donnant ainsi un accès direct à la poche de liaison. Deuxièmement, l'interaction ionique (appelée « verrou » ionique) reliant deux résidus à la fin des TMIII (R135) et VI (E247) chez la rhodopsine, est absente chez le β_2 AR. Cette différence pourrait être liée à la présence du ligand carazolol dans la structure du β_2 AR, qui stabiliserait le récepteur dans une conformation particulière, inactive pour la protéine G mais active pour d'autres voies de signalisation indépendante de la protéine G (voir section 1.3.2) (Audet and Bouvier, 2008).

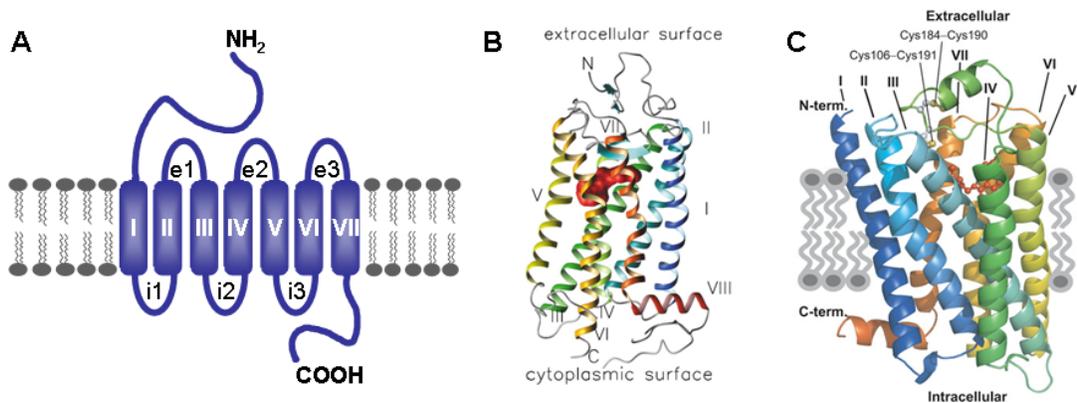


Figure 2. Structure des RCPGs.

A) Représentation schématique d'un RCPG montrant les différents domaines dont il est constitué. B-C) Comparaison de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine (B; Tiré de (Filipek et al., 2003)) avec celle du récepteur β_2 AR (C; Tiré de (Blumer and Thorner, 2007)).

1.2 Classification

La classification la plus couramment utilisée sépare les récepteurs en différentes classes A, B, C, D, E et F basée sur la présence de différents motifs de séquences (Vassilatis et al., 2003;Horn et al., 1998). Cette classification couvre à la fois les vertébrés et les invertébrés. Toutefois, la conservation de séquence entre les récepteurs homologues chez les vertébrés et invertébrés est minime, ainsi certaines familles de ce système de classification ne se retrouvent pas chez les humains. Une analyse phylogénétique plus récente réalisée uniquement sur les RCPGs humains, divise maintenant ces récepteurs en 5 familles principales appelées glutamate (G), rhodopsine (R), adhésion (A), frizzled (F) et sécrétine (S), à partir des noms de récepteurs membres de chacune de ces familles. Cette nomenclature forme ainsi le système de classification GRAFS (Fredriksson et al., 2003;Schioth and Fredriksson, 2005).

La famille des récepteurs au glutamate (G)

Les membres de cette famille possèdent un très long domaine N-terminal, formant deux lobes séparés par une cavité, appelé « venus fly trap », qui se referment sur le ligand suite à sa liaison. Cette famille comprend entre autres les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_BR1 et GABA_BR2), le récepteur sensible au calcium (CaSR) et certains récepteurs du goût (T1R). Ce groupe correspond essentiellement à la famille C de la classification A-F.

La famille de la rhodopsine (R)

Il s'agit de la plus grande famille de RCPGs, comprenant plus de 200 ou 700 récepteurs, dépendamment si l'on tient compte ou non des récepteurs olfactifs. Cette famille est constituée principalement des membres de la classe A dans la nomenclature A-F. On y retrouve entre autres la rhodopsine, les récepteurs adrénergiques (dont le β_2 AR), chimiokines et opioïdes. Un trait commun conservé chez les membres de la famille R est la

présence d'un motif NSxxNPxxY au niveau du TMVII et d'un motif DRY au niveau de la jonction entre le TMIII et la boucle i2. Le résidu R du motif DRY est d'ailleurs impliqué dans les interactions avec le TMVI formant le « verrou » ionique observé dans la structure de la rhodopsine et absent chez le β_2 AR (voir section 1.1). La majorité des récepteurs de cette famille possèdent un N-ter relativement court et leurs ligands se lient au niveau d'une cavité formée entre les domaines transmembranaires, à l'exception des récepteurs aux hormones glycoprotéiques et de certains récepteurs peptidiques, pour lesquels le site de liaison implique le domaine N-ter.

La famille des récepteurs d'adhésion (A)

Les membres de cette nouvelle famille possèdent un très long domaine N-ter (200 à 2800 acides aminés) contenant des motifs impliqués dans l'adhésion cellulaire de type facteur de croissance épidermique (EGF) par exemple et de nombreux sites de glycosylation, en plus de posséder un domaine protéolytique de type RCPG dans certains cas. Cette famille comprend entre autre les récepteurs lectomédines, ainsi que certains membres qui appartenaient auparavant à la classe B de la classification A-F, tel le récepteur latrophiline.

La famille des récepteurs frizzled (F)

Cette famille est constituée des récepteurs frizzled (Fz), smoothed (Smo) et de certains récepteurs du goût (T2R). Les récepteurs Fz et Smo, membres de la famille F de la classification A-F, sont impliqués dans le développement des métazoaires. Ces récepteurs contiennent un long domaine N-ter d'environ 200 acides aminés comprenant plusieurs résidus cystéines conservées impliquées dans la liaison du ligand.

La famille des récepteurs à la sécrétine (S)

Cette famille est formée de récepteurs pour des peptides de grande taille, agissant principalement de façon paracrine (signaux échangés par des cellules voisines). Dans la plupart des cas, le site de liaison du peptide se situe au niveau du long domaine N-ter de ces

récepteurs (60 à 80 acides aminés) qui contient des résidus cystéines conservées. En plus du récepteur à la sécrétine, cette famille comprend entre autres, le récepteur du glucagon, du polypeptide intestinal vasoactif/polypeptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire (VPACR) et de l'hormone parathyroïde (PTHrP). Il s'agit essentiellement de la famille B de la classification A-F. Les récepteurs utilisés comme modèle d'étude dans la présente thèse, le récepteur de la calcitonine (CTR) et le récepteur similaire au récepteur de la calcitonine (CLR), appartiennent à cette famille.

1.3 Signalisation

1.3.1 Les protéines G hétéro-trimériques et leurs effecteurs

Dans la cascade de signalisation classique des RCPGs, la liaison d'un agoniste au niveau des TM et/ou du N-ter d'un RCPG, dépendamment de quelle classe de récepteur il s'agit (voir section 1.2), induit un changement de conformation dans les domaines cytoplasmiques du récepteur, qui entraîne l'activation d'une protéine G hétéro-trimérique. Les protéines G hétéro-trimériques sont composées de trois sous-unités: α , β et γ . La sous-unité $G\alpha$ lie le guanosine triphosphate (GTP) et possède une activité GTPase responsable de l'hydrolyse du GTP. Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ sont quant à elles liées de façon constitutive par le biais d'une structure de type « coiled-coil ». Des modifications post-traductionnelles lipidiques au niveau des sous-unités $G\alpha$ et $G\gamma$ (palmytoylation et dans certains cas myristoylation pour les $G\alpha$, et isoprénylation pour les $G\gamma$) permettent l'ancrage à la membrane plasmique de la protéine G du côté cytoplasmique. Les boucles intracellulaires du récepteur, principalement i2 et i3, interagissent à la fois avec le C-ter de la sous-unité $G\alpha$ et celui de la sous-unité $G\gamma$.

À l'état basal, la sous-unité $G\alpha$ est liée au GDP (guanosine diphosphate) et la protéine G est inactive. Suite au changement de conformation du récepteur provoqué par la liaison de son ligand, le récepteur agit comme GEF (facteur d'échange du guanosine) et induit la libération du GDP au niveau de la sous-unité $G\alpha$ qui sera alors remplacé par du GTP. La protéine G est ainsi activée et les sous-unités $G\alpha$ liée au GTP et $G\beta\gamma$ peuvent alors réguler divers effecteurs, activant ainsi différentes cascades de signalisations intracellulaires. L'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPase de la sous-unité $G\alpha$ met ensuite fin à la signalisation, en restaurant la forme inactive de la protéine G liée au GDP. Différentes protéines peuvent réguler ce cycle d'activation des protéines G, notamment les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) qui vont accélérer l'hydrolyse du GTP en GDP via leur activité GTPasique (Figure 3).

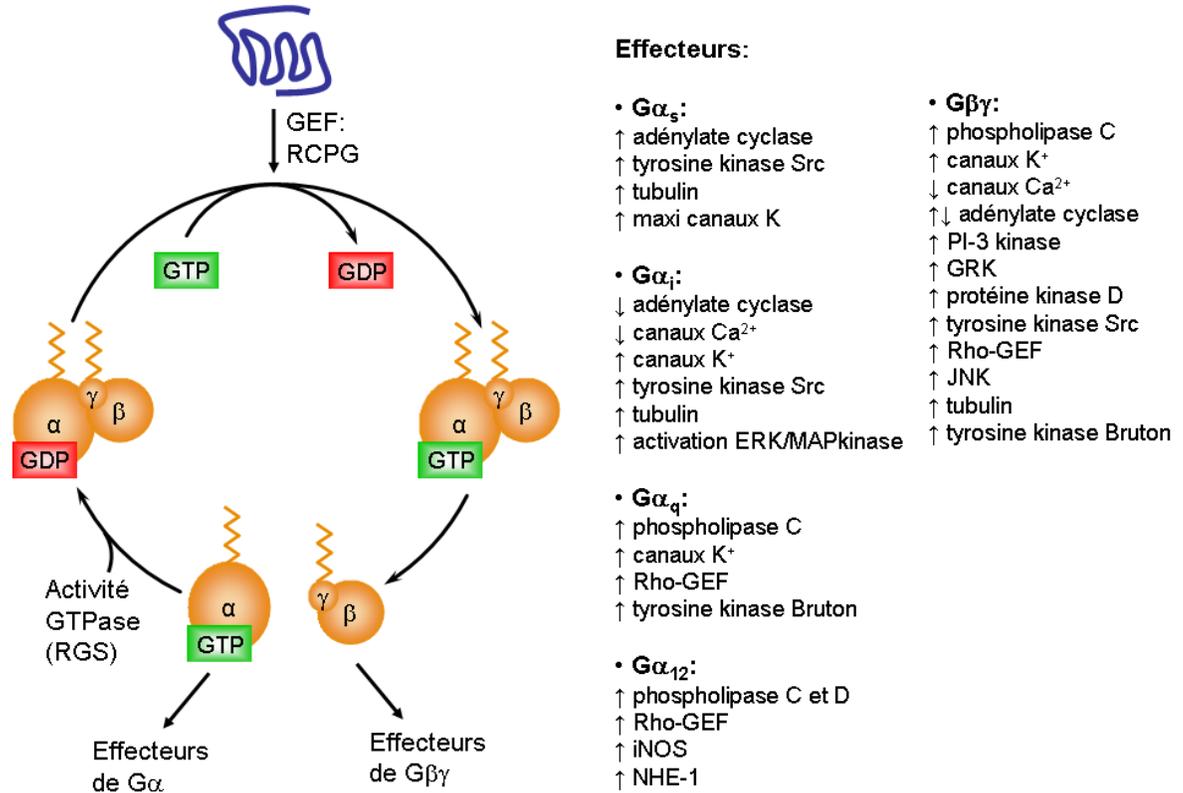


Figure 3. Les protéines G hétéro-trimériques.

Schéma représentant le cycle d'activation/inactivation des protéines G hétéro-trimériques : le récepteur agit comme GEF en permettant l'échange du GDP pour le GTP au niveau de la sous-unité α de la protéine G. Une liste énumérant les différentes classes de protéine G α ainsi que les effecteurs modulés par ces différentes sous-unités α et $\beta\gamma$ est présentée à droite du schéma d'activation/inactivation des protéines G: ↑ représente une activation alors que ↓ indique une inhibition de l'effecteur (Milligan and Kostenis, 2006).

Toutefois, la question de savoir si les différents partenaires impliqués dans cette cascade de signalisation, le récepteur, la protéine G et les effecteurs, sont pré-associés ou non, les uns avec les autres, en absence de ligand, reste ouverte (Oldham and Hamm, 2008).

Selon le modèle classique, le récepteur lie la protéine G uniquement lorsqu'il est activé, et l'activation de la protéine G provoque la dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ qui pourront ensuite interagir avec les effecteurs (Hein et al., 2005). Le modèle alternatif propose que le récepteur inactif puisse interagir avec la protéine G et les effecteurs, formant ainsi un complexe récepteur/protéine G/effecteur pré-associé, en absence de ligand. L'activation de la protéine G et subséquentement des effecteurs reposerait uniquement sur des changements conformationnels plutôt que sur des associations/dissociations de protéines (Gales et al., 2006;Rebois et al., 2006).

Chez l'humain, il existe 16 gènes codant pour des sous-unités $G\alpha$ différentes, 5 pour $G\beta$ et 12 pour $G\gamma$, conférant ainsi un très grand nombre de possibilité d'hétéro-trimères, qui explique probablement en partie la sélectivité et la spécificité des voies de signalisation induites par les RCPGs, même si toutes les combinaisons ne sont pas nécessairement observées *in vivo* (Mervine et al., 2006). La nature de la sous-unité $G\alpha$ présente dans l'hétéro-trimère définit le type de protéine G auquel le récepteur est couplé. Les sous-unités $G\alpha$ sont sub-divisées en 4 classes principales: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$ et chacune de ces classes, ainsi que les divers couples $G\beta\gamma$, régulent différents effecteurs donnés (Figure 3). Notamment, $G\beta\gamma$ module les canaux ioniques K^+ et Ca^{2+} , $G\alpha_q$ active la phospholipase C et $G\alpha_{12}$ active Rho. De façon intéressante, $G\alpha_s$ active la plupart des isoformes de l'adénylate cyclase, alors que $G\alpha_i$ inhibe les isoformes I, V et VI de cette même enzyme. Les sous-unités $G\beta\gamma$ peuvent également inhiber (isoformes I, III et VIII) ou activer (isoformes II, IV et VII) les différentes isoformes de l'adénylate cyclase. La régulation de ces différents effecteurs entraîne la production de messagers intracellulaires, qui pourront à leur tour réguler l'activité de diverses protéines. À titre d'exemple, l'activation de l'adénylate cyclase par la sous-unité $G\alpha_s$ va mener à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), synthétisé par l'adénylate cyclase à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). Cette augmentation de la concentration intracellulaire du

second messenger AMPc, provoquera alors l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui va à son tour phosphoryler différents substrats, aboutissant ainsi à la réponse biologique.

Les différentes protéines G peuvent être activées par plusieurs récepteurs et un récepteur peut activer plusieurs protéines G différentes, ainsi de nombreuses cascades de signalisation seront activées simultanément suite à la liaison du ligand sur le récepteur. Par ailleurs, comme il en sera question dans la prochaine section, les protéines G telles que décrites dans cette cascade de signalisation classique, ne constituent pas les seuls partenaires de signalisation des RCPGs. C'est donc l'intégration de toutes ces différentes cascades de signalisation stimulées suite à l'activation d'un RCPG qui mènera à l'obtention d'une réponse biologique appropriée.

1.3.2 Autres partenaires des RCPGs

En plus de la signalisation dépendante des protéines G décrite ci-dessus (voir section 1.3.1), il existe une signalisation par les RCPGs indépendante de l'activation des protéines G hétéro-trimériques. Parmi les diverses protéines impliquées dans de telles cascades de signalisation, la protéine β -arrestine constitue sans aucun doute la plus étudiée d'entre elles. Cette protéine, découverte initialement pour son rôle dans la désensibilisation des récepteurs (voir section 1.3.3), est capable d'interagir avec la plupart des RCPGs et peut induire directement l'activation de la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) (Luttrell et al., 1999). En plus d'activer la voie des MAPK, le recrutement de la β -arrestine par les RCPGs permet la régulation de d'autres voies de signalisation impliquant notamment NF κ B (Gao et al., 2004) et Akt (Beaulieu et al., 2008), de façon indépendante des protéines G.

Certains RCPGs peuvent aussi moduler l'activité de canaux ioniques sans passer par les protéines G, comme c'est le cas pour les récepteurs de la dopamine D5 et D1 qui interagissent directement avec les canaux ioniques GABA_A et NMDA respectivement (Liu

et al., 2000; Lee et al., 2002). D'autres RCPGs peuvent aussi activer des voies de signalisation en interagissant avec des protéines d'échafaudage, qui lient le récepteur directement aux effecteurs. Par exemple, le récepteur β_2 AR régule l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ via son interaction avec la protéine à domaines PDZ (domaine semblable à la protéine de densité synaptique-95/Discs-large/ZO-1) appelée facteur de régulation de l'échange Na^+/H^+ (NHERF) (Hall et al., 1998), alors qu'en interagissant avec les protéines de la famille Homer, les récepteurs mGluR peuvent contrôler la concentration intracellulaire de calcium via la régulation des récepteurs de l'inositol triphosphate (Tu et al., 1998). Ces différents exemples illustrent la complexité maintenant apparente de la signalisation des RCPGs qui ne se résume plus uniquement à la voie classique RCPG/protéine G/effecteur. Étant donné cette signalisation indépendante des protéines G, les RCPGs ont été rebaptisés par certains auteurs, « récepteurs à 7TM » (R7TM) (Pierce et al., 2002).

Les RCPGs n'interagissent donc pas seulement avec les protéines G, mais aussi avec une vaste panoplie d'autres protéines, appelées « protéines interagissant avec les RCPGs » (« G protein-coupled receptors interacting proteins »; GIP) (Bockaert et al., 2004). En plus de comprendre les protéines impliquées dans la signalisation indépendante des protéines G décrites ci-dessus, le terme « GIP » englobe aussi diverses protéines accessoires impliquées dans plusieurs autres aspects de la régulation de l'activité des RCPGs, tels que la localisation cellulaire, la pharmacologie et la régulation fine de la signalisation des récepteurs. L'interaction des récepteurs avec les kinases des RCPGs et leur oligomérisation avec d'autres RCPGs ou des protéines à 1 TM constituent différents exemples de GIP dont il sera question dans les prochaines sections.

1.3.3 Régulation de la signalisation : désensibilisation, internalisation et recyclage

Suite à l'activation des RCPGs par leur agonistes, la plupart des récepteurs seront désensibilisés via leur phosphorylation au niveau de résidus sérines et thréonines situés sur le C-ter et la boucle i3. Cette phosphorylation par les protéines appelées « kinases des récepteurs couplés aux protéines G » (« G protein coupled receptor kinase »; GRK; (Lorenz et al., 1991)) entraîne le recrutement de la β -arrestine sur le récepteur, ce qui empêche de façon stérique le couplage de la protéine G au récepteur qui ne pourra plus activer la signalisation dépendante des protéines G. Cette désensibilisation par les GRK est appelée désensibilisation homologue puisqu'elle implique uniquement les récepteurs liés à l'agoniste.

En plus de provoquer le découplage fonctionnel des récepteurs à la protéine G, le recrutement de la β -arrestine entraîne l'internalisation des RCPGs (Ferguson et al., 1996) via les puits tapissés de clathrine, en établissant un lien entre les récepteurs et les protéines AP-2 et clathrine. On distingue deux classes de R7TM selon leur affinité pour la β -arrestine (Oakley et al., 2000). La classe A regroupe les récepteurs qui interagissent uniquement de façon transitoire avec la β -arrestine. Ces récepteurs qui se dissocient de la β -arrestine après avoir été acheminé vers les puits tapissés de clathrine, seront recyclés vers la membrane plasmique rapidement suite à leur internalisation. La classe B quant à elle contient les R7TM qui internalisent sous forme d'un complexe stable avec la β -arrestine. Les récepteurs de la classe B seront soit dégradés suite à leur internalisation, soit recyclé lentement vers la membrane plasmique.

Comme il a été discuté dans la section 1.3.2, le recrutement de la β -arrestine permet également d'induire directement l'activation de voies de signalisation, ainsi au lieu de constituer des mécanismes de terminaison de la transduction du signal, les mécanismes décrits ci-dessus permettent plutôt une régulation fine de la signalisation en inhibant le

signal dépend des protéines G tout en activant différentes voies indépendantes des protéines G hétéro-trimériques.

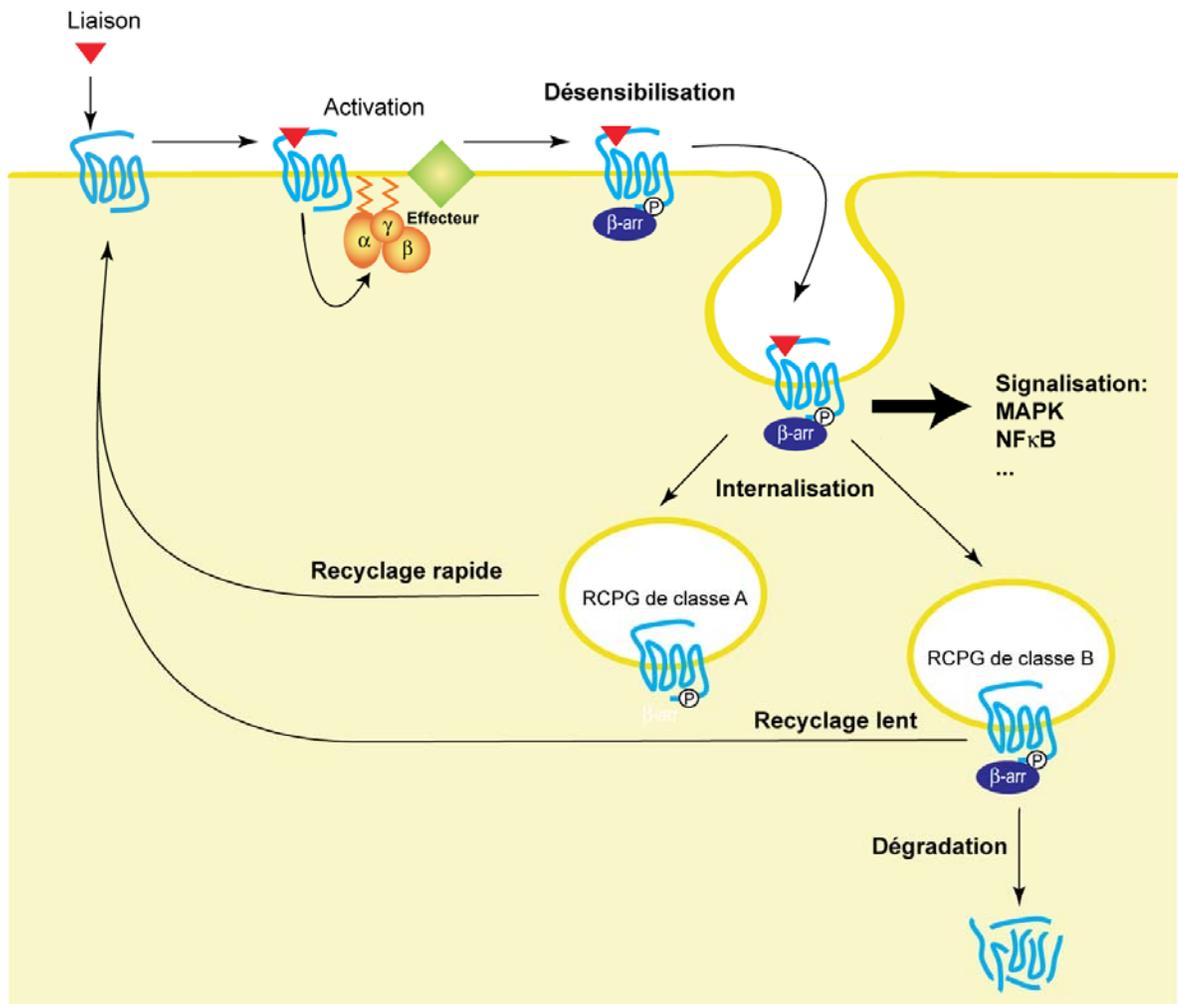


Figure 4. Désensibilisation, internalisation et recyclage des RCPGs.

Le récepteur phosphorylé suite à son activation recrute la β -arrestine, ce qui provoque son internalisation. Pour les récepteurs de classe A, l'internalisation est suivie du recyclage rapide du récepteur à la membrane plasmique. Dans le cas des récepteurs de classe B, le récepteur sera soit dégradé, soit recyclé lentement à la surface cellulaire. Le recrutement de la β -arrestine permet également l'activation de voies de signalisation indépendantes des protéines G.

Outre leur phosphorylation par les GRK, les RCPGs peuvent également être phosphorylés par les kinases dépendantes des seconds messagers, telles la PKA et la PKC, ce qui provoque une désensibilisation hétérologue, qui survient non seulement sur des récepteurs occupés par un ligand, mais aussi au niveau des RCPGs libres. Toutefois, contrairement à la désensibilisation homologue par les GRK, la phosphorylation des RCPGs par les kinases dépendantes des seconds messagers n'entraîne pas le recrutement de la β -arrestine sur le récepteur et donc ne provoque pas l'internalisation des RCPGs.

2. L'oligomérisation des RCPGs

Un niveau de complexité supérieur dans la signalisation des RCPGs est apparu au cours de la dernière décennie, suite à la reconnaissance de l'oligomérisation des R7TM. En effet, les RCPGs peuvent interagir entre eux pour former des oligomères RCPG/RCPG ainsi que s'associer avec des protéines accessoires à 1 TM pour constituer des complexes RCPG/protéine à 1TM, et dans les deux cas, ces assemblages oligomériques jouent un rôle primordial dans la transmission de la signalisation, en agissant à différents endroits dans le cycle de vie des récepteurs.

2.1 Homo- et hétéro-oligomérisation avec d'autres RCPGs

Contrairement à la plupart des récepteurs membranaires, tels les récepteurs tyrosines kinases, les canaux ligands-dépendants, les récepteurs aux cytokines et les récepteurs guanylates cyclases, dont l'association en oligomères est connue depuis longtemps comme essentielle pour leur fonction, les RCPGs ont longtemps été considéré en tant qu'unités monomériques. Malgré la présence d'évidences suggérant l'association en oligomères de R7TM depuis le début des années 80 (revues dans (Salahpour et al., 2000)), ce n'est que récemment que le dogme selon lequel les RCPGs agissent sous forme monomérique a été modifié au profit de la forme oligomérique.

Bien que plusieurs études aient proposé l'existence de complexes oligomériques de RCPGs (Hebert et al., 1996), une reconnaissance plus générale de ce concept par la communauté scientifique a été apportée par l'étude de R7TM formant des hétéro-oligomères obligatoires. Les premières évidences appuyant l'existence de tels complexes, reposent sur l'étude du récepteur pour le GABA, membre de la famille G. En effet, le GABA_BR est un hétéro-oligomère obligatoire composé des deux R7TM, GABA_BR1 et

GABA_BR2 (Jones et al., 1998; White et al., 1998; Kaupmann et al., 1998). Lorsqu'il est exprimé seul, le GABA_BR1 est retenu à l'intérieur de la cellule, alors que même s'il peut atteindre la membrane plasmique, le GABA_BR2 est incapable de lier le GABA en absence de co-expression du GABA_BR1. Suite à la formation d'un hétéro-oligomère GABA_BR1/GABA_BR2, le signal de rétention intracellulaire présent au niveau de la queue C-ter du GABA_BR1 est masqué, ce qui permet l'obtention d'un récepteur pour le GABA fonctionnel à la surface cellulaire. Par ailleurs, un GABA_BR1 muté qui est acheminé à la membrane plasmique suite à la délétion de son signal de rétention, n'est toujours pas fonctionnel, indiquant que le GABA_BR2 n'est pas seulement requis pour sa fonction de chaperone du GABA_BR1, mais jouerait aussi un rôle dans la signalisation (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Alors que seule la sous-unité GABA_BR1 lie le ligand, le modèle actuel suggère que l'activation de la protéine G serait effectuée par la sous-unité GABA_BR2 (Duthey et al., 2002). En plus du récepteur GABA_B, deux autres RCPGs de la famille G, les récepteurs du goût sucré et umami, constituent des exemples d'hétéro-oligomères obligatoires. En effet, bien que les présumés récepteurs du goût T1R1, T1R2 et T1R3 ne soient pas fonctionnels lorsqu'exprimés seul, la co-expression de T1R3 avec T1R2 ou T1R1 entraîne la formation de récepteurs pour les goûts sucré et umami (acides aminés-L) respectivement (Nelson et al., 2001; Nelson et al., 2002). De façon intéressante, la détection des goûts sucré et umami sont tous les deux diminués chez les souris knock-out T1R3. Chez les souris dont l'expression de T1R2 a été abolie, seule la perception du goût sucré est diminuée, alors que chez les souris knock-out T1R1, seule la détection du goût umami est affectée (Zhao et al., 2003). Ainsi, la formation d'hétéro-oligomères T1R3/T1R2 et T1R3/T1R1 est nécessaire pour l'obtention de récepteurs gustatifs fonctionnels.

Ces deux exemples d'hétéro-oligomères obligatoires illustre bien la propension des RCPGs à interagir les uns avec les autres. Même si la majorité des R7TM ne forment pas des hétéro-dimères obligatoires et peuvent fonctionner sans nécessiter leur association à un récepteur différent, la formation d'hétéro-oligomères a été proposée pour plus de 40 récepteurs (Prinster et al., 2005), par le biais de différentes techniques qui seront exposées

dans la section 2.1.1. Outre la formation d'hétéro-oligomères, de nombreux RCPGs peuvent s'associer avec d'autres récepteurs identiques, pour former des homo-oligomères. Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'homo- ou d'hétéro-oligomères, ces assemblages entre R7TM entraînent diverses conséquences fonctionnelles qui seront détaillées à la section 2.1.2.

2.1.1 Méthodes utilisées pour détecter l'oligomérisation des RCPGs

Plusieurs techniques permettant la détection d'interactions protéine-protéine ont été utilisées afin de démontrer la capacité des RCPGs à interagir entre eux. Cette section décrit plusieurs de ces méthodes, dans le contexte spécifique de l'étude de l'oligomérisation des R7TM.

Co-immunoprécipitation

L'approche biochimique traditionnellement utilisée pour étudier l'oligomérisation est la co-immunoprécipitation de récepteurs portant différents épitopes. Suite à l'immunoprécipitation d'un RCPG, la présence d'un autre récepteur associé à celui-ci est détectée sur « Western Blot », à partir de l'utilisation d'anticorps différents dirigés contre ces deux récepteurs. Dans la première publication où cette technique a été utilisée, à partir de cellules co-exprimant les récepteurs β_2 AR portant l'épitope HA ou myc en N-ter (Hebert et al., 1996), les auteurs ont détecté la présence d'immunoréactivité HA suite à l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-myc, suggérant ainsi la présence d'homo-oligomères HA- β_2 AR/myc- β_2 AR. Par la suite, cette technique a été appliquée à plusieurs autres récepteurs pour démontrer non seulement leur homo-oligomérisation (pour les récepteurs mGluR5 (Romano et al., 1996), δ -opioïde (Cvejic and Devi, 1997), CaSR (Bai et al., 1998) et muscarinique M3 (Zeng and Wess, 1999) par exemples) mais aussi leur hétéro-oligomérisation avec d'autres récepteurs (dans le cas des récepteurs δ -/ κ -opioïdes (Jordan

and Devi, 1999), somatostatines SST3/SST2a (Pfeiffer et al., 2001) et dopamine D1/Adénosine A1 (Gines et al., 2000) par exemples). Toutefois, la co-immunoprécipitation de récepteurs membranaires requiert leur solubilisation dans des détergents, ce qui peut s'avérer problématique étant donné la possibilité d'agrégation non-spécifique des récepteurs due à leur grande hydrophobicité. Bien que certains contrôles puissent être effectués afin de s'assurer de la spécificité des résultats obtenus, il n'en demeure pas moins que cette technique est réalisée *in vitro*, sur des protéines solubilisées. Afin d'étudier l'oligomérisation des RCPGs dans un contexte se rapprochant davantage des conditions natives, les chercheurs se sont alors tournés vers des approches de transfert d'énergie de résonance, permettant la détection d'interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes.

Transfert d'énergie de résonance de fluorescence et de bioluminescence

Les techniques de transfert d'énergie de résonance (RET) sont basées sur le transfert d'énergie non-radiatif d'un donneur à un accepteur d'énergie. Dans le cas du transfert d'énergie de résonance de fluorescence (« Fluorescence resonance energy transfer »; FRET), le donneur et l'accepteur sont tous les deux des molécules fluorescentes, alors que pour le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (« Bioluminescence resonance energy transfer »; BRET), le donneur fluorescent est remplacé par une enzyme bioluminescente. Le BRET et le FRET surviennent lorsque les trois conditions suivantes sont remplies: (1) le spectre d'émission du donneur d'énergie doit chevaucher le spectre d'excitation de l'accepteur d'énergie, (2) le donneur et l'accepteur d'énergie doivent être dans une orientation permissive au transfert et (3) se trouver à proximité (<100 Å) l'un de l'autre. Cette dépendance du transfert d'énergie en fonction de la proximité du donneur et de l'accepteur en fait un système de choix pour détecter les interactions protéine-protéine.

Dans le cas du BRET, le donneur et l'accepteur d'énergie typiquement utilisés sont la *Renilla* luciférase (*Rluc*) et la GFP respectivement. Suite à la dégradation du substrat

coelenterazine par l'enzyme bioluminescente *Rluc*, il y a production d'énergie de résonance qui sera transférée à la GFP. La GFP ainsi excitée émettra à son tour de la fluorescence à une longueur d'onde qui lui est propre et différente de l'émission du donneur. En ce qui a trait aux RCPGs, cette approche a tout d'abord été utilisée pour le récepteur β_2 AR (Angers et al., 2000). Le donneur et l'accepteur d'énergie ont été fusionnés en C-ter du récepteur et suite à la co-expression des deux protéines de fusion β_2 AR-*Rluc* et β_2 AR-GFP, un transfert d'énergie a été détecté, révélant ainsi la présence d'homo-oligomères du β_2 AR dans des cellules vivantes. Des résultats similaires ont ensuite permis d'établir l'homo- et l'hétéro-oligomérisation de nombreux autres RCPGs, dont les récepteurs δ -opioïde (McVey et al., 2001), de l'hormone de libération de la thyrotropine (Kroeger et al., 2001), chimiokine CCR5 (Issafras et al., 2002) et vasopressines V2 et V1a (Terrillon et al., 2003) (énumérés exhaustivement dans (Pfleger and Eidne, 2005)).

Le FRET quant à lui, tire avantage des nombreux mutants de la GFP possédant différents spectres d'absorption et d'émission (Shaner et al., 2005), puisque les donneurs et accepteurs d'énergie généralement utilisés sont des variants de la GFP. La paire la plus couramment utilisée combine la protéine fluorescente cyan (CFP) comme donneur d'énergie avec la protéine fluorescente jaune (YFP) en tant qu'accepteur d'énergie. L'application de cette technique aux RCPGs a permis en premier lieu de démontrer l'homo-oligomérisation du récepteur du facteur α Ste2 de la levure (Overton and Blumer, 2000), avant d'être utilisée sur plusieurs autres R7TM (énumérés exhaustivement dans (Pfleger and Eidne, 2005)). Contrairement au BRET où la réaction débute suite à l'ajout du substrat de la *Rluc*, le FRET nécessite l'excitation directe du donneur d'énergie par une source de lumière exogène, ce qui entraîne la présence d'un bruit de fond élevé provenant de l'autofluorescence des cellules. Afin de palier ce problème, différentes approches dérivées du FRET ont été développées, notamment le FRET en temps résolu (Time-resolved FRET; trFRET). Celui-ci s'appuie sur l'utilisation de fluorophores possédant une longue durée de vie tels le cryptate d'euprium et l'allophycocyanine, ce qui permet de diminuer le bruit de fond dû à l'autofluorescence des cellules, en introduisant un délai entre l'excitation du

donneur par le biais d'une source exogène de lumière et la détection de la fluorescence émise par l'accepteur. En couplant ces fluorophores à longue durée de vie à des anticorps anti-myc par exemple, on peut détecter la présence d'oligomères de récepteurs portant un épitope myc en N-ter, à la surface de la cellule. Le trFRET a été utilisé notamment pour démontrer la présence d'homo-oligomère des récepteurs δ -opioïde, et d'hétéro-oligomères GABA_BR1/GABA_BR2 à la membrane plasmique (McVey et al., 2001;Maurel et al., 2004).

Plus récemment, un débat concernant l'interprétation des études de RET a mis en évidence l'importance d'utiliser des contrôles adéquats et la nécessité de porter une attention particulière à la méthodologie utilisée lors de la réalisation des expériences de RET (James et al., 2006;Bouvier et al., 2007;Salahpour and Masri, 2007). La génération de courbes de titration telles que proposées par Mercier *et al.* (Mercier et al., 2002), combinée avec l'utilisation de contrôles négatifs se comportant de façon similaires aux protéines d'intérêt, ainsi que la confirmation des résultats par d'autres techniques permettant l'études des interactions protéine-protéine, sont donc essentiels afin de pouvoir tirer des conclusions adéquates sur l'assemblage oligomérique des R7TM.

Complémentation de fluorescence bimoléculaire

Récemment, une autre approche permettant l'étude des interactions protéine-protéine dans les cellules vivantes a été appliquée à l'oligomérisation des RCPGs, la complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) (Lopez-Gimenez et al., 2007;Vidi et al., 2008). Cette technique repose sur la reconstitution d'une protéine fluorescente suite à la réassociation de ces deux fragments non-fluorescents fusionnés aux protéines d'intérêt. La fluorescence sera observée uniquement suite à l'interaction entre les deux protéines d'intérêt (Hu et al., 2002). Par exemple, la co-expression des récepteurs α_{1B} -adrénergique fusionnés aux fragments C-ter et N-ter de la YFP entraîne l'apparition de la fluorescence de la YFP, indiquant la formation d'homo-oligomères du récepteur α_{1B} -adrénergique (Lopez-Gimenez et al., 2007). Tout comme le BRET et le FRET, cette approche permet l'étude de

l'assemblage oligomérique dans les cellules entières. Son principal inconvénient est le temps requis pour la réassociation des fragments en une protéine fluorescente et qu'une fois assemblés, il est possible que les fragments ne puissent pas se dissocier à nouveau (Kerppola, 2006), rendant ainsi difficile l'étude des changements rapides d'interactions entre les protéines.

Un tableau résumant les différents avantages et limitations des méthodes basées sur la fluorescence (BRET, FRET et BiFC) utilisées pour détecter l'oligomérisation des RCPGs, est présenté ci-dessous (Tableau I).

BRET: Transfert d'énergie entre un donneur enzymatique (Rluc) et un accepteur fluorescent (GFP)		FRET: Transfert d'énergie entre un donneur fluorescent (CFP) et un accepteur fluorescent (YFP)		BiFC: Reconstitution de la fluorescence à partir des deux fragments d'une protéine fluorescente (YN et YC)	
Avantages	Limitations	Avantages	Limitations	Avantages	Limitations
<ul style="list-style-type: none"> • Quantification facilitée par l'utilisation d'un substrat plutôt que de la lumière exogène pour exciter le donneur d'énergie • Détection d'interactions dynamiques possible 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucune information sur la localisation sub-cellulaire des interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation de l'interaction protéine-protéine au niveau sub-cellulaire • Détection d'interactions dynamiques possible 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification difficile due à l'excitation du donneur d'énergie par une source de lumière exogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation de l'interaction protéine-protéine au niveau sub-cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Détection d'interactions dynamiques limitée par le temps requis pour le ré-assemblage et la dissociation des fragments

Tableau I. Avantages et limitations des différentes approches basées sur la fluorescence utilisées pour l'étude de l'assemblage oligomérique des RCPGs.

L'utilisation des différentes techniques décrites ci-dessus a permis de démontrer que les RCPGs s'assemblent en homo- et hétéro-oligomères avec d'autres R7TM. Toutefois,

ces approches de détection d'interactions entre deux protéines, ne permettent pas de distinguer entre la forme dimérique et une forme oligomérique plus grande que le dimère (par exemples: trimère, tétramère,...). Ainsi, au moment où nous avons réalisé les travaux de recherche présentés dans cette thèse, la discrimination entre la dimérisation et l'assemblage en oligomères comprenant plus de deux membres, demeurait un défi de taille, étant donné l'absence de techniques permettant la détection de l'association de trois protéines ou plus, dans un contexte de cellules vivantes.

Domaines impliqués dans l'oligomérisation RCPG/RCPG

En plus de démontrer l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des RCPGs, les différentes approches décrites ci-dessus ont permis l'étude des domaines impliqués dans cette oligomérisation. Diverses études ont ainsi révélé que les déterminants moléculaires requis pour l'assemblage oligomérique des RCPGs varient en fonction des différents récepteurs étudiés. En effet, dans le cas des récepteurs CaSR et mGluR de la famille G, l'oligomérisation implique la formation de ponts disulfures au niveau des domaines N-terminal des récepteurs (Bai et al., 1998;Romano et al., 1996;Kunishima et al., 2000), alors que dans le cas du GABA_BR, l'interface de dimérisation comprend un assemblage de type « coiled-coil » entre les domaines C-terminal des récepteurs GABA_BR1 et le GABA_BR2 (White et al., 1998). Par ailleurs, en plus des domaines N-ter et C-ter (Romano et al., 2001;Zhang et al., 2001;Margeta-Mitrovic et al., 2000), plusieurs études ont suggéré une implication importante des domaines transmembranaires dans l'interaction entre les différents récepteurs, notamment pour les récepteurs de la famille R. Toutefois, les TM impliqués semblent varier d'un récepteur à l'autre, ce qui pourrait s'expliquer par des modes d'oligomérisation distincts pour les divers RCPGs, ou alors être le reflet de plusieurs points de contact entre les récepteurs (Carrillo et al., 2004;Guo et al., 2005;Salom et al., 2006).

2.1.2 Rôles de l'oligomérisation entre les RCPGs

Des évidences suggèrent que la formation d'oligomères de RCPGs joue un rôle à plusieurs stades du cycle de vie des récepteurs (Figure 5), en agissant au niveau de la maturation et de l'acheminement à la surface cellulaire (1), de la liaison du ligand (2), de l'activation des voies de signalisation (3) et de l'internalisation et du recyclage des récepteurs (4).

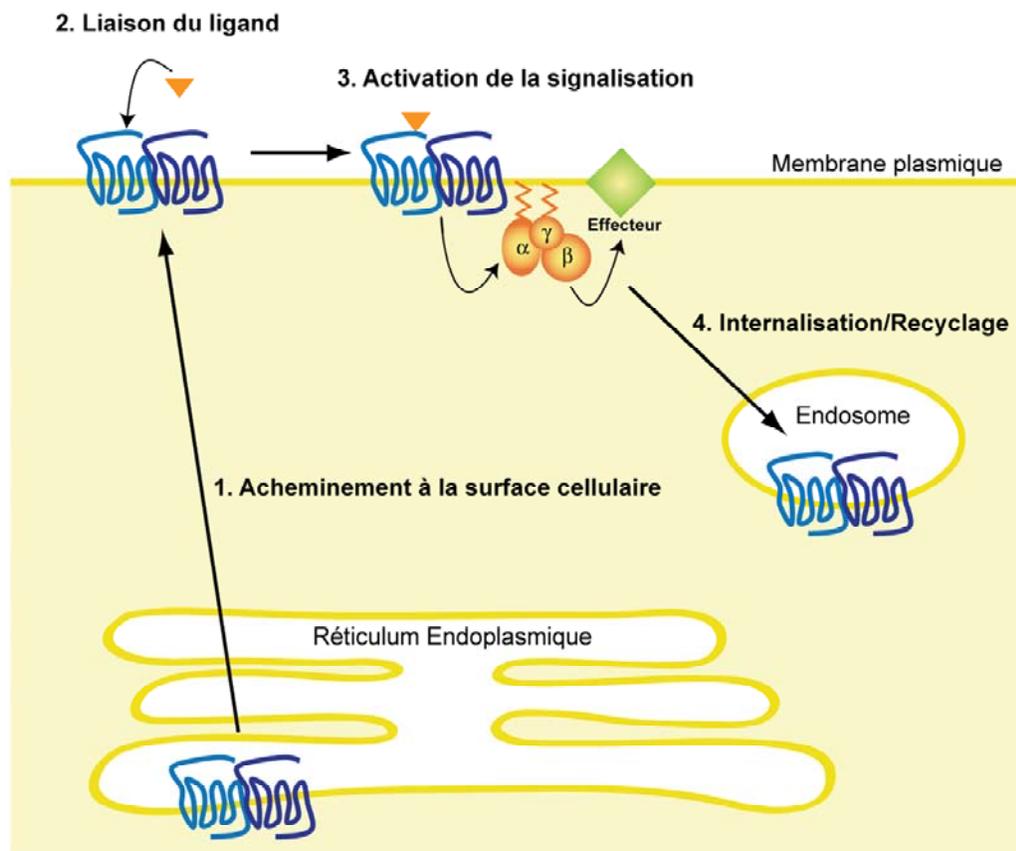


Figure 5. Rôles de l'assemblage oligomérique RCPG/RCPG dans le cycle de vie des récepteurs.

Acheminement à la surface cellulaire

Un rôle pour l'oligomérisation des RCPGs dans leur ciblage à la membrane plasmique a tout d'abord été suggéré par les études sur le récepteur de la famille G, GABA_BR, prouvant que l'assemblage d'un hétéro-oligomère GABA_BR1/GABA_BR2 est essentiel à la localisation des récepteurs GABA_BR1 à la surface cellulaire (White et al., 1998). De façon similaire, l'association du récepteur de la famille R α_{1D} -adrénergique avec le récepteur α_{1B} -adrénergique est requise pour son acheminement à la membrane plasmique (Hague et al., 2004), révélant que cette fonction pour l'hétéro-oligomérisation dans la maturation des RCPGs ne se restreint pas aux récepteurs de la famille G. Par ailleurs, tout comme dans le cas des hétéro-oligomères obligatoires, l'homo-oligomérisation des RCPGs a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE), suggérant un rôle pour l'assemblage homo-oligomérique dans le contrôle de qualité et l'export du RE des récepteurs. Par le biais de différents mutants d'export et de dimérisation, Salahpour *et al.* ont démontré que l'homo-oligomérisation du β_2 AR est requise pour son acheminement à la membrane plasmique (Salahpour et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus chez la levure pour le récepteur du facteur α Ste2 (Overton et al., 2003). D'autre part, plusieurs mutations impliquées dans diverses pathologies entraînent la rétention des RCPGs mutants à l'intérieur de la cellule, où ils agissent comme dominants négatifs en abolissant l'export à la membrane plasmique de leurs homologues sauvages (Benkirane et al., 1997; Shioda et al., 2001; Kaykas et al., 2004), appuyant une fois de plus un rôle pour l'assemblage oligomérique dans la maturation des RCPGs.

Modulation de la pharmacologie

En plus d'être nécessaire au ciblage à la membrane plasmique, l'assemblage des RCPGs en oligomères joue aussi un rôle dans la liaison des ligands en modulant la pharmacologie des récepteurs. La première évidence suggérant un rôle pour l'hétéro-

oligomérisation dans la diversité pharmacologique a été obtenue à partir des récepteurs δ -opioïdes (DOP-R) et κ -opioïdes (KOP-R) (Jordan and Devi, 1999). L'assemblage en hétéro-oligomères DOP-R/KOP-R entraîne la formation d'un complexe récepteuriel dont les propriétés pharmacologiques sont différentes de celles obtenues lorsque DOP-R et KOP-R sont exprimés seuls. En effet, alors que l'hétéro-oligomère démontre seulement une faible affinité pour les ligands sélectifs de DOP-R et KOP-R, DPDPE et U69593 respectivement, la haute affinité est restaurée suite à l'ajout combiné de ces deux ligands sélectifs, révélant la présence de coopérativité positive. D'autres exemples de coopérativités de liaison positives ou négatives ont ensuite été obtenus pour divers hétéro-oligomères tels que ceux formés par les récepteurs somatostatines SSTR5/dopamine D2 (Rocheville et al., 2000a) et les récepteurs chimiokines CCR5/CCR2b (El-Asmar et al., 2005). Un rôle similaire a été suggéré pour l'homo-oligomérisation des récepteurs des hormones glycoprotéiques pour lesquels un phénomène de coopérativité négative a été observé dans un contexte physiologique (Urizar et al., 2005), indiquant que les homo-oligomères démontrent eux-aussi de la coopérativité de liaison.

Activation de la signalisation

L'assemblage oligomérique des RCPGs module également la transduction du signal. Une augmentation ou une atténuation de la signalisation ont été rapportées pour différents hétéro-oligomères, dont les récepteurs angiotensine AT1/bradykinine B2 (AbdAlla et al., 2000) et dopamine D1/adénosine A1 (Gines et al., 2000). Par ailleurs, l'hétéro-oligomérisation peut aussi affecter la sélectivité des récepteurs pour les différentes protéines G. Par exemple, une perte du couplage avec la protéine G_i a été observée pour les hétéro-oligomères DOP-R/MOP-R (George et al., 2000) et CCR5/CCR2 (Mellado et al., 2001). Dans le cas de l'hétéro-oligomère dopamine D1/dopamine D2, une activation spécifique de la protéine G_q a été rapportée, alors que les homo-oligomères dopamines D1 et D2 sont couplés aux protéines G_s et G_i respectivement (Rashid et al., 2007).

Comme mentionné dans la section 1.3.1, il existe plusieurs points de contact entre la protéine G et le récepteur. La cristallographie de la rhodopsine a révélé l'impossibilité pour un seul récepteur d'accommoder en même temps tous ces points de contact avec la protéine G. Ainsi, il a été proposé que l'oligomérisation des RCPGs puisse expliquer la présence de cette grande surface de contact, en assumant qu'une seule protéine G soit présente sous un dimère de RCPGs (Figure 6, (Filipek et al., 2004)). En accord avec ce modèle, Banères *et al.* ont isolé un complexe pentamérique constitué de deux récepteurs leukotriène B4 BLT1 activés et une seule protéine G hétéro-trimérique (Baneres and Parello, 2003). Toutefois, ce modèle où une seule protéine G interagit avec un dimère de récepteur a été récemment remis en question par plusieurs études démontrant qu'un monomère du récepteur neurotensine NTS1, rhodopsine ou β_2 AR est suffisant pour activer la protéine G (White et al., 2007; Bayburt et al., 2007; Ernst et al., 2007; Whorton et al., 2007). Par conséquent, même s'il est clair que l'assemblage oligomérique entre les RCPGs affecte leur signalisation en modulant l'efficacité et la spécificité des voies de signalisation activées par les récepteurs, il reste toujours à déterminer si l'unité fonctionnelle de base requise pour la signalisation est constituée d'un monomère ou d'un oligomère de récepteurs.

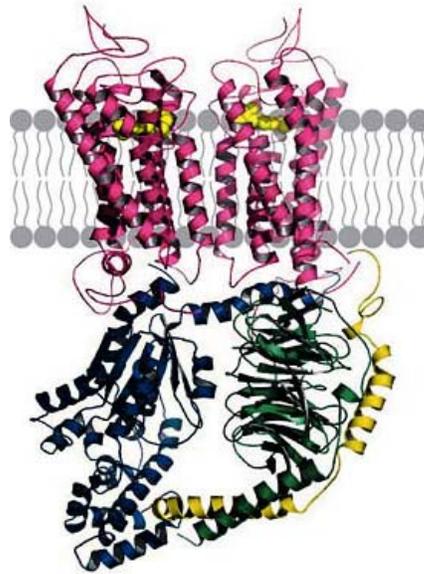


Figure 6. Structure hypothétique d'un dimère de RCPGs sous lequel se trouve une seule protéine G hétéro-trimérique.

Les deux RCPGs sont représentés en rose alors que les sous-unités α , β et γ de la protéine G hétéro-trimérique sont en bleu, vert et jaune respectivement. Tiré de (Holinstat et al., 2006).

Internalisation et recyclage

L'oligomérisation RCPG/RCPG a également des conséquences sur le ciblage des récepteurs vers l'internalisation et le recyclage suite à leur stimulation. L'identité du récepteur activé détermine le sort des autres récepteurs formant l'hétéro-oligomère. Ainsi, en présence d'un agoniste pour un des deux récepteurs formant l'hétéro-oligomère, la co-internalisation des deux RCPGs a été observée dans plusieurs cas (Rocheville et al., 2000b; Stanasila et al., 2003; Xu et al., 2003). Par exemple, pour l'hétéro-oligomère formé entre les récepteurs vasopressine V1a et V2, la stimulation avec un agoniste sélectif pour le récepteur vasopressine V1a entraîne l'internalisation et le recyclage du récepteur

vasopressine V2, en plus du V1a (Terrillon et al., 2004). Par ailleurs, certains récepteurs qui ne sont pas internalisés agissent comme dominants négatifs en bloquant l'internalisation des autres R7TM avec lesquels ils interagissent (Jordan and Devi, 1999;Lavoie et al., 2002).

Dans l'ensemble, le rôle de l'oligomérisation des RCPGs dans l'export du RE, la diversité pharmacologique, l'activation de la signalisation, ainsi que l'internalisation et le recyclage indique que vraisemblablement ces récepteurs existent sous forme d'oligomères tout au long de leur cycle de vie. L'oligomérisation entre les RCPGs entraîne un niveau de complexité supérieur, en augmentant le nombre d'entités réceptorielles à partir d'un nombre limité de gènes (Park and Palczewski, 2005). La prise en compte de cette capacité des RCPGs à s'assembler entre eux pour former des complexes dont les propriétés seront différentes de celles des récepteurs individuels, pourra permettre d'élucider la fonction de plusieurs récepteurs orphelins. Effectivement, certains récepteurs orphelins qui n'ont pas de ligands en soi peuvent hétéro-oligomériser avec des récepteurs dont les ligands ont été identifiés (non-orphelins) et ainsi réguler la signalisation de ces derniers (Levoye et al., 2006a). Il a également été suggéré que l'assemblage en hétéro-oligomère récepteur orphelin/récepteur non-orphelin puisse favoriser l'acheminement à la surface cellulaire de certains RCPGs non-orphelins pour lesquels le ciblage vers la membrane plasmique est peu efficace (Levoye et al., 2006b).

2.1.3 Évidences de l'oligomérisation entre les RCPGs *in vivo*

Plusieurs études ont permis d'établir la pertinence au niveau physiologique de ces assemblages oligomériques entre les RCPGs. L'évidence la plus directe démontrant la formation d'oligomères de RCPGs *in vivo* a été obtenue par microscopie à force atomique de disques de membrane provenant du segment externe des bâtonnets de la rétine (Fotiadis et al., 2003). Les images obtenues ont démontré l'arrangement en rangée d'homooligomères de la rhodopsine dans ces membranes (Figure 7).

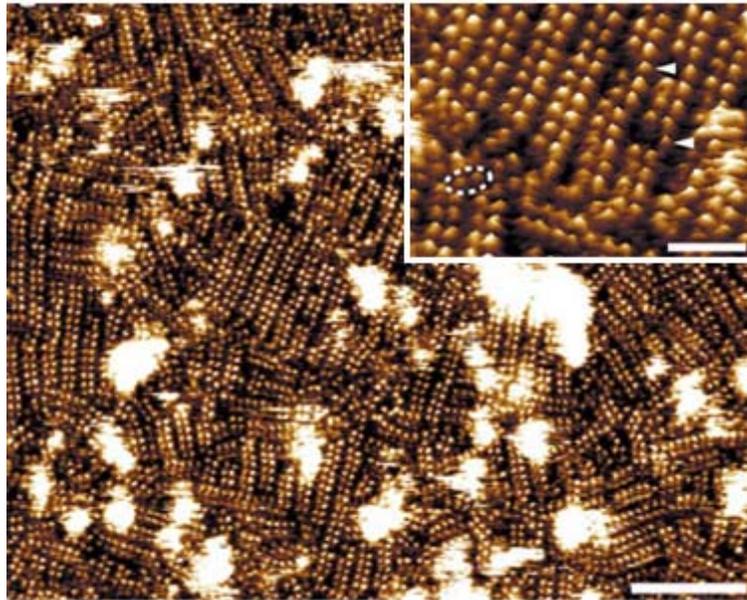


Figure 7. Topographie de la surface cytoplasmique de la rhodopsine à partir de disques membranaires du segment externe des bâtonnets.

Image obtenue par microscopie à force atomique démontrant l'arrangement paracristallin de la rhodopsine (échelle: 50nm). L'insert représente un agrandissement (échelle : 15nm) montrant les rangées de dimères de rhodopsine ainsi que la présence de dimères individuels (encerclé en pointillé) et de quelques monomères (flèches). Adapté de (Fotiadis et al., 2003).

Par ailleurs, une preuve additionnelle de la présence d'oligomères de RCPGs *in vivo* a été apportée par une étude portant sur deux autres récepteurs de la famille R, les récepteurs δ -opioïde et κ -opioïde (Waldhoer et al., 2005). Les auteurs ont démontré que le composé 6'-guanidinonaltrindole (6'-GNTI) qui active de façon plus sélective l'hétéro-oligomère DOP-R/KOP-R que les récepteurs DOP-R et KOP-R individuellement, agit comme un analgésique *in vivo*. Cette propriété analgésique du 6'-GNTI est observée uniquement dans la moelle épinière et non dans le cerveau, suggérant une organisation en hétéro-oligomère spécifique à certains tissus. En plus de confirmer l'existence d'hétéro-

oligomères DOP-R/KOP-R *in vivo*, ces résultats fournissent la preuve de concept que les hétéro-oligomères de RCPGs représentent une cible pharmacologique viable, permettant le développement d'agents thérapeutiques possédant une plus grande sélectivité.

2.2 Hétéro-oligomérisation avec des protéines accessoires à 1TM

En plus de former des homo- et hétéro-oligomères avec d'autres récepteurs à 7TM, les RCPGs peuvent aussi s'assembler en hétéro-oligomères avec des protéines accessoires à 1TM. C'est le cas notamment pour de nombreux récepteurs chimiosenseurs (récepteurs pour des signaux sensoriels externes) tels que les récepteurs de la vision, des odeurs et des phéromones, ainsi que pour certains récepteurs répondant à des signaux endogènes tels que les récepteurs pour les peptides/protéines Wnt, adrénocorticotropine (ACTH) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP). Ce type d'interaction R7TM/protéine accessoire à 1TM a été conservé durant l'évolution, puisqu'on retrouve des exemples de telles associations chez *C. Elegans*, *Drosophila Melanogaster* et les mammifères. Les protéines accessoires à 1TM ne possèdent pas d'homologie de séquence les unes avec les autres, sont de tailles très variables et peuvent être aussi bien de type I (N-ter extracellulaire et C-ter intracellulaire) que de type II (C-ter extracellulaire et N-ter intracellulaire) (Figure 8). De façon similaire à l'oligomérisation RCPG/RCPG (voir section 2.1), l'interaction des récepteurs à 7TM avec les protéines accessoires à 1TM joue un rôle au niveau de l'acheminement des récepteurs à la membrane plasmique, la protéine accessoire à 1TM agissant alors comme chaperone moléculaire, ainsi qu'au niveau de la fonction des récepteurs, dans ce cas la protéine accessoire à 1TM agit comme co-récepteur en permettant la liaison des ligands et l'activation de voies spécifiques de signalisation.

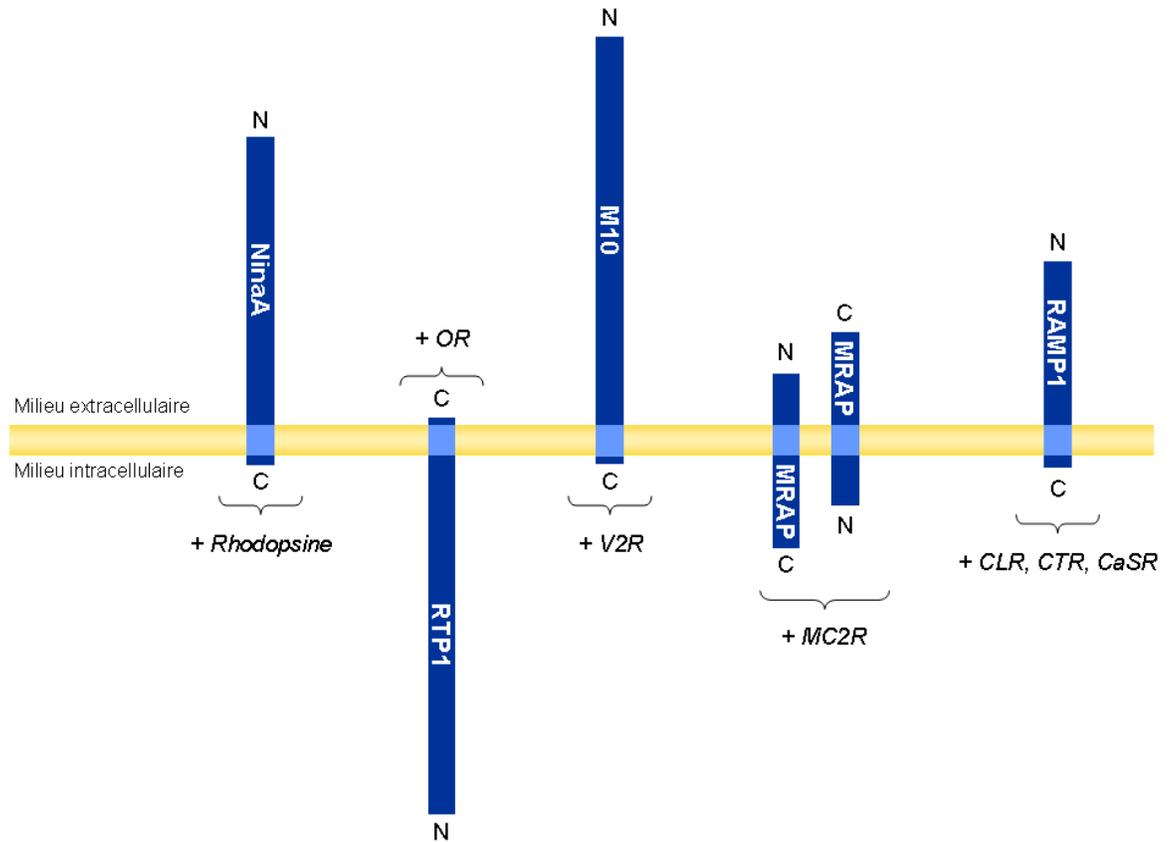


Figure 8. Comparaison de la topologie de structure des protéines accessoires à 1 TM.

Les protéines à 1TM NinaA, RTP1, M10, MRAP et RAMP1 qui agissent comme protéines accessoires pour les RCPGs rhodopsine, OR, V2R, MC2R et CLR respectivement, sont représentées ici à l'échelle. Les protéines accessoires LRP5/6 ne sont pas illustrées ici étant donné leur très grande taille.

La rhodopsine et NinaA

Chez la drosophile, la protéine à 1TM de type I, NinaA, agit comme chaperone pour le récepteur le plus abondant pour la lumière, la rhodopsine1 (Rh1). En effet, l'interaction entre Rh1 et NinaA est nécessaire pour l'acheminement à la surface cellulaire du récepteur

(Baker et al., 1994;Stamnes et al., 1991). La protéine NinaA, composée de 237 acides aminés, appartient à la famille des cyclophilines et possède une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase au niveau de son domaine N-term, ainsi qu'un court C-ter cytoplasmique de 7 acides aminés (Figure 8). Chez les vertébrés, une autre cyclophiline, RanBP2, joue le rôle de chaperone pour l'opsine rouge/verte (Ferreira et al., 1996). Toutefois, contrairement à NinaA, RanBP2 est une grande protéine (3224 acides aminés) qui ne possède pas de domaine transmembranaire et est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires tel l'import de protéines au noyau via les pores nucléaires (Yokoyama et al., 1995).

Les récepteurs olfactifs et ODR-4/protéine transportant les récepteurs (RTP)

Certains récepteurs olfactifs nécessitent eux aussi la présence d'une chaperone moléculaire à 1TM afin d'être acheminés correctement à la surface cellulaire. La protéine membranaire de type II, ODR-4, chez *C. Elegans* est exprimée uniquement au niveau des membranes intracellulaires des neurones chimiosensorielles et est essentielle à l'acheminement d'un R7TM, le récepteur sensible au diacétyl ODR-10, au niveau des cils des neurones (Dwyer et al., 1998). Même si aucun homologue d'ODR-4 n'existe chez les mammifères, deux protéines à 1 TM de type II appelées protéines transportant les récepteurs (RTP), RTP1 et RTP2, ont été découverte comme interagissant avec les récepteurs olfactifs des mammifères (OR) et permettant leur translocation à la membrane plasmique. RTP1 et RTP2 sont des protéines de 263 et 223 acides aminés avec un domaine transmembranaire situé près de l'extrémité C-terminale (Figure 8). De façon intéressante, non seulement RTP1 permet d'augmenter l'expression à la surface cellulaire des OR, mais les OR permettent eux aussi d'accroître la localisation à la membrane plasmique de RTP1, suggérant ainsi la possibilité d'un rôle de co-récepteur pour RTP1, en plus de son rôle de chaperone pour les OR. Toutefois, jusqu'à maintenant aucun changement dans la sélectivité des ligands, ni au niveau des voies de signalisation activées par les OR, n'a été observé en présence de RTP1 (Saito et al., 2004).

Le récepteur aux phéromones V2R et les protéines M10 du complexe majeur d'histocompatibilité

L'organe voméronasal présent chez la plupart des mammifères, joue un rôle essentiel dans la détection des phéromones, via deux familles de récepteurs à 7TM, V1R et V2R (sauf chez l'homme pour qui la présence de cet organe reste un sujet de controverse (Dulac and Torello, 2003)). La découverte de la présence au niveau de l'organe voméronasal de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), classiquement associées à la présentation d'antigènes aux cellules T du système immunitaire, a permis d'établir un lien entre la signalisation induite par les phéromones et les protéines M10 du MHC. En effet, il a été démontré que la formation d'un complexe comprenant les protéines M10 et les récepteurs V2R est requise pour le ciblage à la membrane plasmique des récepteurs (Loconto et al., 2003) et donc pour la signalisation induite par les phéromones. Ces protéines M10 possèdent un long domaine N-ter extracellulaire traditionnellement impliqué dans la présentation de peptides, un seul domaine transmembranaire et une courte queue C-ter cytoplasmique, constituant ainsi des protéines à 1 TM de type I. Il reste maintenant à déterminer si les protéines M10 peuvent aussi affecter la liaison des phéromones aux récepteurs V2R (Olson et al., 2006).

Le récepteur mélanocortine 2 (MC2R) et la protéine accessoire du récepteur de la mélanocortine 2 (MRAP)

L'insensibilité à l'ACTH, une hormone sécrétée par l'hypophyse, est une maladie génétique causée dans 25% des cas par des mutations dans le gène du récepteur pour l'ACTH, le récepteur mélanocortine 2 (MC2R). La recherche de d'autres causes génétiques pour ce syndrome a mené à la découverte d'une protéine accessoire pour le MC2R, MRAP (Metherell et al., 2005). MRAP est une protéine à 1TM de 127 acides aminés, dont la mutation peut entraîner l'insensibilité à l'ACTH. De façon surprenante, les deux topologies, type I et II, sont observées pour MRAP (Sebag and Hinkle, 2007). Lorsqu'il est exprimé en

absence de MRAP, le récepteur à 7 TM MC2R est retenu au niveau du RE. L'association de MRAP avec MC2R permet au récepteur de sortir du RE et d'être acheminé à la surface cellulaire, où il pourra ensuite lier l'ACTH et provoquer la réponse appropriée.

Les récepteurs Fz et les protéines reliées aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité 5/6 (LRP5/6)

Dans tous les exemples d'association R7TM/protéine accessoire à 1TM présentés jusqu'à maintenant, la protéine accessoire agit comme chaperone moléculaire pour le récepteur. Le cas des récepteurs Fz est différent puisque leurs protéines accessoires, les protéines reliées au récepteur des lipoprotéines de faible densité 5 et 6 (LRP5/6), agissent comme co-récepteurs en permettant l'activation d'une voie spécifique de signalisation (Tamaï et al., 2000). Les Fz sont des récepteurs pour les Wnt qui jouent un rôle essentiel dans le développement, en activant trois voies de signalisation différentes: les voies β -caténine, Ca^{2+} et de polarité cellulaire planaire. La plus étudiée des trois voies, la voie β -caténine, est la seule qui nécessite la présence de LRP5 ou LRP6 pour être activée (Semenov et al., 2001). LRP5 et LRP6 sont des protéines membranaires de type I de 1615 et 1613 acides aminés respectivement, dont la queue C-ter d'environ 200 acides aminés contient des motifs de phosphorylation ainsi qu'un domaine de liaison à l'axin. En absence de Wnt, la β -caténine est phosphorylée et ubiquitinée, ce qui provoque sa dégradation. Suite à la stimulation avec Wnt, il y a formation d'un complexe ternaire entre Wnt, le récepteur Fz et le co-récepteur LRP6. L'activation de Fz/LRP6 par Wnt entraîne alors la phosphorylation de LRP6 fournissant ainsi un site de liaison pour l'axin au niveau de la queue C-ter de LRP6. Cette association d'axin sur LRP6 provoque l'inhibition de la phosphorylation sur la β -caténine qui ne sera plus dégradée, aboutissant ainsi à l'activation de la signalisation par la β -caténine (Zeng et al., 2005). Les récepteurs Fz ne nécessitent pas la co-expression de LRP5/6 pour être localisés à la membrane plasmique (Kaykas et al., 2004), ce qui indique que ces protéines accessoires agissent uniquement comme co-

récepteur pour la voie β -caténine et non pas comme chaperone moléculaire pour les récepteurs Fz.

Le récepteur CLR et les protéines modifiant l'activité des récepteurs (RAMPs)

Les seuls exemples de protéines accessoires à 1 TM pour lesquelles un rôle clair a été démontré à la fois dans le transport à la surface cellulaire et dans la fonction des RCPGs, sont les protéines modifiant l'activité des récepteurs (RAMPs). La famille des RAMPs comprend trois membres : RAMP1, RAMP2 et RAMP3, qui possèdent tous un seul TM, un domaine N-ter extracellulaire et une courte queue C-ter intracellulaire d'une dizaine d'acides aminés. Les RAMPs ont d'abord été découvert pour leur rôle de chaperone et de co-récepteur pour le récepteur à 7TM CLR (McLatchie et al., 1998). Lorsqu'il est exprimé seul, le CLR est retenu au niveau du RE. En présence d'un des membres de la famille des RAMPs, le complexe CLR/RAMP est acheminé à la membrane plasmique où il pourra induire la signalisation appropriée. Non seulement les RAMPs sont requis pour le ciblage à la surface cellulaire du CLR, mais ils définissent aussi les propriétés pharmacologiques du récepteur. En effet, lorsqu'il est co-exprimé avec RAMP1, le CLR agit comme un récepteur pour le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), alors que ce même RCPG lie plutôt l'adrénomédulline (AM) lorsqu'il est associé à RAMP2 ou RAMP3. Ainsi les RAMPs agissent comme chaperones et comme co-récepteurs pour le CLR. D'autre part, les RAMPs constituent des protéines accessoires pour d'autres R7TM, tels que le CTR et le CaSR (Christopoulos et al., 1999; Bouschet et al., 2005). Dans le cas du CTR, les RAMPs n'agissent pas comme chaperones, mais uniquement comme co-récepteurs en modulant les propriétés pharmacologiques du CTR, qui devient un récepteur pour l'amyline (AMY) plutôt que pour la calcitonine en présence d'un des membres de la famille des RAMPs. Contrairement au CTR, dans le cas du CaSR, les RAMPs agissent comme chaperones moléculaires en permettant l'acheminement à la membrane plasmique de ce récepteur.

Comme nous venons de le voir, la grande diversité des protéines accessoires à 1 TM, ainsi que la variété d'organismes et de récepteurs auxquels elles sont rattachées, démontre l'importance de ce type d'association R7TM/protéine à 1TM. Les RAMPs étant le seul exemple connu à ce jour où la protéine accessoire agit à la fois comme chaperone et comme co-récepteur pour les RCPGs, et dont l'action intervient au niveau de plusieurs récepteurs différents, nous avons donc choisit d'étudier spécifiquement cette famille de protéine accessoire à 1 TM dans la présente thèse.

3. Les RAMPs

Les RAMPs ont été découverts en 1998, par l'équipe du Dr Steven Foord chez GlaxoSmithKline (anciennement Glaxo Wellcome), alors que les chercheurs tentaient d'identifier le récepteur pour le CGRP. La liaison du CGRP étant sensible aux analogues du GTP et entraînant l'accumulation d'AMPc, il était suggéré que ce peptide agisse via un RCPG. D'autre part, le CGRP étant un neuropeptide de la famille de la calcitonine pour laquelle le récepteur à 7TM CTR avait été identifié, il était attendu que le récepteur du CGRP soit similaire au CTR. Suite au clonage d'un récepteur orphelin homologue du CTR baptisé « récepteur similaire au récepteur de la calcitonine » (« calcitonin receptor-like receptor »; CLR), certains groupes ont rapporté l'activation de ce nouveau récepteur par le CGRP dans les cellules HEK293 (Aiyar et al., 1996). Toutefois, ces résultats étaient en contradiction avec des travaux menés par d'autres groupes sur des cellules de type COS7, selon lesquels le CLR ne serait pas activé par le CGRP (Fluhmann et al., 1995). L'ensemble de ces données a mené à l'hypothèse qu'un facteur particulier absent des cellules COS7, serait présent dans les cellules HEK293, qui conférerait la haute affinité du CGRP pour le CLR (Han et al., 1997).

C'est dans ce contexte que l'équipe du Dr Foord a utilisé une librairie d'ADN complémentaire (ADNc) provenant de la lignée cellulaire SK-N-MC, connue pour répondre au CGRP, afin de cloner une fois pour toute le gène encodant le récepteur humain pour le CGRP (McLatchie et al., 1998). Les ARN complémentaires obtenus à partir de la librairie d'ADNc ont été injectés dans des ovocytes de *Xenopus Laevis* exprimant le régulateur membranaire de la fibrose kystique (CFTR), utilisé comme reporter pour la présence d'AMPc. En présence de CGRP, un seul clone codant pour une protéine de 148 acides aminés baptisée « protéine modifiant l'activité des récepteurs-1 » (« receptor activity-modifying protein-1 »; RAMP1) a permis d'obtenir une réponse spécifique révélant une accumulation d'AMPc. De façon inattendue, cette nouvelle protéine ne représentait pas un

RCPG puisqu'elle était constituée d'un seul passage transmembranaire. D'autre part, aucune réponse au CGRP n'a pu être observée dans des cellules HEK293T ou COS7 transfectées avec RAMP1. Les auteurs ont ainsi spéculé que RAMP1 potentialiserait un récepteur au CGRP endogène présent dans les ovocytes. L'expérience de co-transfection de CLR et RAMP1 dans des cellules HEK293T a permis de valider cette hypothèse, en démontrant que RAMP1 représente un facteur nécessaire pour que le CLR agisse comme récepteur du CGRP. Certaines lignées cellulaires HEK293 contiennent du RAMP1 endogène, ce qui explique les résultats contradictoires obtenus précédemment par Aiyar *et al.* et Flühmann *et al.* Dr Foord et ses collègues ont par ailleurs démontré que lorsqu'ils sont exprimés seuls, ni CLR, ni RAMP1 ne sont présents à la surface cellulaire. L'association de ces deux protéines est requise pour leur ciblage à la membrane plasmique, expliquant ainsi les difficultés rencontrées auparavant par ceux qui avaient tenté de cloner le récepteur du CGRP. La recherche de séquences similaires à RAMP1 dans les bases de données des séquences du génome humain a permis d'identifier deux autres homologues chez l'homme, baptisés subséquentement RAMP2 et RAMP3. L'observation la plus surprenante dans cette étude demeure toutefois le fait que lorsque le CLR est associé à RAMP2 ou RAMP3, au lieu de former un récepteur pour le CGRP, le complexe agit alors comme récepteur pour l'adrénomédulline (AM), un autre peptide de la famille de la calcitonine pour lequel aucun récepteur n'avait été identifié. Ce changement de la pharmacologie d'un RCPG en fonction de la protéine accessoire avec laquelle il est co-exprimé, représentait alors un nouveau mécanisme de régulation des R7TM.

La découverte des RAMPs en combinaison avec l'oligomérisation entre les RCPGs (voir section 2.1), a ainsi amené un changement dans la façon traditionnelle de concevoir la signalisation par les R7TM, en démontrant que l'association d'un RCPG avec d'autres protéines membranaires (RCPG ou protéine accessoire à 1 TM), peut moduler l'expression et les caractéristiques de ce récepteur (Sexton et al., 2001).

3.1 Organisation structurale

Phylogénie

Trois RAMPs humains ont été clonés, RAMP1, RAMP2 et RAMP3, et des homologues ont été découverts chez plusieurs autres organismes dont les espèces non-mammifères suivantes: le coq commun *Gallus Gallus*, le poisson zèbre (zebrafish), et les poissons-ballons *Tetraodon Nigroviridis* et *Takifugu Obscurus* (Hay et al., 2006). Chez ce dernier, en plus des trois RAMPs homologues aux RAMP1, RAMP2 et RAMP3 humains, deux autres gènes codant pour des protéines baptisées RAMP4 et RAMP5 ont été identifiés (Nag et al., 2006). Cette diversité des RAMPs de *Takifugu Obscurus* n'est pas surprenante étant donné la présence de plusieurs gènes codant pour 5 formes différentes de l'adrénomédulline chez cet organisme qui exprime aussi trois récepteurs CLR différents. Toutefois, aucun homologue des RAMPs n'a été identifié à ce jour chez les espèces ne faisant pas parties de l'embranchement des chordés, tels les invertébrés *C. Elegans* ou *Drosophila*. On retrouve néanmoins un homologue du peptide CGRP, DH₃₁, et du récepteur CLR, CG17415, chez la drosophile, et de façon intéressante, il a été démontré que la co-expression de RAMP1 humain permet d'augmenter la signalisation du récepteur CG17415 suite à une stimulation par DH₃₁ (Johnson et al., 2005). Il n'est donc pas complètement exclu que la drosophile et les autres organismes non chordés utilisent eux aussi des protéines analogues aux RAMPs, dont les séquences trop divergentes n'ont pas encore permis leur identification à ce jour.

Séquence primaire et modélisation moléculaire

Les trois RAMPs humains sont constitués d'un peptide signal de 26, 42 et 27 acides aminés pour RAMP1, RAMP2 et RAMP3 respectivement, suivi d'un domaine N-ter

extracellulaire de 92 et 91 résidus pour RAMP1 et RAMP3, et 103 acides aminés pour RAMP2, d'une hélice α transmembranaire de 21 résidus et finalement d'un domaine C-ter intracellulaire de 9 acides aminés (Figure 9). Malgré cette topologie de structure similaire, il y a seulement 30% d'identité de séquence et 50% d'homologie entre RAMP1, RAMP2 et RAMP3 humain, et la région la plus conservée est le domaine transmembranaire. Il y a aussi beaucoup de variation entre les RAMPs d'une espèce à l'autre. Par exemple, RAMP2, qui est le plus variable des trois membres de cette famille, a seulement 65% d'identité de séquence entre sa forme humaine et celle exprimée chez la souris (Sexton et al., 2001).

```

RAMP1  -----MARALCRLPRRGLWLLLLAH-----LFMTTACQEAN 31
RAMP2  MASLRVERAGGPRLPRTRVGRPAAVRLLLLLGGVLPNPHEALAQPLPTTGT PGSEGGTVKN 60
RAMP3  -----METGALRRPQLLPLLLLLCG-----GCPRAGGCNETG 32
                *      ***

RAMP1  YGALLRELCLTQFQVDM EAVGETLWCDWGR TIRSYRELADCTWHMAEKLGCFWPNAEVDR 91
RAMP2  YETAV-QFCWNHYKDQMDPIEK-DWCDWAMI SRPYSTLRDCL EHF AELFDLGFENPLAER 118
RAMP3  MLERL-PLCGKAEADMMGKVDVWKKCNLSEFIVYYESEFTNCTEMEANVVG CYWENPLAQQ 91
                *      *      **      *      *      *      **

RAMP1  FFLAVHGRYFRS CPISGRAVRDPPGSILY PFIVVPITV TLLVTALV VVWQSKRTEGIV 148
RAMP2  IIFETHQIHFANCSLVQPTFSDPPEDVLLAMIIAPICLI PF LITLVVWRSKDSEAQA 175
RAMP3  FITGIHRQFFSNCTVDRVHLEDPPDEVLI PLIVI PVVLT VAMAGLVVWRSKRTDTLL 148
                *      *      *      ***      *      *      *      ***** **

```

Figure 9. Alignement de séquences de RAMP1, RAMP2 et RAMP3 humain.

Les acides aminés en bleu constituent le peptide signal et ceux en rouge représentent le domaine transmembranaire. Les résidus conservés entre les trois RAMPs sont indiqués par un astérisque.

Bien que la structure tridimensionnelle complète des RAMPs demeure non-résolue, la structure cristalline du domaine N-terminal de RAMP1 a récemment été élucidée par l'équipe du Dr Yokoyama (Kusano et al., 2008) (Figure 10A). Cette cristallographie a permis de confirmer la présence de trois hélices α au niveau du domaine N-ter de RAMP1,

tel qu'avait été suggéré auparavant par un modèle moléculaire *ab initio* (Simms et al., 2006). Toutefois, les relations structure-fonction des RAMPs demeurent encore mal comprises à ce jour, en particulier pour ce qui est du rôle joué par les différents résidus du domaine N-ter de RAMP1 dans la liaison du ligand (voir section 3.3.2).

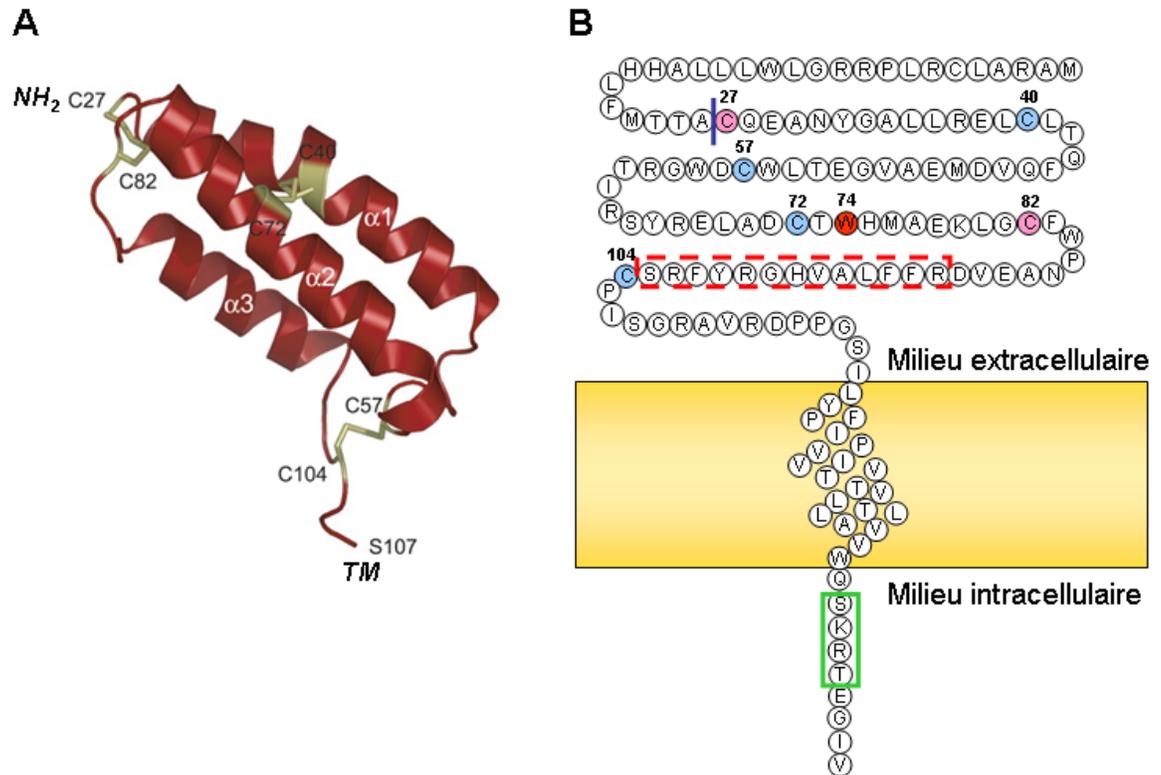


Figure 10. Représentations du RAMP1 humain.

A) Structure tridimensionnelle du domaine N-terminal du RAMP1 humain. Les ponts disulfures C27-C82, C40-C72 et C57-C104, ainsi que l'extrémité N-terminale située au niveau du résidu C27 et le domaine transmembranaire suivant le résidu S107, sont indiqués sur le schéma. Adapté de (Kusano et al., 2008). B) Représentation schématique de la séquence complète du RAMP1 humain. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une ligne bleue. Les deux résidus cystéines présents chez RAMP1 et RAMP3, mais absents chez RAMP2 sont représentés en rose, alors que les quatre résidus cystéine conservés chez les trois RAMPs sont en bleu. Une région importante pour la liaison du CGRP est encadrée par une ligne pointillée rouge. Le résidu W74 impliqué dans la liaison de l'antagoniste BIBN4096BS est représenté en rouge.

Modifications post-traductionnelles

Dans les trois RAMPs, on retrouve au niveau du domaine N-terminal quatre résidus cystéines conservés formant des ponts disulfures, et deux résidus cystéines supplémentaires sont présents chez RAMP1 et RAMP3. Des études de mutagenèse dirigée des résidus cystéines du domaine N-ter de RAMP1 ont permis de suggérer l'arrangement des ponts disulfures suivant : 1-5 (Cys²⁷-Cys⁸²; deux cystéines absentes chez RAMP2), 2-4 (Cys⁴⁰-Cys⁷²) et 3-6 (Cys⁵⁷-Cys¹⁰⁴) (Steiner et al., 2003; Simms et al., 2006) (Figure 10). Cet arrangement des ponts disulfures a par la suite été confirmé grâce à la cristallographie du domaine N-ter de RAMP1 (Kusano et al., 2008). La mutation ponctuelle d'un des quatre résidus cystéines conservés sur RAMP1 et RAMP2 entraîne une très grande diminution de l'expression à la surface cellulaire du complexe CLR/RAMP (Steiner et al., 2003; Kuwasako et al., 2003b), révélant ainsi l'importance de la formation des ponts disulfures dans l'acheminement à la membrane plasmique des RAMPs. Dans le cas de RAMP3, la mutation ponctuelle des cystéines conservées semble très peu affecter la formation d'un complexe CLR/RAMP à la membrane plasmique, quoiqu'une faible diminution de l'expression à la surface cellulaire ait tout de même été observée (Flahaut et al., 2003). Toutefois, cette dernière étude a été réalisée dans des ovocytes de *Xenopus Laevis* en utilisant l'ADNc de CLR et RAMP3 provenant de la souris, alors que les études sur RAMP1 et RAMP2 ont été effectuées dans des lignées cellulaires mammifères (HEK293T et COS-7) à partir des ADN codant pour les formes humaines de RAMP, ce qui explique possiblement les différents résultats obtenus pour RAMP3 en comparaison avec RAMP1 et RAMP2.

D'autre part, RAMP2 et RAMP3 possèdent plusieurs sites de glycosylation au niveau de leur N-ter (un pour RAMP2 et quatre pour RAMP3 humain), contrairement à RAMP1 qui ne semble pas être glycosylé. Une étude réalisée dans les ovocytes de *Xenopus Laevis* a proposé que RAMP2 et RAMP3 soient ciblés à la surface cellulaire indépendamment de la présence du CLR dû à leur glycosylation respective, et que l'ajout

de sites de glycosylation sur RAMP1 permettrait l'acheminement à la membrane plasmique de ce RAMP1 même en absence de CLR (Flahaut et al., 2002). Cependant, ces résultats obtenus à partir du CLR et des RAMPs de souris sont en contradiction avec d'autres études suggérant un acheminement à la surface cellulaire dépendant de la présence d'un récepteur partenaire pour RAMP2 et RAMP3 humain (Christopoulos et al., 2003). D'autre part, toujours à partir des ovocytes de *Xenopus Laevis*, dans cette même étude de Flahaut *et al.*, les auteurs ont observé un acheminement à la surface cellulaire du CLR indépendant de la présence des RAMPs, ce qui est en contradiction avec la découverte originale de McLatchie *et al.* (McLatchie et al., 1998), confirmée par plusieurs autres études (Kuwasako et al., 2000;Hilairret et al., 2001a;Conner et al., 2006), selon laquelle le CLR nécessite la présence des RAMPs pour être ciblé à la membrane plasmique. L'ensemble de ces données révèle donc des différences importantes dans le transport à la surface cellulaire des complexes CLR/RAMPs de souris dans les ovocytes de *Xenopus Laevis* par rapport aux CLR et RAMPs humain dans des lignées cellulaires de mammifères. Le rôle de la glycosylation de RAMP2 et RAMP3 humain reste donc à être déterminé dans un système d'expression mammifère.

Oligomérisation

Tout comme les RCPGs qui peuvent s'associer en oligomères avec d'autres récepteurs à 7TM, des évidences biochimiques ont suggéré que les RAMPs pourraient eux-aussi s'associer en homo-oligomères. En effet, suite à l'immunoprécipitation de RAMP1 ou RAMP3 à partir d'un épitope ajouté en N-terminal de ces protéines, une espèce correspondant au poids moléculaire d'un homo-dimère de RAMP a été observée (McLatchie et al., 1998;Sexton et al., 2001;Hilairret et al., 2001a). Celle-ci est sensible au dithiothreitol (DTT), suggérant que la présence de ponts disulfures intra ou intermoléculaires soit requise pour la formation d'homo-dimères de RAMP (Hilairret et al., 2001a). Toutefois, malgré le fait que ces observations soient compatible avec la formation

d'homo-oligomères de RAMP1 ou RAMP3, la présence d'une espèce correspondant au poids moléculaire d'un homo-dimère de RAMP pourrait tout aussi bien résulter de l'association du RAMP avec une protéine différente de poids moléculaire similaire, ou encore provenir de l'agrégation non-spécifique des RAMPs due à une solubilisation incomplète des membranes. Au moment de débiter cette thèse, l'interaction spécifique entre deux molécules de RAMPs restait donc à être testée dans un contexte de cellules vivantes. Dans le cas où une telle interaction serait démontrée, il apparaissait également important de déterminer sous quelle forme oligomérique les RAMPs sont-ils associés à leurs récepteurs partenaires. D'autre part, le rôle de ces associations potentielles entre plusieurs molécules de RAMP demeurerait à être investigué.

Interactions avec d'autres protéines

En plus d'interagir avec les RCPGs et de former possiblement des homo-oligomères, les RAMPs peuvent également interagir avec d'autres protéines. En effet, dans le cas de RAMP3, son interaction avec les protéines à domaines PDZ, NHERF et NSF, permet de réguler le transport vésiculaire du complexe CLR/RAMP3 suite à son activation (voir section 3.3.4). Pour ce qui est de RAMP1, une interaction a été suggérée entre cette protéine accessoire à 1TM et les protéines du cytosquelette α et β -tubuline, par le biais d'expériences de glutathione S-transférase pull-down, de criblage double-hybride en levures et de co-immunoprécipitation (Kunz et al., 2007). Toutefois le rôle de telles interactions entre RAMP1 et α/β -tubuline reste à être identifié.

3.2 Récepteurs partenaires

Les RAMPs ont été découverts initialement pour leur rôle dans la fonction du RCPG CLR. Depuis cette découverte, plusieurs autres partenaires des RAMPs ont été identifiés

(Tableau II). Tout d'abord le CTR, un récepteur proche du CLR, a été démontré comme interagissant avec les RAMPs et même si ceux-ci ne sont pas requis pour l'acheminement à la membrane plasmique de ce RCPG, cette association avec les RAMPs provoque des changements dans la pharmacologie du CTR qui devient un récepteur pour l'amyline (AMY) en présence des RAMPs plutôt que pour la calcitonine (Christopoulos et al., 1999).

D'autre part, en étudiant l'acheminement à la surface cellulaire des RAMPs, l'équipe du Dr Sexton a identifié plusieurs autres récepteurs de la même famille S que le CLR et le CTR, comme constituant des partenaires d'interaction potentiels des RAMPs (Christopoulos et al., 2003). En effet, quatre des huit nouveaux récepteurs testés ont entraînés un changement dans la distribution sub-cellulaire des RAMPs, tel que mesuré par des expériences d'immunofluorescence en suivant un épitope fusionné à la portion N-terminale des RAMPs. Contrairement aux récepteurs VPAC2, des peptides similaires au glucagon-1 et 2 (GLP-1 et GLP-2) et de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH) qui ne modifient pas la distribution sub-cellulaire des RAMPs, la co-transfection des récepteurs VPAC1, PTH1, PTH2 et glucagon provoque l'acheminement à la surface cellulaires d'au moins un des trois RAMPs. La co-expression du récepteur VPAC1 provoque la translocation des trois RAMPs à la membrane plasmique, alors que les récepteurs PTH1, PTH2 et glucagon entraînent l'acheminement à la surface cellulaire d'un seul RAMP, RAMP2 dans le cas des récepteurs PTH1 et glucagon, et RAMP3 dans le cas du PTH2R. La démonstration par immunofluorescence de l'acheminement à la surface cellulaire des RAMPs suite à la co-transfection de différents RCPGs ne représente toutefois pas une preuve directe de l'interaction entre ces récepteurs et les RAMPs. La démonstration de ces associations RCPG/RAMP par des techniques directes d'interaction protéine-protéine, tels la co-immunoprécipitation, le BRET et le FRET, ainsi que la découverte de conséquences fonctionnelles pour ces associations, seront requises avant de pouvoir affirmer que ces quatre récepteurs interagissent bel et bien avec des membranes de la famille des RAMPs. Comme dans le cas du CTR, les RAMPs ne sont pas requis pour le ciblage à la membrane plasmique des récepteurs VPAC1, PTH1, PTH2 et glucagon et donc

n'agissent pas comme chaperones pour ces récepteurs. Toutefois, dans le cas du VPAC1R, même si les RAMPs n'altèrent pas les propriétés de liaison du récepteur, il semblerait que la présence de RAMP2 induise un changement dans la signalisation du VPAC1R (voir section 3.3.3), ce qui représenterait une nouvelle conséquence fonctionnelle de l'association des RAMPs avec les RCPGs, en plus d'appuyer les résultats d'immunofluorescence suggérant une interaction entre ce RAMP et le VPAC1R.

Un seul récepteur d'une famille différente de la famille S, le CaSR, membre de la famille G, a été établi comme interagissant avec les RAMPs. L'association entre le CaSR et RAMP1 ou RAMP3, démontrée par co-immunoprécipitation, est nécessaire pour l'acheminement à la membrane plasmique du CaSR qui est retenu à l'intérieur de la cellule en absence des RAMPs. Cette fonction chaperone des RAMPs pour un RCPG d'une autre famille que la famille S, permet de poser l'hypothèse qu'un nombre beaucoup plus importants de récepteurs que ce qui a été démontré jusqu'à maintenant pourraient utiliser les RAMPs comme protéine accessoire.

	CaSR*	CLR*	CTR*	GHRHR	GLP1	GLP2	GR	PTH1R	PTH2R	VPAC1R	VPAC2R
RAMP1	X	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-
RAMP2	-	X	X	-	-	-	X	X	-	X	-
RAMP3	X	X	X	-	-	-	-	-	X	X	-

Tableau II. Interactions potentielles et confirmées entre différents RCPGs et les RAMPs.

Les récepteurs suivis d'un astérisque (CaSR, CLR et CTR) représentent ceux pour lesquels l'association avec les RAMPs a été confirmée par une technique directe d'interaction protéine-protéine, ainsi que par la démonstration d'une conséquence fonctionnelle.

Domaines impliqués dans l'interaction avec les récepteurs

Des expériences réalisées à partir de RAMP1 tronqués à différents endroits ont permis de suggérer que l'interaction entre cette protéine accessoire et son récepteur partenaire CLR implique principalement le domaine N-ter de RAMP1 et de façon secondaire, son domaine transmembranaire. Une première étude a démontré par co-immunoprécipitation que la troncation progressive du TM de RAMP1 entraîne une perte graduelle de l'interaction CLR/RAMP1, alors que l'association entre CLR et RAMP1 demeure intacte lorsque seul le domaine C-ter de RAMP1 est délété (Steiner et al., 2002). Par la suite, une seconde étude a révélé que l'abolition complète du C-ter et du TM de RAMP1 permet tout de même d'obtenir un hétéro-dimère CLR/RAMP1 capable de lier le CGRP, mais cet hétéro-dimère est instable, le domaine N-ter de RAMP1 étant sécrété dans le milieu extracellulaire (Fitzsimmons et al., 2003). Ces deux études suggèrent que le domaine C-ter n'est pas nécessaire pour l'interaction avec le CLR et qu'en plus du domaine N-ter des RAMPs, le TM serait requis pour stabiliser l'interaction avec le CLR.

3.3 Rôles

Contrairement aux différentes protéines accessoires à 1 TM qui agissent chacune à un seul endroit dans le cycle de vie des R7TM (voir section 2.2), les RAMPs régulent l'activité des RCPGs en agissant à quatre niveaux différents (Figure 11), soit tout d'abord lors de l'acheminement à la surface cellulaire des récepteurs (1), ensuite dans liaison du ligand (2), puis au niveau de l'activation des voies de signalisation (3) et finalement ils interviennent dans la régulation fine de la signalisation (internalisation et recyclage; 4) des R7TM.

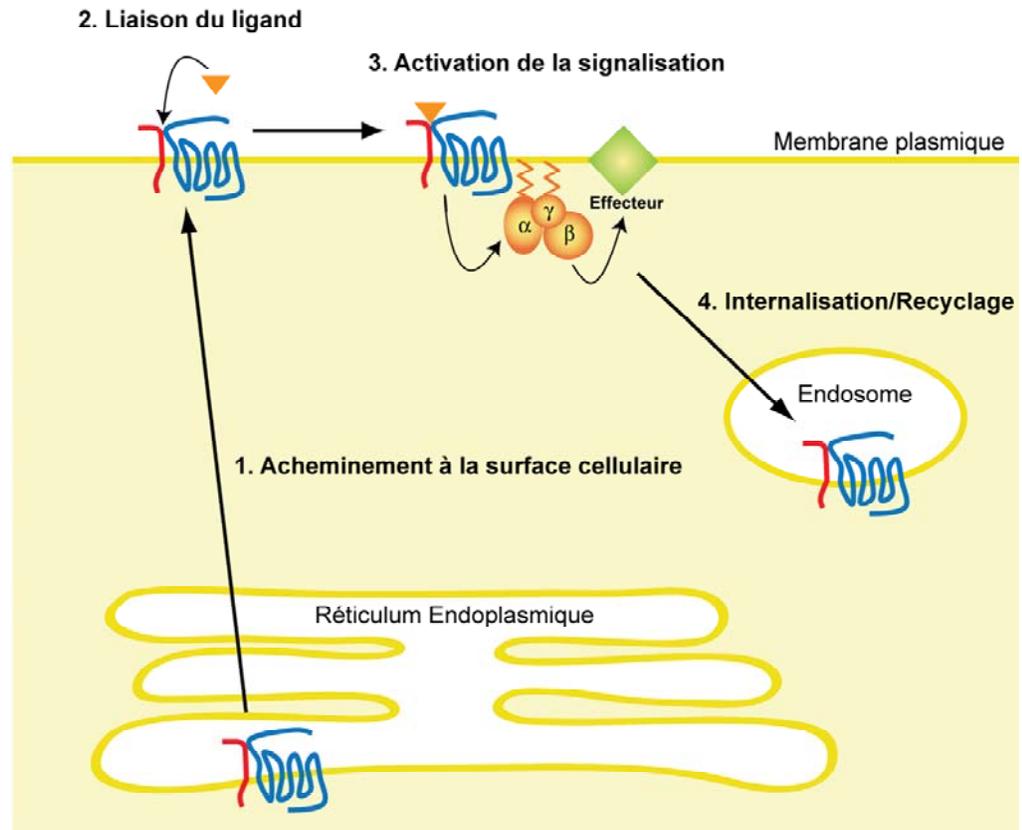


Figure 11. Rôles des RAMPs dans le cycle de vie des RCPGs.

3.3.1 Chaperone pour les récepteurs

Le récepteur CLR est retenu au niveau du RE lorsqu'il est exprimé en absence de RAMPs (Hilair et al., 2001a). La co-expression avec un des trois membres de la famille des RAMPs permet l'expression à la membrane plasmique du CLR, révélant ainsi un rôle de chaperone moléculaire pour les RAMPs, analogue à celui joué par les protéines accessoires à 1 TM NinaA, RTP, M10 et MRAP pour les R7TM rhodopsine, OR, V2R et MC2R respectivement. La présence d'un RAMP est nécessaire à la glycosylation terminale du CLR. Cette glycosylation du récepteur est importante pour son acheminement à la surface cellulaire et seule la forme complètement glycosylée du CLR peut lier le CGRP ou

l'AM (Hilairt et al., 2001b). À ce jour, aucun motif de rétention n'a été trouvé sur le CLR qui expliquerait sa localisation intracellulaire, contrairement au récepteur GABA_BR1 pour lequel un signal de rétention a été trouvé au niveau du domaine C-ter (voir section 2.1). De façon intéressante, contrairement au CLR, les autres récepteurs de la famille S qui interagissent avec les RAMPs (CTR, VPAC1R, PTH1R, PTH2R et le récepteur au glucagon) ne nécessitent pas la présence de ces protéines accessoires pour être ciblés à la membrane plasmique.

Le rôle de chaperone pour les RAMPs a par la suite été démontré pour un autre RCPG, le récepteur sensible au calcium (CaSR), qui appartient à une famille différente de récepteur, la famille G (Bouschet et al., 2005). Dans les cellules COS-7, en absence de RAMPs, le CaSR est retenu dans le RE sous une forme partiellement glycosylée. La co-transfection de RAMP1 ou RAMP3, permet la translocation du CaSR au Golgi suivi de son expression à la surface cellulaire sous une forme complètement glycosylée. L'absence d'effet de la co-transfection de RAMP2, suggère une spécificité dans l'action chaperone des RAMPs sur le CaSR. Toutefois, cette spécificité reste à être confirmée étant donné que l'expression de RAMP2 n'a pas été directement mesurée, ni comparée avec celle de RAMP1 et RAMP3 dans ces expériences, et donc l'absence de translocation du CaSR suite à la co-transfection de RAMP2 pourrait simplement être due à un problème d'expression de cette protéine accessoire. D'autre part, dans cette même étude, il a été démontré que la diminution de l'expression du RAMP1 endogène par l'utilisation d'ARN interférents dans des cellules HEK293 où le CaSR est normalement acheminé à la membrane plasmique, provoque la rétention intracellulaire de ce récepteur. En plus de démontrer que l'action des RAMPs ne se limite pas aux récepteurs membres de la famille S, ces résultats révèlent que la fonction de chaperone des RAMPs ne s'applique pas uniquement au CLR mais peut aussi jouer un rôle important dans la maturation de d'autres RCPGs. Avec le CLR, le CaSR constitue à ce jour le seul exemple de récepteur dont la maturation requiert la présence des RAMPs.

De façon intéressante, non seulement le CLR et le CaSR ont besoin d'interagir avec les RAMPs pour être acheminé vers la membrane plasmique, mais RAMP1 a lui aussi besoin de la présence d'un récepteur partenaire pour être ciblé à la surface cellulaire. Contrairement au CLR qui est retenu uniquement au niveau du RE, même s'il ne peut pas atteindre la membrane plasmique, RAMP1 peut voyager entre le RE et le Golgi en absence du CLR (Hilairt et al., 2001a). La délétion successive des acides aminés de la queue C-terminale de RAMP1 a permis d'identifier une courte séquence, SKRT (acides aminés 141 à 144), constituant le signal de rétention de RAMP1 (Steiner et al., 2002) (Figure 10B). En effet, la délétion des 8 derniers acides aminés de RAMP1 (SKRTEGIV) entraîne son export à la surface cellulaire indépendamment de la présence du CLR.

Pour ce qui est de RAMP2 et RAMP3, leur rétention intracellulaire reste un sujet de controverse. Une étude réalisée par l'équipe du Dr Sexton, a démontré que tout dépendant de l'épitope et du peptide signal ajoutés à l'extrémité N-terminale de RAMP2 et RAMP3, ceux-ci seront retenus à l'intérieur de la cellule ou exprimés à la membrane plasmique en absence d'un récepteur partenaire (Christopoulos et al., 2003). Un RAMP2 et RAMP3 possédant un épitope myc en N-ter précédé d'un peptide signal artificiel, sont exprimés à la surface cellulaire, alors que les mêmes RAMPs auxquels on a ajouté un épitope HA en N-ter après leurs peptides signaux naturels, sont retenus à l'intérieur de la cellule. Un RAMP2 et RAMP3 fusionnés à un épitope V5 au niveau C-terminal sont eux aussi localisés à l'intérieur de la cellule uniquement. Les auteurs ont conclu que l'ajout d'un peptide signal artificiel et l'utilisation de l'épitope myc sur ces deux RAMPs provoquaient leur export artificiel à la membrane plasmique. Il semblerait donc que les trois membres de la famille des RAMPs seraient retenus de façon intracellulaire en absence d'un récepteur partenaire. La confirmation de cette hypothèse nécessiterait l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la portion N-terminale des RAMPs, qui permettraient l'étude de la localisation sub-cellulaire des RAMPs endogènes. Malheureusement, il n'existe présentement aucun anticorps efficace dirigé contre les RAMPs.

Indépendamment de la localisation sub-cellulaire de RAMP2 en absence d'un récepteur partenaire, les acides aminés de la queue C-terminale de cette protéine accessoire sont nécessaires pour l'acheminement à la surface cellulaire du complexe CLR/RAMP2. En effet, la délétion des 8 derniers acides aminés de RAMP2 (SKDSEAQA) entraîne la rétention intracellulaire de ce RAMP2 même en présence de CLR. Une délétion équivalente dans RAMP3 (SKRTDTLL) n'a aucun effet sur l'acheminement à la surface du complexe CLR/RAMP3 (Kuwasako et al., 2006), alors que la même abolition au niveau du C-ter de RAMP1 provoque son export à la membrane plasmique de façon indépendante du CLR (Steiner et al., 2002). Ainsi, la délétion des 8 derniers acides aminés des divers RAMPs affecte de façon différente leur ciblage à la membrane plasmique.

3.3.2 Pharmacologie des récepteurs

Une fois localisés à la surface cellulaire, les complexes CLR/RAMP et CTR/RAMP possèdent une pharmacologie particulière, définie non seulement selon l'identité moléculaire du récepteur, mais aussi d'après celle du RAMP auquel le RCPG est associé. L'interaction du CLR et du CTR avec les différents membres de la famille des RAMPs entraîne la formation de complexes réceptoriels possédant des affinités variables pour les divers peptides de la famille de la calcitonine comprenant la calcitonine, l'AMY, le CGRP et l'AM. Le complexe CLR/RAMP1 est un récepteur de haute affinité pour le CGRP appelé CGRP1, alors que CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3 agissent comme récepteurs de haute affinité pour l'AM et sont donc baptisés respectivement AM1 et AM2 (McLatchie et al., 1998). Dans le cas du récepteur CTR, en absence des RAMPs, ce récepteur lie principalement la calcitonine, alors que suite à la co-expression d'un des membres de la famille des RAMPs, il devient un récepteur de haute affinité pour l'AMY, appelé AMY1, AMY2 et AMY3 pour CTR/RAMP1, CTR/RAMP2 et CTR/RAMP3 respectivement (Christopoulos et al., 1999; Tilakaratne et al., 2000) (Figure 12). En plus de posséder une haute affinité pour le CGRP, l'AM ou l'AMY, les différents complexes CLR/RAMP et

CTR/RAMP possèdent des affinités intermédiaires ou faibles pour les autres peptides de la famille calcitonine, ajoutant ainsi à la complexité de ce système de signalisation. La pharmacologie de ces différents complexes réceptoriels sera discutée plus en détail dans la section 4.2.3.

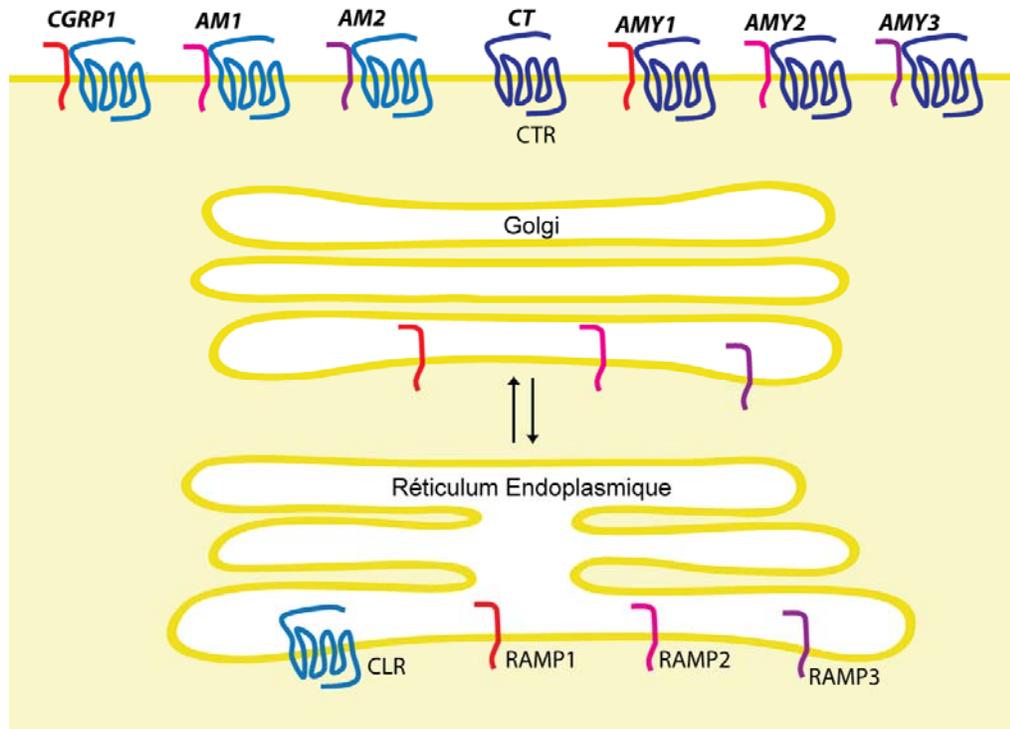


Figure 12. Pharmacologie et localisation sub-cellulaire des récepteurs CLR et CTR, et de leurs protéines accessoires RAMP1, RAMP2 et RAMP3.

En absence des RAMPs, le récepteur CLR est retenu au niveau du RE, alors que les RAMPs, qui sont eux aussi retenu à l'intérieur de la cellule, peuvent voyager du RE au Golgi en absence d'un récepteur partenaire. Le CTR quant à lui, ne nécessite pas la présence des RAMPs pour être localisé à la membrane plasmique, où il va lier son ligand, la calcitonine. Suite à la co-expression avec les RAMPs, les complexes CLR/RAMP1, CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3 localisés à la surface cellulaire forment les récepteurs pour le CGRP et l'adrénomédulline appelés CGRP1, AM1 et AM2 respectivement. Dans le cas du CTR, la co-expression avec RAMP1, RAMP2, et RAMP3 entraîne la formation des récepteurs pour l'amyline baptisés AMY1, AMY2 et AMY3.

Domaines impliqués dans la liaison des ligands

La capacité des RAMPs à moduler la pharmacologie des récepteurs avec lesquels ils interagissent implique principalement le domaine N-terminal de ces protéines accessoires. Une des premières études réalisées suite à la découverte des RAMPs a permis d'établir l'importance leur domaine N-ter dans la définition de la pharmacologie du CLR, en utilisant des RAMPs chimériques. En effet, l'échange du domaine N-ter de RAMP1 pour celui de RAMP2 entraîne la formation d'un récepteur pour l'AM, et inversement le remplacement du N-ter de RAMP2 par celui de RAMP1 permet d'obtenir un récepteur pour le CGRP en plus de conserver sa liaison à l'AM (Fraser et al., 1999), indiquant un rôle majeur pour le N-ter des RAMPs dans la pharmacologie des récepteurs.

Par la suite, une étude de délétion des différentes portions du domaine N-ter de RAMP1 a permis d'identifier les résidus 91 à 103 de RAMP1, qui correspondent essentiellement à l'hélice 3 dans la structure présentée à la Figure 10A, comme étant des déterminants clés dans l'obtention d'un récepteur CGRP1 (Kuwasako et al., 2003a). La délétion de ce segment d'acides aminés abolit complètement la liaison du CGRP au niveau du complexe CLR/RAMP1. Toutefois, lorsqu'ils sont substitués individuellement, aucun de ces résidus n'entraîne l'abolition totale de la liaison du CGRP. Une étude similaire de délétion de différents segments des N-ter de RAMP2 et RAMP3 a démontré que les acides aminés 86 à 92 de RAMP2 et la région équivalente de RAMP3 (résidus 59 à 65) sont essentiels pour la liaison de l'AM aux complexes CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3 (Kuwasako et al., 2001). Il n'y a pratiquement aucune identité de séquence dans cette région de RAMP2 et RAMP3, et la substitution individuelle de ces résidus n'entraîne aucun effet sur la production d'AMPC observée suite à la stimulation par l'AM. L'ensemble de ces résultats suggère que même si les segments d'acides aminés 91-103, 86-92 et 59-65 sur RAMP1, RAMP2 et RAMP3 respectivement, sont requis pour la liaison de haute affinité du CGRP ou de l'AM, aucun de ces résidus n'interagit directement avec le peptide. Ces segments d'acides aminés au niveau du N-ter des RAMPs auraient plutôt une

importance structurale. Jusqu'à ce jour, aucuns points de contact directs entre les RAMPs et les ligands endogènes n'ont été identifiés. La question reste donc ouverte à savoir si les RAMPs contribuent directement à la poche de liaison des peptides, ou s'ils agiraient plutôt via un effet allostérique sur la conformation du CLR, en induisant une conformation de ce RCPG requise pour la liaison du ligand. Afin de déterminer si les RAMPs se trouvent à proximité du site de liaison du ligand, des expériences de réticulation du CGRP et de l'AM au niveau des complexes CLR/RAMPs ont été réalisées (McLatchie et al., 1998;Hilair et al., 2001b). Dans ce type d'expérience, les cellules sont d'abord incubées en présence du ligand radio-marqué et de l'agent de réticulation, et suite à l'immunoprécipitation du CLR suivi d'un « Western Blot », les différentes espèces associées au CGRP ou à l'AM radio-marqué sont révélées par autoradiographie. De façon intéressante, cette approche a permis de démontrer la réticulation du CGRP et de l'AM au niveau de RAMP1, RAMP2 et RAMP3 dans les différents complexes réceptoriels CLR/RAMP, ce qui, sans prouver l'interaction directe entre les RAMPs et les ligands, indique que ces co-récepteurs se trouvent tout du moins à proximité de la poche de liaison des peptides.

Malgré les difficultés à identifier des résidus des RAMPs impliqués dans un contact direct avec le CGRP ou l'AM, dans le cas de l'antagoniste artificiel non-peptidique BIBN4096BS du récepteur CGRP1, un résidu unique de RAMP1 est responsable pour la liaison de cet antagoniste au complexe CLR/RAMP1. Le composé BIBN4096BS possède une affinité 100 fois plus grande pour la forme humaine de RAMP1 que celle du rat et à partir de cette différence, des études de mutagenèses dirigées ont permis d'identifier le résidu W74 du N-ter de RAMP1 humain comme celui responsable pour la liaison de haute affinité du BIBN4096BS au CLR/RAMP1 humain (Figure 10) (Mallee et al., 2002).

En plus du domaine N-ter de RAMP1 qui joue un rôle prépondérant dans la liaison des ligands, deux études ont établi que même si le TM de cette protéine accessoire n'est pas essentiel pour l'obtention d'un récepteur liant le CGRP, il est requis pour l'interaction stable avec le CLR et la haute affinité du complexe pour le CGRP (Steiner et al., 2002;Fitzsimmons et al., 2003). Dans l'article de Steiner *et al.*, les auteurs ont démontré

que la délétion du domaine C-ter de RAMP1 n'a que très peu d'effet sur la pharmacologie du récepteur, alors que la troncation graduelle du TM entraîne une diminution progressive de la liaison au CGRP de même qu'une perte graduelle de l'interaction CLR/RAMP1 (Steiner et al., 2002). Fitzsimmons *et al.* quant à eux ont observé que non seulement la troncation du C-ter n'a aucune conséquence sur la pharmacologie et la signalisation du complexe CLR/RAMP1, mais que l'abolition complète du C-ter et du TM de RAMP1 permet malgré tout d'obtenir un hétéro-dimère CLR/RAMP1 capable de lier le CGRP. Toutefois cet hétéro-dimère est instable et l'affinité du CGRP pour ce complexe CLR/N-ter de RAMP1 est réduite de façon importante (4000 fois). Le remplacement du C-ter et du TM de RAMP1 par ceux du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGH) permet d'obtenir un récepteur pour le CGRP dont l'affinité est réduite de 10 fois (Fitzsimmons et al., 2003). Les résultats de ces deux études ont permis à leurs auteurs de proposer que le domaine principal de RAMP1 impliqué dans la liaison du CGRP et l'activation subséquente de la signalisation est le domaine N-terminal. Le domaine C-ter de RAMP1 quant à lui n'est pas requis pour l'activation du complexe CLR/RAMP1. Pour ce qui est du passage transmembranaire, la présence d'un domaine TM serait nécessaire à l'obtention d'un récepteur de haute affinité pour le CGRP, mais sa séquence n'aurait que peu d'importance, suggérant une fonction structurale plutôt qu'un rôle intrinsèque pour le TM de RAMP1 dans la liaison du CGRP.

Contrairement au CLR, pour lequel le domaine C-terminal des RAMPs semble peu important pour la pharmacologie et la signalisation du complexe récepteuriel (Steiner et al., 2002; Fitzsimmons et al., 2003), dans le cas du CTR, le C-ter des RAMPs serait requis pour la fonction des complexes CTR/RAMPs. Effectivement, des changements de profil de liaison et de signalisation des différents peptides aux complexes CTR/RAMPs mesurés suite à l'échange des domaines C-ter de RAMP1 et de RAMP2, et à la troncation du C-ter des RAMPs (Udawela et al., 2006b; Udawela et al., 2006a), suggèrent un rôle pour le C-ter des RAMPs dans la signalisation du CTR. Ainsi, dépendamment du récepteur impliqué,

CLR ou CTR, les domaines des RAMPs nécessaires pour leur fonction de co-récepteur seront différents.

3.3.3 Régulation de la signalisation par les récepteurs

Outre la modification des propriétés de liaison des récepteurs, les RAMPs influencent aussi les voies de signalisation activées suite à la stimulation des récepteurs par leurs ligands. Cette conséquence fonctionnelle des RAMPs a été démontrée dans le cas particulier du récepteur VPAC1, qui suite à son couplage à différentes protéines G, entraîne l'accumulation d'AMPc et l'hydrolyse du phosphatidylinositol (PI). Ce récepteur provoque la translocation des trois RAMPs à la membrane plasmique, mais aucun changement dans la pharmacologie du VPAC1R n'a été observé en présence de ces protéines accessoires. Toutefois, une augmentation spécifique de l'hydrolyse du PI induite suite à la stimulation du VPAC1R a été détectée en présence de RAMP2, alors que l'accumulation d'AMPc mesurée dans les mêmes conditions est demeurée inchangée (Christopoulos et al., 2003). Cet effet est propre à RAMP2 étant donné que la co-expression de RAMP1 ou RAMP3 n'a entraîné aucune modification de la signalisation du VPAC1R. Ces résultats suggèrent que l'association spécifique du VPAC1R avec RAMP2 altère l'efficacité de couplage de ce récepteur à différentes voies de signalisation.

3.3.4 Régulation négative des récepteurs

En plus de moduler le ciblage à la surface cellulaire, la pharmacologie et la signalisation des RCPGs, les RAMPs peuvent aussi réguler le transport vésiculaire des récepteurs une fois activés. Suite à une incubation avec l'agoniste, le récepteur CLR et son co-récepteur RAMP sont désensibilisés et internalisés ensemble via les puits tapissés de clathrine sous forme d'un complexe ternaire impliquant le CLR, le RAMP et la β -arrestine.

Le complexe CLR/RAMP internalisé est ensuite ciblé pour la dégradation (récepteur de classe B; voir section 1.3.3) (Kuwasako et al., 2000; Hilaiet et al., 2001a).

Le transport des RCPGs suite à leur stimulation avec un agoniste peut être influencé par leur interaction avec diverses protéines, notamment les protéines à domaines PDZ (domaine semblable à la protéine de densité synaptique-95/Discs-large/ZO-1). Les quatre derniers acides aminés de la queue C-terminale de RAMP3, DTLL, constitue un motif de liaison au domaine PDZ, qui n'est pas présent chez RAMP1 ni RAMP2. Il a été démontré que ce motif DTLL de RAMP3 permet l'interaction de cette protéine accessoire avec les protéines à domaines PDZ appelées facteur de régulation de l'échange $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHERF) et facteur sensible au N-éthylmaléimide (NSF), qui vont moduler l'internalisation et le recyclage du complexe CLR/RAMP3. En présence de NHERF, même si le récepteur AM2 est désensibilisé suite à sa stimulation avec l'AM, l'internalisation du complexe CLR/RAMP3 est bloquée (Bomberger et al., 2005b). NSF, quant à elle, a pour effet de cibler le complexe CLR/RAMP3 au recyclage plutôt qu'à la dégradation suite à son internalisation (Bomberger et al., 2005a) (Figure 13). Ainsi, la protéine accessoire RAMP3 peut altérer le transport du CLR suite à son activation, en s'associant avec des protéines à domaines PDZ. Cette autre fonction des RAMPs illustre aussi une différence fonctionnelle entre les récepteurs AM1 et AM2, très similaire au point de vue pharmacologique (les complexes CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3 possédant tous les deux une haute affinité pour l'AM), mais différent au niveau du transport vésiculaire suivant la stimulation, RAMP2 ne possédant pas de motif de liaison au domaine PDZ.

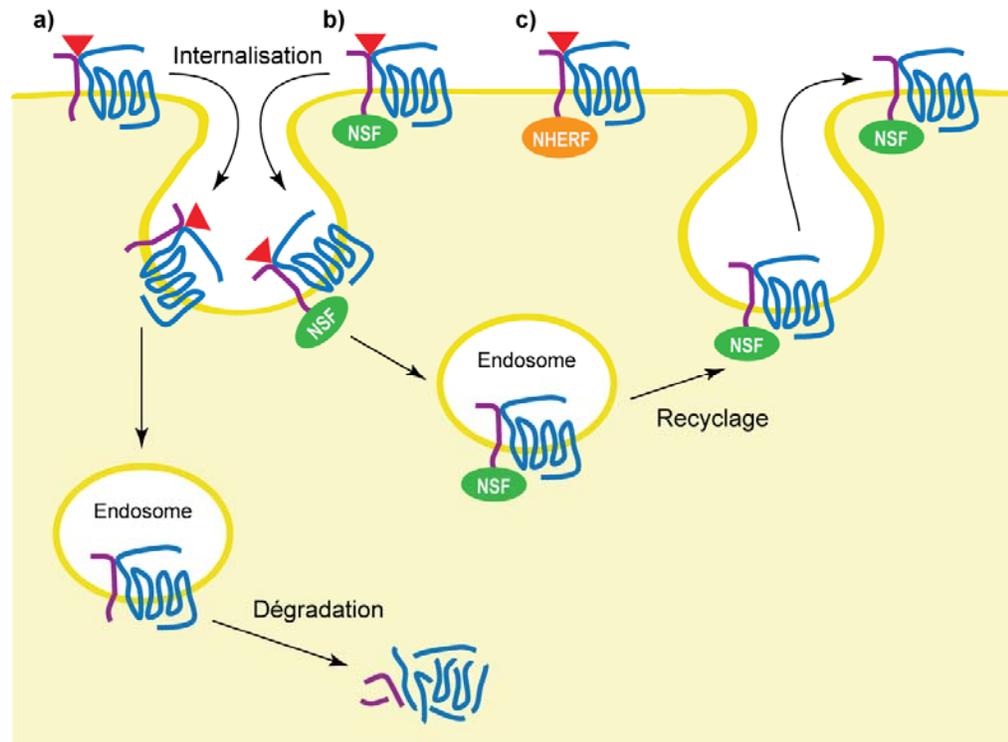


Figure 13. Ciblage du récepteur AM2 suite à son activation.

a) En absence de NHERF et de NSF, le complexe CLR/RAMP3, tout comme CLR/RAMP1 et CLR/RAMP2, est internalisé dans les puits tapissés de clathrine puis ciblé pour la dégradation suite à sa stimulation avec l'agoniste. b) En présence de NSF, le complexe CLR/RAMP3 internalisé suite à son activation par l'AM est recyclé à la membrane plasmique plutôt que dégradé. c) En présence de NHERF, la stimulation avec l'agoniste ne provoque pas l'internalisation du récepteur AM2.

3.4 Distribution tissulaire et importance physiologique

Distribution tissulaire

Les RAMPs possèdent une distribution ubiquitaire, avec au moins un des trois membres de cette famille de protéine exprimé dans chaque tissu ou lignée cellulaire étudiés jusqu'à ce jour (Hay et al., 2006). Entre autre, la présence de RAMP1 a été détectée au niveau du cœur, de l'utérus, du cerveau, du pancréas, des poumons, du muscle squelettique et du système gastro-intestinal. De façon intéressante, l'expression des RAMPs dans des endroits tels le cortex ou l'hippocampe, qui ne contiennent ni CLR ni CTR, renforce les résultats obtenus sur les autres récepteurs de la famille S et le CaSR suggérant un rôle beaucoup plus vaste pour les RAMPs que ce qui avait été initialement proposé comme co-récepteurs pour le CLR et le CTR. Toutefois, ces données proviennent de l'analyse d'ARNm étant donné l'absence d'anticorps spécifique de haute affinité dirigés contre les RAMPs, et donc le niveau d'expression réel de ces protéines accessoires dans les différents tissus reste à être déterminé.

Importance physiologique

Les souris knock-out pour RAMP1, RAMP2 et RAMP3 ont permis de confirmer l'importance de cette famille de protéine dans diverses fonctions physiologiques. Le CGRP étant un puissant vasodilatateur, il n'est pas surprenant que les souris dont l'expression de RAMP1 a été abolie présentent une élévation de la pression sanguine. De façon intéressante, ces souris démontrent aussi une production de cytokines pro-inflammatoires dérégulée (Tsujikawa et al., 2007). Alors que le knock-out pour RAMP2 n'est pas viable, les souris knock-out pour RAMP3 démontrent quant à elles une apparence normale jusqu'à un âge avancé, à partir duquel leur poids est diminué. De plus, les souris avec une

expression réduite de RAMP2 (hétérozygotes) montrent une diminution marquée de la fertilité. Ce phénotype très différent pour les knock-out de RAMP2 et RAMP3 indique que bien que ces protéines permettent toutes deux la formation de récepteurs pour l'AM et l'AMY, elles possèdent des fonctions physiologiques distinctes à différentes périodes de la vie. Tout comme le CGRP, l'AM est un très puissant vasodilatateur. Néanmoins, aucun effet sur la pression sanguine n'a été observé chez les souris dont l'expression de RAMP2 ou RAMP3 a été réduite ou abolie (Dackor et al., 2007).

De façon intéressante, plusieurs études ont démontré que le niveau d'expression des différents RAMPs varie en fonction de diverses conditions patho-physiologiques (voir les revues (Udawela et al., 2004) et (Hay et al., 2006)). Ces études indiquent que l'expression des RAMPs n'est pas statique et que durant diverses conditions pathologiques telles que l'hypertension et le diabète, suite au traitement avec différents médicaments ou durant la grossesse, les quantités de RAMPs exprimées sont sujettes à une régulation fine. Ces données révèlent une fois de plus l'importance de cette famille de protéine au niveau physiologique.

4. Le récepteur similaire au récepteur de la calcitonine (CLR) en tant que modèle d'étude

Afin d'étudier l'assemblage oligomérique des RCPGs avec les RAMPs, un récepteur modèle a été utilisé, le CLR, qui représente le R7TM pour lequel les conséquences fonctionnelles de son association avec les RAMPs ont été les mieux caractérisées.

4.1 Les ligands : les peptides de la famille de la calcitonine

Le CLR agit comme récepteur pour le CGRP, l'AM et l'interméline (IMD), qui constituent divers peptides de la famille de la calcitonine. En plus de ces trois membres et de la calcitonine, cette famille comprend aussi l'AMY. Les peptides de la famille de la calcitonine ont en commun la présence d'un C-terminal amidé ainsi qu'une structure tertiaire conservée, constituée d'un anneau de 6 ou 7 acides aminés liés par un pont disulfure en N-ter (Figure 14). La délétion des résidus formant cette structure en anneau entraîne la formation d'antagoniste compétitif pour la forme sauvage des peptides.

α CGRP	AC-DTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNEFVPTNVGSKAF-NH ₂	37
AMY	KC-NTATCATQRLANFLVHSSNNEGAILSSSTNVGSNTY-NH ₂	37
CT	CGNLSTCMLGTYTQDFNKEHTE-----PQTAIGVGAP-NH ₂	32
AM	YRQSMNNEQGLRSFGC-RFGCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNV-APRSKISSPQGY-NH ₂	52
IMD	TQAQLLRVGC-VLGTQVQNLSHRLWQLMGPAQRQDSAPVDPSSPHSY-NH ₂	47
	* **	

Figure 14. Alignement de séquences de l' α CGRP, AMY, CT, AM et IMD humain.

Les acides aminés en rouge représentent les deux cystéines conservées qui forment le pont disulfure donnant lieu à la structure en anneau. L'extrémité C-terminale amidée est indiquée en bleu. Les résidus conservés entre les cinq peptides sont indiqués par un astérisque.

Les ligands du CLR, le CGRP, l'AM et l'IMD, possèdent différentes fonctions biologiques. Plus précisément, le CGRP qui est exprimé essentiellement au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, possède une importante activité vasodilatatrice ainsi que des effets chronotropique direct et ionotropique indirect sur le cœur. Les deux homologues α - et β -CGRP, qui diffèrent uniquement au niveau de trois acides aminés, démontrent des effets biologiques similaires. L'action vasodilatatrice du CGRP joue un rôle important dans le développement des migraines, ainsi il a été démontré que l'utilisation d'agents antagonistes du CGRP représente une avenue intéressante pour le traitement de cette pathologie (Doods et al., 2007). L'AM, constituée de 52 acides aminés, est sécrétée au niveau de nombreux organes et tissus périphériques et possède elle aussi une forte activité vasodilatatrice, en plus de promouvoir la prolifération cellulaire et de jouer un rôle dans la modulation de la douleur (Ma et al., 2006). De façon similaire au CGRP et à l'AM, le dernier peptide identifié de cette famille, l'IMD, influence la circulation sanguine et la contractilité cardiaque en agissant comme un puissant vasodilatateur (Bell and McDermott, 2008).

4.2 Le récepteur CLR

4.2.1 Distribution tissulaire et importance physiologique

Le CLR est principalement exprimé au niveau des poumons, du cœur et des reins (Fluhmann et al., 1995), des endroits qui présentent à la fois des sites de liaison au CGRP et à l'AM. Par ailleurs, les souris knock out pour le CLR ont permis de confirmer l'importance physiologique de ce récepteur, étant donné que comme dans le cas des gènes codant pour RAMP2 et pour l'AM (Dackor et al., 2007; Caron and Smithies, 2001), la délétion du gène codant pour CLR est létale au stade embryonnaire. Il semblerait que la signalisation induite par l'AM via le complexe CLR/RAMP2 soit essentielle au développement embryonnaire du système cardiovasculaire (Dackor et al., 2006).

4.2.2 Organisation structurale

Le CLR est constitué de 461 acides aminés et possède 54% d'identité de séquence avec le CTR, son plus proche parent. On retrouve au niveau du domaine N-ter du CLR plusieurs résidus cystéines conservées, qui constituent une caractéristique des récepteurs de la famille S. D'autre part, trois sites de N-glycosylations potentiels sont présents dans le N-ter de ce récepteur (Figure 15). Comme il a été mentionné dans la section 3.3.1, cette glycosylation du CLR, induite suite à son association avec un des membres de la famille des RAMPs, est nécessaire pour son acheminement à la surface cellulaire ainsi que pour sa liaison au CGRP et à l'AM (Gujer et al., 2001; Hilairet et al., 2001b).

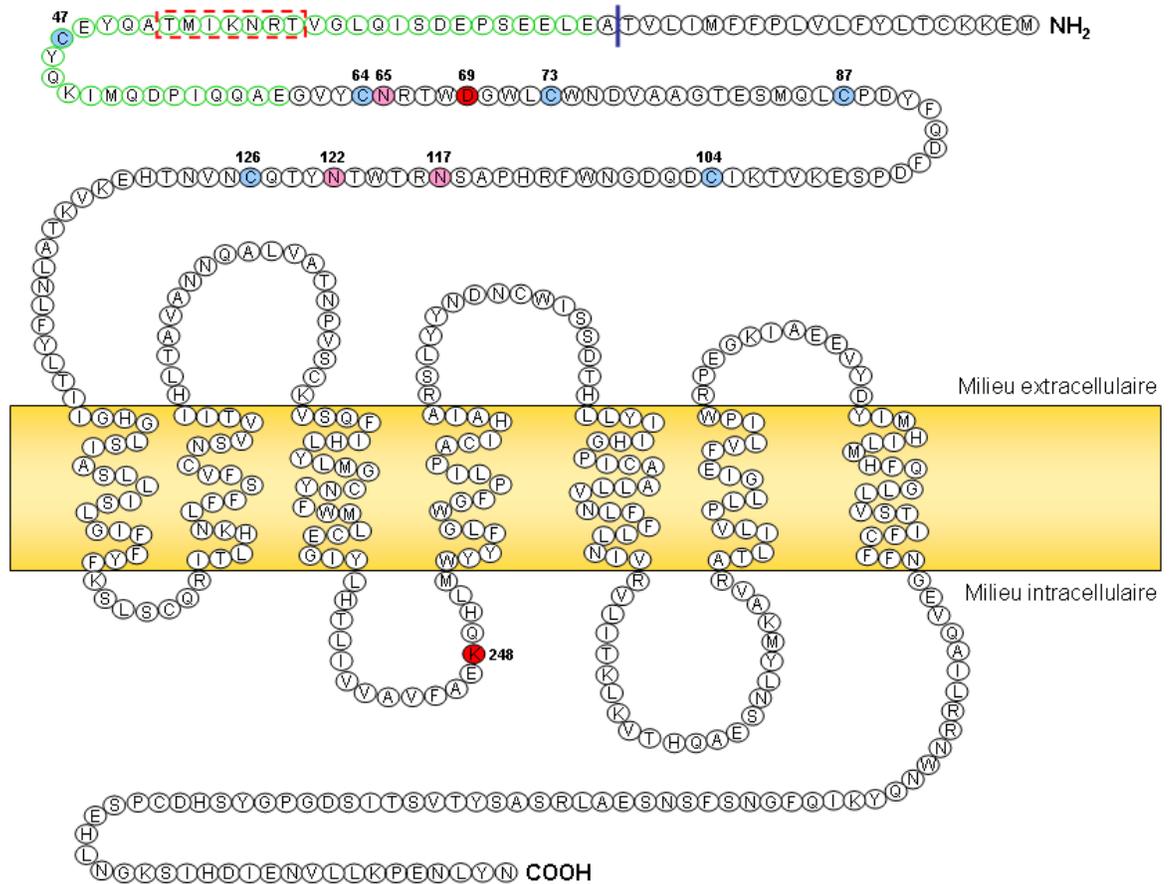


Figure 15. Représentation schématique de la séquence du CLR humain.

Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une ligne bleue. Les résidus cystéines conservés, caractéristiques des récepteurs de la famille S, sont représentés en bleu alors que les sites consensus de N-glycosylation sont indiqués en rose. Les résidus du CLR de souris impliqués dans l'interaction avec les RAMPs sont encadrés en vert. Une région importante pour la liaison spécifique de l'AM au CLR de souris est encadrée par une ligne pointillée rouge. Les résidus D69 et K248 impliqués respectivement dans la liaison des ligands et dans l'activation de la signalisation sont représentés en rouge.

Comme il a été discuté en détail dans la section 3, le CLR s'associe en hétéro-oligomère avec les RAMPs. Cette association implique le domaine N-ter du récepteur. En effet, il a été démontré à partir de récepteurs chimériques entre le CLR et le PTH1R de souris (PTH1R n'interagit pas avec RAMP1; voir Tableau II) que les acides aminés 22 à 60 du N-ter du CLR de souris sont requis pour l'association avec le RAMP1 de souris. La substitution de ce segment d'acides aminés du PTH1R par ceux du CLR entraîne la formation d'un récepteur PTH1R qui interagit avec RAMP1 (Ittner et al., 2005). Il reste maintenant à déterminer si les résidus équivalents du CLR humain sont eux aussi importants pour l'association du récepteur avec les RAMPs. De façon intéressante, ce segment d'acides aminés renferme une grande identité de séquence entre la forme humaine et souris du CLR (79% d'identité de séquence).

En plus de former des hétéro-oligomères obligatoires avec les protéines à 1TM RAMPs, la question de savoir si le CLR pourrait aussi former des oligomères avec d'autres R7TM demeurerait en suspens au moment où cette thèse a débuté. Par ailleurs, alors que l'oligomérisation des RCPGs des familles R et G a été abondamment étudiée (section 2.1 de l'introduction), au moment où ce projet de recherche a été amorcé, très peu de publications traitaient des interactions entre les récepteurs de la famille S. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons voulu tester le potentiel d'homo-oligomérisation d'un récepteur membre de la famille S, le CLR, qui est un cas particulier, puisqu'il s'agit du seul RCPG connu nécessitant la présence des RAMPs pour être actif. De façon intéressante, à partir d'expériences de réticulation d'un CGRP radio-marqué sur des cellules exprimant CLR et RAMP1, le seul complexe obtenu liant le peptide marqué correspond au poids moléculaire d'un seul CLR en association avec une seule molécule de RAMP1, suggérant que le complexe CLR/RAMP1 lie le CGRP sous une forme hétéro-dimérique, non-associée avec d'autres RCPGs (Hilaret et al., 2001b). Toutefois, ces études ne permettent pas d'éliminer la formation de plus grand complexes, qui comprendraient par exemple plusieurs molécules de CLR, pour lesquels l'absence de lysines à proximités les unes des autres empêcherait la

réticulation. Ainsi, il restait donc à déterminer sous quelle forme oligomérique le CLR interagit avec le RAMP et le ligand.

4.2.3 Pharmacologie et signalisation

En plus de lier avec une haute affinité le CGRP dans le cas du complexe CLR/RAMP1 et l'AM dans le cas des complexes CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3, les différents assemblages CLR/RAMP démontrent aussi une certaine affinité pour les autres peptides de la famille de la calcitonine (Tableau III). Notamment, même s'il lie préférentiellement l'AM, le complexe CLR/RAMP3 possède une affinité non négligeable pour le CGRP, alors que le complexe CLR/RAMP2 ne démontre qu'une très faible affinité pour ce dernier peptide (Hay et al., 2006). D'autre part, les trois complexes CLR/RAMP induisent une accumulation d'AMPc suite à une stimulation par l'IMD avec une puissance similaire dans les trois cas, plus faible que celle du CGRP pour CLR/RAMP1 et de l'AM pour CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3 (Roh et al., 2004).

Récepteurs		CGRP1	AM1	AM2
Composition moléculaire		CLR/ RAMP1	CLR/ RAMP2	CLR/ RAMP3
Agonistes:	CGRP	10.11	—	6.67
	AM	8.42	8.80	9.21
	AMY	6.63	—	—
Antagonistes:	BIBN4096BS	10.04	< 5	< 5
	CGRP₈₋₃₇	9.34	7.04	6.95

Tableau III. Pharmacologie du récepteur CLR.

Tableau des puissances des agonistes (pEC_{50}) et antagonistes (pA_2/pK_B) pour les différents complexes CLR/RAMP obtenues à partir d'études réalisées dans des cellules COS7. Le pEC_{50} , qui est le logarithme négatif de l' EC_{50} , reflète la puissance de l'agoniste pour le récepteur. Plus le pEC_{50} est élevé, plus l'agoniste est puissant. Le pA_2 quant à lui, est défini comme le logarithme négatif de la concentration de l'antagoniste qui nécessite le doublement de la concentration de l'agoniste pour obtenir le même effet. Plus le pA_2 est élevé, plus l'antagoniste est puissant. Le pK_B est le logarithme négatif du K_B , qui est la constante de dissociation de l'antagoniste. Adapté de (Hay, 2007).

Bien avant la découverte des RAMPs, une hétérogénéité dans les récepteurs pour le CGRP avait été observée à partir d'études réalisées sur différents tissus répondant à ce peptide, en utilisant divers analogues du CGRP (Dennis et al., 1989; Dennis et al., 1990). Notamment, l'observation de populations de récepteurs au CGRP répondant ou non à l'antagoniste CGRP₈₋₃₇ a mené à la sub-classification de ces récepteurs en deux sous-types. Les récepteurs CGRP1, sensibles au CGRP₈₋₃₇, ($pA_2 > 7$), dont la composition moléculaire est connue comme étant CLR/RAMP1, et les récepteurs CGRP2, insensibles au CGRP₈₋₃₇ ($pA_2 < 7$), dont la composition moléculaire reste inconnue. Selon les plus récentes hypothèses concernant l'identité moléculaire de ces récepteurs insensibles au CGRP₈₋₃₇, la pharmacologie associée aux récepteurs CGRP2 proviendrait en réalité d'un amalgame des

autres récepteurs différents du complexe CLR/RAMP1 qui répondent au CGRP, tels que les récepteurs AM2 (CLR/RAMP3) et AMY1 (CTR/RAMP1) (Tableau III). Ainsi, il n'existerait pas de récepteurs CGRP2 à proprement dit (Hay, 2007). De façon intéressante, une hétérogénéité dans la réponse à un autre antagoniste du récepteur CGRP développé plus récemment pour le traitement des migraines, le BIBN4096BS, a aussi été observée (Wu et al., 2000), révélant une fois de plus la complexité de la pharmacologie associée aux différents récepteurs des peptides de la famille de la calcitonine.

La liaison des différents peptides sur le CLR implique principalement le domaine N-ter de ce récepteur. Notamment, l'extrémité N-ter du CLR joue un rôle particulièrement important dans la liaison de l'AM, mais n'est pas requise pour l'interaction avec le CGRP (Koller et al., 2004; Koller et al., 2002). Par exemple, un CLR de souris dont les résidus 36 à 42 ont été délétés démontre toujours une réponse au CGRP, mais a perdu sa capacité de liaison à l'AM. D'autre part, la mutation du résidu N122 dans le N-ter du CLR a permis de suggérer que même si cet acide aminé représente un site potentiel de glycosylation, celui-ci n'est normalement pas glycosylé, mais essentiel pour la liaison du CGRP et de l'AM (Gujer et al., 2001). Finalement, toujours au niveau du N-ter du CLR, le résidu D69 qui est conservé chez de nombreux récepteurs de la famille S, est nécessaire pour l'interaction du récepteur avec le CGRP et l'AM (Ittner et al., 2004).

Suite à la liaison du CGRP ou de l'AM sur le CLR, la protéine Gs est activée ce qui entraîne la production intracellulaire d'AMPc. Le résidu K248 situé dans la 2^e boucle intracellulaire du CLR est requis pour l'activation de cette voie de signalisation (Conner et al., 2006). Par ailleurs, cette production d'AMPc induite par la présence de CGRP ou de l'AM nécessite non seulement l'interaction du CLR avec les RAMPs, mais aussi l'association du complexe CLR/RAMP avec une troisième protéine baptisée « protéine composante du récepteur du CGRP » (calcitonin-gene related peptide receptor component protein; RCP). RCP est une protéine cytoplasmique de 148 acides aminés découverte en 1996 lors du criblage d'une banque d'ADNc pour identifier le récepteur au CGRP (Luebke et al., 1996). Des études de co-immunoprécipitation ainsi que l'utilisation d'ARN antisens

ont permis de suggérer un modèle selon lequel RCP ne serait pas requis pour la liaison des peptides au niveau des complexes CLR/RAMP, mais serait essentiel pour l'activation de la signalisation par Gs suite à l'interaction du CGRP ou de l'AM avec les complexes CLR/RAMP (Evans et al., 2000). Étrangement, la protéine RCP a aussi été identifiée par spectrométrie de masse dans une préparation purifiée d'ARN polymérase III humaine et son homologue chez la levure constitue clairement une sous-unité de l'ARN polymérase III. Ainsi, outre son implication dans la signalisation des complexes CLR/RAMP, RCP jouerait un rôle dans la transcription (Siaut et al., 2003). Ce double rôle pour RCP est intrigant et des études plus approfondies seront requises afin d'établir de façon claire le rôle de la protéine RCP *in vivo*.

En plus d'être couplé à la protéine Gs, le CLR interagit aussi avec la protéine Gi, ainsi l'accumulation d'AMPc observée suite à la stimulation par les différents ligands reflète la balance entre l'activation et l'inhibition de l'adénylate cyclase induites via les protéines Gs et Gi (Main et al., 1998). D'autre part, une augmentation de la concentration cytoplasmique du calcium a aussi été observée suite à la stimulation par le CGRP ou l'AM de cellules HEK co-exprimant le CLR et les RAMPs (Kuwasako et al., 2000). Cette élévation du calcium intracellulaire proviendrait soit de l'activation de la protéine Gq par le CLR, soit des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine Gi.

Suite à la stimulation avec l'agoniste, le CLR est phosphorylé, ce qui entraîne le recrutement de la β -arrestine suivi de l'internalisation du complexe ternaire formé entre le CLR, le RAMP et la β -arrestine, via les puits tapissés de clathrine. L'interaction de haute affinité soutenue entre le CLR et la β -arrestine permet de classer ce récepteur dans la classe B des RCPGs (section 1.3.3) (Hilairt et al., 2001a). Suite à l'internalisation, le ciblage du complexe CLR/RAMP vers la dégradation ou le recyclage à la membrane plasmique dépend de la nature du stimulus. En effet, après à une stimulation soutenue avec le CGRP (10^{-7} M, >2 heures), le complexe CLR/RAMP1 est envoyé aux lysosomes, où il sera dégradé via un mécanisme indépendant de l'ubiquitination. De façon intrigante,

RAMP1 est dégradé 4 fois plus rapidement que le CLR (Cottrell et al., 2007). Au contraire, suite à une stimulation transitoire avec le CGRP (10^{-7} M, 1 heure), la dégradation de l'agoniste lié au récepteur par l'enzyme convertissant l'endotheline-1 (ECE-1) au niveau des endosomes, provoque le détachement de la β -arrestine du complexe CLR/RAMP1, ce qui permet le recyclage du récepteur CGRP1 à la membrane plasmique (Padilla et al., 2007).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de cette thèse consiste à étudier l'assemblage des oligomères formés entre certains RCPGs et les RAMPs, en utilisant le récepteur CLR comme modèle d'étude.

Objectifs spécifiques :

- 1) Étudier la formation d'homo-oligomères de CLR et de RAMP1, ainsi que l'assemblage en hétéro-oligomères CLR/RAMP1.
- 2) Étudier la stœchiométrie d'interaction entre CLR et RAMP1 en développant une approche permettant l'étude d'interactions entre trois protéines dans les cellules vivantes.

RÉSULTATS

Article 1

Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET.

Madeleine Héroux, Billy Breton, Mireille Hogue et Michel Bouvier. *Biochemistry* 46: 7022 (2007).

L'association des RCPGs avec les différentes GIP, dont les protéines G hétéro-trimériques, les protéines impliquées dans la signalisation indépendante des protéines G, les autres récepteurs et les protéines accessoires à 1TM, est primordiale à la communication cellulaire avec le milieu environnant. Toutefois, jusqu'à présent très peu d'études ont tentés d'établir des liens entre tous ces différents types d'interaction dans lesquels sont impliqués les RCPGs. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à la relation entre l'assemblage homo-oligomérique entre les RCPGs, l'association avec des protéines accessoires à 1 TM et l'interaction avec les protéines de signalisation, en utilisant le récepteur CLR comme modèle d'étude.

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer les résultats indiquant que le récepteur CLR interagit avec la protéine accessoire RAMP1, dans un contexte de cellules vivantes, puisque jusqu'à ce jour, toutes les études rapportant une association directe entre CLR et RAMP1 avaient été réalisées suite à la solubilisation des protéines (McLatchie et al., 1998;Leuthauser et al., 2000;Gujer et al., 2001;Steiner et al., 2002;Flahaut et al., 2002;Hilairret et al., 2001a;Koller et al., 2004;Ittner et al., 2004;Ittner et al., 2005;Koller et al., 2002;Hilairret et al., 2001b). Nous avons ensuite voulu déterminer si un récepteur tel le CLR, qui forme un hétéro-oligomère obligatoire avec les protéines accessoires à 1TM RAMPs, peut aussi s'associer en homo-oligomère avec d'autres récepteurs. De façon similaire, nous avons également testé la capacité des RAMPs à interagir entre eux, afin

d'établir si tout comme les RCPGs, les protéines accessoires à 1 TM peuvent également former des homo-oligomères dans des cellules vivantes. Finalement, l'implication du complexe CLR/RAMP1 dans la transmission du signal a été confirmée en évaluant l'interaction entre le récepteur et les protéines de signalisation, β -arrestine et la sous-unité $G\gamma$ de la protéine G hétéro-trimérique, en absence ou en présence de RAMP1.

En plus de valider l'association entre le récepteur CLR et la protéine accessoire RAMP1 dans des cellules vivantes, cette étude a permis de confirmer le rôle de ce complexe CLR/RAMP1 dans l'activation de la signalisation par le CGRP, via l'activation de la protéine G et le recrutement de la β -arrestine. Par ailleurs, nos travaux ont permis de démontrer qu'en plus d'interagir avec RAMP1, le CLR peut former des homo-oligomères de récepteurs. Finalement, nous avons également démontré que tout comme le CLR, les RAMPs peuvent s'associer entre eux pour former des complexes homo- ou hétéro-oligomériques (RAMP1/RAMP1, RAMP1/RAMP2 et RAMP1/RAMP3).

Assembly and signalling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET[†]

Madeleine Héroux, Billy Breton, Mireille Hogue and Michel Bouvier^{*}

Département de Biochimie, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

[†] This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (M.B.). M.H. holds a studentship from the Canadian Institute for Health Research. M.B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

^{*} To whom correspondence should be addressed at: Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7. Tel: 514-343-6319; Fax: 514-343-7780; E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca.

Running Title: CRLR and RAMP1 oligomerization in living cells

Abbreviations used: 7TMR, seven transmembrane domain receptor; AM, adrenomedullin; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CRLR, calcitonin receptor-like receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ER, endoplasmic reticulum; Fz, Frizzled; GFP, green fluorescent protein; GPCR, G protein-coupled receptor; Gs, stimulatory G protein; HEK, human embryonic kidney; HRP, horseradish peroxidase; LRP6, low-density lipoprotein receptor-related protein 6; RAMP, receptor activity-modifying protein; *Rluc*, *Renilla* luciferase; WT, wild-type.

ABSTRACT

Biochemical and functional evidences suggest that calcitonin receptor-like receptor (CRLR) interacts with receptor activity-modifying protein-1 (RAMP1) to generate a calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor. Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we investigated the oligomeric assembly of the CRLR/RAMP1 signalling complex in living cells. As for their wild-type counterparts, fusion proteins linking CRLR and RAMP1 to the energy donor *Renilla* luciferase (*Rluc*) and energy acceptor green fluorescent protein (GFP) reach the cell surface only upon CRLR and RAMP1 co-expression. Radioligand binding and cAMP production assays also confirmed that the fusion proteins retained normal functional properties. BRET titration experiments revealed that CRLR and RAMP1 associate selectively to form hetero-dimers. This association was preserved for a mutated RAMP1 that cannot reach the cell surface, even in the presence of CRLR, indicating that the deficient targeting resulted from altered conformation of the complex rather than a lack of hetero-dimerization. BRET analysis also showed that, in addition to associate with one another, both CRLR and RAMP1 can form homo-dimers. The homo-dimerization of the co-receptor was further confirmed by the ability of RAMP1 to prevent cell surface targeting of a truncated RAMP1 that normally exhibits receptor-independent plasma membrane delivery. Although the role of such dimerization remains unknown, BRET experiments clearly demonstrated that CRLR can engage signalling partners, such as G proteins and β -arrestin, following CGRP stimulation, only in the presence of RAMP1. In addition to shed new light on the CRLR/RAMP1 signalling complex, the BRET assays developed herein offer new biosensors to probe CGRP receptor activity.

The discovery in 1998 by McLatchie *et al.* of a new family of proteins named receptor activity-modifying proteins (RAMPs) challenged the traditional views of how G protein-coupled receptors (GPCRs) function (1). These proteins were first shown to promote the maturation and transport, and to define the pharmacological properties of an orphan receptor, the calcitonin receptor-like receptor (CRLR). Three RAMPs were identified (RAMP1, RAMP2 and RAMP3), forming a small family of single transmembrane domain proteins that share the same topological organization, but only 30% sequence identity. When associated with RAMP1, CRLR functions as a calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor, while it acts as an adrenomedullin (AM) receptor when co-expressed with RAMP2 or RAMP3. Taken with biochemical evidence suggesting physical interactions between RAMPs and CRLR (2-9), the observation that radiolabeled ligands could be cross-linked to both RAMPs and CRLR (1-4;10;11) clearly indicated that RAMPs act as genuine co-receptors of CRLR. In addition to the family B seven transmembrane domain receptor (7TMR) CRLR, several members of this same family (calcitonin (12), glucagon, vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide 1, parathyroid hormone 1 and 2 receptors (13)) and one member of family C 7TMR (calcium-sensing receptor (14)) were found to interact with RAMPs. In several instances, interactions between RAMPs and 7TMR were found to affect their cellular trafficking. In the case of CRLR and RAMP1, the co-expression of the two proteins is essential for their common cell surface targeting. When expressed alone, CRLR is retained in the endoplasmic reticulum (ER), whereas RAMP1 is found in the ER and the Golgi (6) as a consequence of a four-residue retention motif (SKRT) in its C-terminal tail (4).

Despite the strong evidence suggesting that 7TMR/RAMP complexes can form functional units that are involved in both receptor trafficking and signalling, almost no information is available concerning the formation of these complexes and their interactions with other signalling partners in living cells. Similarly, very little is known about the RAMP-associated 7TMR in the context of another emerging concept in GPCR trafficking

and signalling, receptor dimerization. Indeed, increasing evidences indicate that many GPCRs can exist as homo- or hetero-dimers between closely related 7TMR subtypes; a process also believed to be involved in receptor trafficking and pharmacological diversity (15). Whether a 7TMR such as CRLR, which requires RAMPs for cell surface targeting and signalling, can also form homo-dimers remains an open question. Interestingly, indirect biochemical evidence suggests that RAMP1 and RAMP3 can also form homo-dimers (1;6;16;17). Once again however, the oligomeric status of these proteins has not been explored in living cells.

The present study was therefore undertaken to further investigate the oligomeric status of CRLR and RAMP1, and their interaction with signalling partners in intact cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Our results demonstrate that, in addition to interact with one another, CRLR and RAMP1 can both form homo-dimers. Despite the formation of CRLR homo-dimers, the co-expression of RAMP1 was essential to allow agonist-promoted interaction between the 7TMR and either G proteins or β -arrestin, confirming the essential role of the CRLR/RAMP complex in signal transduction.

EXPERIMENTAL

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, glutamine, penicillin and streptomycin were all from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). [¹²⁵I]CGRP and [¹²⁵I]AM (specific activity: 2000 Ci/mmol) were from GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK), and human α CGRP and AM from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). Mouse anti-myc antibodies (9E10 clone) were produced by our core facility as ascite fluids. Texas Red-conjugated secondary antibodies and rabbit anti-HA antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Immobilized anti-HA rat antibodies were from Roche Molecular Biochemicals (Laval, Canada) and rabbit anti-myc antibodies were from Sigma (St-Louis, MO, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK). O-phenylenediamine dihydrochloride tablets (HRP substrate) were from Sigma (St-Louis, MO, USA). The chemiluminescence kit was from Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). DeepBlue coelenterazine was purchased from Perkin-Elmer Life Sciences (Woodbridge, ON, Canada) and coelenterazine H from Molecular Probes (Burlington, Canada).

Expression vectors

RAMP1, myc-RAMP1, CRLR, myc-CRLR and HA-CRLR

Human cDNAs encoding RAMP1, myc-RAMP1, CRLR, myc-CRLR and HA-CRLR were subcloned into pcDNA3 expression plasmid as previously described (1) and were graciously provided by Dr S.M. Foord (GlaxoSmithKline).

myc-RAMP1-*Rluc*, myc-RAMP1-GFP, myc-CRLR-*Rluc* and myc-CRLR-GFP (where *Rluc* stands for *Renilla* luciferase and GFP for Green Fluorescent Protein 10 (18))

The coding sequence of myc-RAMP1 and myc-CRLR were amplified by PCR to generate stop codon-free fragments that were subcloned into pcDNA3.1 zeo (+). The *Rluc* or GFP fragments were then inserted in-frame 3' of the RAMP1 and CRLR, creating a 6 amino acids linker between the proteins.

Fz1-GFP and LRP6-GFP (where Fz1 stands for rat Frizzled 1 and LRP6 for human low-density lipoprotein receptor-related protein 6)

These vectors were generously provided by Dr R.T. Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, USA) and were constructed by incorporating the GFP coding sequence (from pGFP2 N1, Perkin Elmer) in-frame 3' of the LRP6 and Fz1 sequence.

myc-RAMP1C104A-GFP

The RAMP1 mutant was constructed by PCR site-directed mutagenesis, replacing cysteine 104 into alanine using myc-RAMP1-GFP as template.

RAMP2-GFP and RAMP3-GFP

These constructs were generously provided by Dr P.M. Sexton (Monash University, Clayton, Australia) and were constructed using the Gateway system technology (invitrogen). The RAMP2 and RAMP3 were incorporated into pENTER vector and then, via a recombination reaction, cloned into the pGFP2 destination vector, creating a linker of 30 amino acids between the RAMP and the GFP.

myc-RAMP1 Δ 8-GFP

A PCR fragment lacking the stop codon plus the last 8 amino acids from the C-terminus (SKRTEGIV) was generated using myc-RAMP1 as template. This fragment was subcloned into pcDNA3.1 zeo (+) and the GFP fragment inserted in-frame 3' of RAMP1 Δ 8, creating a 6 amino acids linker between the two proteins.

HA-RAMP1-Rluc

The myc epitope at the N-terminus of myc-RAMP1-Rluc described above was replaced by the HA epitope cut out from the HA-CRLR construct, also described above.

G γ ₂-Rluc and β -arrestin2-Rluc (where G γ ₂ stands for G protein γ ₂ subunit)

The coding sequences of G γ ₂ and rat β -arrestin2 were inserted in-frame 5' of the Rluc sequence as previously described (19;20).

All constructs were confirmed by sequencing.

Cell culture and transfections

Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂. Transient transfections were performed using the calcium phosphate precipitation method (21), except for the agonist-induced BRET experiments between CRLR and both G γ and β -arrestin for which transfections were performed using polyethyleneimine as the transfecting agent (22). In all cases, the amount of DNAs between conditions was maintained constant

by adding the appropriate amount of empty vectors. All experiments were carried out 48 h after transfection.

Immunofluorescence microscopy

Labelling of permeabilized cells

Transfected cells were fixed with PBS containing 3% (w/v) paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.25% Triton X-100 in blocking buffer (PBS containing 0.2% (w/v) BSA) at room temperature for 15 min. Cells were then incubated with anti-myc (9E10) antibodies (1/100) for 30 min. After 3 washes in blocking buffer, anti-mouse Texas Red-conjugated antibodies (1/500) were added for 30 min. The samples were then extensively washed, mounted onto slides using Airvol mounting media and analysed by confocal laser-scanning microscopy using a Leica TCS SP1 confocal microscope.

Cell-surface labelling

Transfected cells were incubated in blocking buffer and anti-myc (9E10) antibodies (1/100) were added for 1 h on ice. Cells were then washed and fixed with PBS containing 3% (w/v) paraformaldehyde for 15 min, treated with the appropriate secondary antibodies and analyzed as described above.

cAMP accumulation

cAMP accumulation was measured using the CatchPoint cAMP Fluorescent Assay Kit from Molecular Devices. Briefly, cells were detached and resuspended in stimulation buffer (PBS containing 0.2% (w/v) EDTA, 0.1% (w/v) glucose and 0.75 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine). Cells were then distributed in 96-well plates and incubated with the

indicated concentrations of CGRP. The reaction was stopped and lysates were transferred to 384-well plates coated with goat anti-rabbit antibodies. Rabbit anti-cAMP antibodies were added, followed by HRP-conjugated cAMP. After 2 h, the plates were extensively washed, the Stoplight RedTM substrate was added and the plates were read using a FlexStation (Molecular Devices). cAMP accumulation experiments were performed in triplicates.

Radioligand binding

Transfected HEK293T cells, seeded in 24-well plates, were washed 3 times with cold PBS and incubated on ice for 3 h in binding buffer (DMEM containing 0.2% (w/v) BSA and 20 mM HEPES pH 7.4) with 200 pM [¹²⁵I]CGRP or [¹²⁵I]AM, in the absence (total binding) or presence of increasing concentrations of unlabeled ligand. Non-specific binding was defined as binding in the presence of 1 μM unlabeled CGRP or AM. After incubation, cells were washed once with binding buffer, twice with PBS and then solubilized with 0.5 M NaOH. The associated cellular radioactivity was measured in a γ-counter. Binding experiments were performed in triplicates.

BRET²

Cells were washed twice with PBS, detached and resuspended in PBS containing 0.1% (w/v) glucose. Cells were then distributed in 96-well plates (100 000 cells/well) (white plates from Corning #3912) and DeepBlue coelenterazine was added at a final concentration of 5 μM. Readings were collected using a modified TopCount apparatus (Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 and 500-530 nm ranges. The BRET signal corresponds to the ratio of the light emitted by GFP (500-530 nm) over the light emitted by *Rluc* (370-450 nm). The values were corrected by subtracting the BRET background signal detected when *Rluc* constructs

were expressed alone. For BRET titration curve experiments, cells were transfected with a constant amount of *Rluc* construct and increasing quantities of GFP construct. Total luminescence and fluorescence were measured to control for relative expression levels of donor and acceptor proteins, respectively. BRET values were then plotted as a function of the total fluorescence/luminescence ratios (GFP/*Rluc*) and the curves fitted using non-linear or linear least-squares regression functions (GrapPad Prism) (18). To assess the effect of CGRP on the BRET signal between myc-CRLR-*Rluc* and myc-RAMP1-GFP, membranes were prepared from HEK293T cells expressing these two constructs. Cells were mechanically detached in membrane buffer (75 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 12.5 mM MgCl₂, 10 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor and 5 µg/ml leupeptin), followed by lysis at 4°C using a polytron. Nucleus and large cellular debris were eliminated by centrifugation at 100 x g for 5 min at 4°C. The supernatant was then centrifuge at 44 000 x g for 20 min at 4°C. The pelleted membranes were washed twice in membrane buffer and finally resuspended in an appropriate volume of membrane buffer. For agonist-induced BRET experiments, cells (100 000 cells/well) or membrane preparations (3-27 µg of protein/well) were distributed in 96-well plates and treated with the indicated concentrations of CGRP for 10 min at room temperature before DeepBlue coelenterazine was added. BRET readings were then collected at room temperature as described above, immediately following DeepBlue coelenterazine addition.

Total luminescence measurement

Because BRET experiments lead to the transfer of a fraction of the luciferase-emitted energy to the GFP partner, the amount of light detected in the channel corresponding to the *Rluc* emission upon DeepBlue coelenterazine addition is diminished proportionally to the extent of energy transfer. To accurately determine the amount of *Rluc*-fusion protein expressed in each condition, total luminescence was measured following the addition of coelenterazine H, a luciferase substrate that leads to luminescence emission at a wavelength

that does not allow energy transfer to GFP. Briefly, transfected HEK293T cells resuspended in PBS 0.1% (w/v) glucose were distributed in 96-well plates (100 000 cells/well) (clear bottom plates from Corning #3632) and coelenterazine H was added at a final concentration of 5 μ M. Total luminescence generated by *Rluc* constructs was determined using a LumiCount (Packard Bioscience), 10 min after the addition of coelenterazine H. This measurement was performed on a fraction of the cell used for BRET or quantitative ELISA experiments.

Total fluorescence measurement

The amount of GFP-fused protein expressed was assessed by measuring the total fluorescence upon direct light excitation of the fluorophore. Briefly, transfected HEK293T cells resuspended in PBS 0.1% (w/v) glucose were distributed in 96-well plates (100 000 cells/well) (clear bottom plates from Corning #3632) and total fluorescence emitted by GFP constructs was measured using a FluoroCount (Packard Bioscience) with excitation and emission filters set at 400 nm and 510 nm, respectively. The values were corrected by subtracting the background signal detected in cells transfected with empty vector instead of GFP constructs. These measurements were performed on a fraction of the cell used for BRET or quantitative ELISA experiments.

Co-immunoprecipitation

Transfected cells were washed twice with PBS, lysed for 1 hour at 4°C in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 50 mM iodoacetamide, 10 μ g/ml benzamidine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor and 5 μ g/ml leupeptin) and centrifuged at 150 000 x g for 1 h at 4°C in order to remove unsolubilized material. Protein concentration of the lysates was determined and the same quantity of total proteins was used in each immunoprecipitation reaction. Lysates were

incubated overnight at 4°C with immobilized anti-HA rat antibodies. Antibody/antigen complexes were collected by centrifugation and washed four times with cold lysis buffer containing 150, 250, 350 and finally 150 mM NaCl respectively. The final pellet was resuspended in sample buffer containing 60 mM Tris pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 4.5 M urea and 100 mM dithiothreitol. Protein samples were resolved by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting using rabbit anti-myc antibodies (1/1000) or rabbit anti-HA antibodies (1/10 000).

Quantitative measurement of cell surface RAMPs

48 h post-transfection, cells were washed twice, fixed with PBS containing 3% (w/v) paraformaldehyde and incubated in blocking buffer (PBS containing 0.2% (w/v) BSA) for 15 min. Anti-myc (9E10) antibodies (1/500) were added for 30 min. After three washes in blocking buffer, anti-mouse HRP-conjugated antibodies (1/500) were added for 30 min. Cells were then extensively washed and immunoreactivity revealed by the addition of the HRP substrate according to manufacturer's instructions. For each ELISA experiment, a mock condition corresponding to cells transfected with empty vector was included and the values obtained for the different conditions were corrected by dividing the background signal detected from the mock condition. Triplicates were performed for each condition within an ELISA experiment. The amount of cell surface myc-RAMP1-GFP, myc-RAMP1 Δ 8-GFP or myc-RAMP1C104A-GFP obtained with the ELISA was plotted as a function of its total expression level, assessed by measuring total fluorescence (as describe in the previous section). The relative amount of HA-RAMP1-*Rluc* co-expressed with myc-RAMP1 Δ 8-GFP was also assessed by measuring total luminescence.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of *Rluc*- and GFP-fused CRLR and RAMP1

To gain insight into the assembly of CRLR/RAMP1 signalling complexes, a “non-invasive” proximity-based assay exploiting the non-radiative transfer of energy between luciferase and GFP (BRET), was used. For this purpose, fusion proteins were generated in which the energy donor *Rluc* or the energy acceptor GFP were fused at the carboxyl terminus of either myc-CRLR or myc-RAMP1. To confirm that these fusion proteins behaved like their wild-type (WT) counterparts, we first studied their sub-cellular localization using confocal immunofluorescence microscopy. As shown in Figure 1, in the absence of co-transfected RAMP1, myc-CRLR-*Rluc* and myc-CRLR-GFP were largely retained intracellularly. The weak cell surface immunofluorescence detected for both myc-CRLR-*Rluc* and myc-CRLR-GFP most likely resulted from low level of endogenous RAMP in these cells ((1) and see also below) and not from the presence of *Rluc* or GFP fused to the carboxyl-terminus of myc-CRLR since a similar weak cell surface expression was also observed for the myc-CRLR construct without carboxyl-terminally fused *Rluc* or GFP (Supporting Information Figure S1). In the absence of CRLR, myc-RAMP1-*Rluc* and myc-RAMP1-GFP were restricted to the inside of the cells (Figure 1). As is the case for their WT counterparts (1;6), the intracellular retention of the four fusion constructs transfected alone can be easily appreciated by the strong immunofluorescence signals observed after cell permeabilization. A clearly distinct distribution pattern was observed when the CRLR and RAMP1 constructs were co-expressed. Indeed, cell surface expression of both myc-CRLR-*Rluc* and myc-CRLR-GFP was greatly increased by the co-transfection of RAMP1. Likewise, myc-RAMP1-*Rluc* and myc-RAMP1-GFP were clearly detected at the cell surface upon co-expression of CRLR. These results demonstrate that the addition of either *Rluc* or GFP did not affect the normal distribution pattern of CRLR and RAMP1,

each fusion protein requiring the co-expression of their respective partner for efficient cell surface targeting, in agreement with previous reports on the WT proteins (1;6).

Next, we wanted to assess the functionality of the four fusion proteins (-Rluc and -GFP) by testing their ability to promote cAMP accumulation upon agonist stimulation. First, the functionality of myc-CRLR-Rluc and myc-CRLR-GFP was tested in cells co-transfected with RAMP1. As can be seen in Figure 2A, CGRP-induced cAMP production was observed in cells transfected with RAMP1 alone. However, co-expression of either CRLR, myc-CRLR-Rluc or myc-CRLR-GFP led to a major increase in both the efficacy and potency of CGRP. The EC_{50} and the maximal responses generated upon expression of either of the two fusion proteins (myc-CRLR-Rluc or myc-CRLR-GFP) were comparable to that obtained with the WT-CRLR, indicating that the addition of the myc, Rluc or GFP tags to CRLR did not affect the Gs coupling potential of the receptor.

The cAMP production obtained in cells transfected with RAMP1 alone most likely reflects the presence of low levels of endogenous receptor that can bind CGRP and activate adenylyl cyclase upon interaction with RAMP. Since low levels of endogenous RAMP proteins are also present in HEK293T cells (1), one would suspect that we should be able to observe cAMP production in non-transfected cells. Indeed, cells transfected with an empty vector conferred a small but measurable CGRP-promoted adenylyl cyclase activity (Figure 2B). Interestingly the co-transfection of CRLR and RAMP1 not only resulted in an increase of the maximal CGRP-stimulated cAMP production when compared with untransfected or RAMP1 transfected cells but also led to an increase in CGRP potency. This decrease in CGRP EC_{50} may reflect the generation of spare receptor (i.e.: more receptor than is required to maximally stimulate the adenylyl cyclase activity even at sub-saturating concentration of agonist leading to a leftward shift in the concentration-response curve). This possibility is supported by the observation that the EC_{50} of CGRP to activate the adenylyl cyclase is smaller than its IC_{50} derived from radioligand binding assay (see below).

When we sought to test the functionality of the RAMP1 constructs, it was noted that, as expected from the presence of endogenous RAMP, transfection of CRLR alone was sufficient to confer a sizable cAMP accumulation response, rendering it difficult to assess the functionality of the RAMP1 fusion constructs using this second messenger generation assay. Indeed, although co-transfection of CRLR with RAMP1 tended to increase both the efficacy and the potency of CGRP to activate adenylyl cyclase activity (Figure 2B), the differences were too small to allow reliable assessment of the RAMP1 fusion proteins. To circumvent this technical problem, we turned to a radioligand binding assay. Indeed, the lack of signal amplification characteristic of radioligand binding assays contrasts with the high level of amplification of second messenger generation techniques and greatly reduces the impact of the endogenous RAMP on the readout. In cells transfected with CRLR alone, only marginal [¹²⁵I]CGRP binding could be detected. In contrast, co-transfection of either WT-RAMP1, myc-RAMP1-*Rluc* or myc-RAMP1-GFP conferred greater [¹²⁵I]CGRP binding, which could be displaced with high-affinity by non-labeled CGRP (Table 1). Identical IC₅₀s were obtained for WT-RAMP1 and myc-RAMP1-GFP whereas a slightly higher apparent affinity was observed for the myc-RAMP1-*Rluc*. The maximal binding observed upon transfection of the different RAMP1 fusion proteins was somewhat lower than that obtained with WT-RAMP1. This difference, which is particularly evident for the myc-RAMP1-*Rluc*, most likely reflects different expression levels rather than altered binding properties, since the apparent affinity of CGRP (IC₅₀s) observed were at least as high as that obtained for the WT-RAMP1. Taken with the observation that myc-RAMP1-*Rluc* and myc-RAMP1-GFP have the same cell surface targeting pattern as the WT-RAMP1 (Figure 1), the binding data indicates that the fusion of *Rluc* or GFP did not promote major changes in RAMP1 functionality.

Interaction between CRLR and RAMP1

Since the discovery of RAMPs and their involvement in the CRLR signalling, only little attention has been paid to the interactions involving the different partners of the CRLR/RAMP complex. Cross-linking of [¹²⁵I]CGRP to two proteins with the molecular weight of CRLR + RAMP1 and co-immunoprecipitation of CRLR and RAMP1 after cell solubilization suggested an interaction between CRLR and RAMPs (1-11). To determine whether such interaction occurred *in vivo*, BRET titration curves were carried out in living cells. For this purpose, a constant level of myc-CRLR-Rluc was co-expressed with increasing concentrations of myc-RAMP1-GFP in HEK293T cells. As shown in Figure 3, the BRET signal detected in cells expressing the two constructs increased as a hyperbolic function of the myc-RAMP1-GFP concentration, reflecting a specific interaction between the two proteins (18). Similar results were obtained when the reverse energy donor/acceptor orientation was used (co-expressing myc-RAMP1-Rluc with myc-CRLR-GFP; Supporting Information Figure S2A). In contrast, virtually no BRET signal could be detected between myc-CRLR-Rluc and the negative control LRP6-GFP (a single transmembrane domain co-receptor for another 7TMR, Frizzled (Fz) (23)) expressed at levels similar to those of myc-RAMP1-GFP (as illustrated by the similar fluorescence obtained in cells transfected with either LRP6-GFP or myc-RAMP1-GFP), thus confirming the selectivity of the observed signal. The addition of CGRP to cells co-expressing myc-CRLR-Rluc and myc-RAMP1-GFP was without effect on the BRET signal (data not shown), indicating that agonist stimulation did not affect the oligomeric state of the complex. To rule out the possibility that the lack of CGRP effect on the BRET between myc-CRLR-Rluc and myc-RAMP1-GFP could result from the presence of a significant pool of intracellular CRLR/RAMP1 complex that could not be accessible to CGRP, the effect of CGRP was assessed on membrane fractions derived from cells co-expressing myc-CRLR-Rluc and myc-RAMP1-GFP. As shown in Supporting Information Figure S2B, CGRP, at a saturating concentration of 1 μM, was without effect on the BRET signal between CRLR and RAMP1. Taken

together, these results clearly indicate that, as was suggested by *in vitro* studies, CRLR and RAMP1 can form a constitutive and stable complex in living cells.

It has been previously demonstrated that the single substitution of any of the four conserved cystein residues in the N-terminal domain of RAMP1 by alanine residues impaired the CGRP receptor function by promoting retention of the mutated RAMP1, even when co-expressed with CRLR (24). This retention could be explained by different mechanisms, one being that the cystein mutation could impair the physical interaction between RAMP1 and CRLR, which is needed for cell surface trafficking. To test this hypothesis, we constructed a myc-RAMP1C104A-GFP mutant and tested both its sub-cellular localization and ability to interact with CRLR.

To quantitatively assess the cell surface targeting of myc-RAMP1-GFP, we devise an assay based on the simultaneous measurement of the surface expression by ELISA (using the N-terminal myc epitope) and of the total myc-RAMP1-GFP expression, reflected by the fluorescence of the C-terminally fused GFP. The cell surface expression (ELISA signal) is then graphically depicted as a function of the total expression level (Fluorescence). As shown in Figure 4, expressing increasing levels of myc-RAMP1-GFP in the absence of CRLR led to a robust elevation of the fluorescence detected, but to virtually no increase of the ELISA signal, confirming that RAMP1 cannot reach the cell surface efficiently in the absence of CRLR. At similar fluorescence level of myc-RAMP1-GFP, co-expression of CRLR promoted a brisk increase in the ELISA signal that is proportional to its total expression, reflecting the ability of the complex to reach the cell surface. In contrast, no cell surface signal could be observed for the myc-RAMP1C104A-GFP mutant even in the presence of CRLR (Figure 5A), confirming the intracellular retention phenotype of that cystein mutated RAMP1 (24).

To assess the ability of RAMP1C104A to interact with CRLR, BRET titration curves were carried out between myc-CRLR-Rluc and either myc-RAMP1-GFP, myc-RAMP1C104A-GFP or LRP6-GFP (Figure 5B). Hyperbolic increase in the BRET signal was observed for both myc-RAMP1-GFP and myc-RAMP1C104A-GFP but not LRP6-

GFP, indicating that the cysteine mutation did not prevent the interaction between RAMP1 and CRLR. The observation that similar levels of RAMP1 expression were required for myc-RAMP1-GFP and myc-RAMP1C104A-GFP to reach 50% of the maximal BRET signal (referred to as BRET₅₀ values and used as an indirect indication of the relative affinity of the partners for one another (18)) indicate that the mutation did not reduce the ability of RAMP1 to associate with CRLR. In fact, the modestly smaller BRET₅₀ observed for myc-RAMP1C104A-GFP suggests that the mutant form of RAMP1 may even have a slightly greater affinity for CRLR. The maximal BRET signal observed was, however, markedly smaller for the mutant form of RAMP1. Maximal BRET levels not only reflect the number of dimers, but also the distance and orientation between the energy donors and acceptors that can be affected by conformational changes. Given the lack of BRET₅₀ increase, which indicates a similar propensity of the mutant and WT RAMP1 to associate with CRLR, the smaller BRET_{max} most likely reflects a conformational difference between the CRLR/RAMP1C104A and the CRLR/RAMP1 complexes. It follows that the intracellular retention of the cysteine mutant is probably due to distinct conformation of the CRLR/RAMP1C104A complex that does not allow its export from the ER. This conformational change could result from the inability of RAMP1 to form intra or intermolecular disulfide bonds involving cysteine 104 (6). Alternatively, the decrease in BRET_{max} could reflect a retention of the myc-RAMP1C104A-GFP in a sub-cellular compartment where it can interact only with a fraction of the myc-CRLR-Rluc population. However, such hypothetical partial sequestration of the mutated RAMP1 away from CRLR could not explain the total intracellular retention of RAMP1C104A (Figure 5A). Indeed, the extent of the BRET signal observed with myc-RAMP1C104A-GFP indicates that a sizable fraction of the mutated RAMP1 can interact with CRLR but yet cannot reach the cell surface.

Homo-dimerization of CRLR

Increasing data suggest that most members of the GPCR superfamily can form dimers. Although, most attention focused on family A and C receptors, increasing evidence suggest that family B GPCRs such as the calcitonin (25), corticotropin-releasing factor receptor type 1 (26), secretin (27) and vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide (VPAC1 and VPAC2) (28) receptors, can also form dimers. Several of these receptors have also been shown to interact with RAMPs (12;13). However, CRLR is a particular case since it is the only receptor to date that absolutely requires RAMPs for its plasma membrane expression, function and pharmacological selectivity. Since GPCR homo- and hetero-dimerization have also been shown to play a role in receptor cell surface trafficking (29;30), we sought to assess whether CRLR could also homo-dimerize in living cells. For this purpose, BRET titration experiments, where a constant level of myc-CRLR-Rluc was co-expressed with increasing concentration of myc-CRLR-GFP, were carried out. As shown in Figure 6A, the BRET signal increased as a hyperbolic function of the concentration of GFP fusion protein added, whereas co-expression of myc-CRLR-Rluc with an unrelated 7TMR Fz1 fused to GFP (Fz1-GFP), led only to marginal BRET that increased linearly as a function of GFP concentration. The weak and linear signal observed between myc-CRLR-Rluc and Fz1-GFP most likely represents “bystander BRET” resulting from random collisions between the expressed BRET partners (18), thus emphasizing that the robust hyperbolic signal detected for the myc-CRLR-Rluc/myc-CRLR-GFP pair reflects selective dimerization of CRLR. To confirm the occurrence of homo-dimerization using a different approach, co-immunoprecipitation experiments were carried out in solubilized preparations derived from cells co-expressing differentially amino-terminally tagged CRLR. As shown in Figure 6B (lane 3), immunoreactivity corresponding to the myc-tagged CRLR could be readily detected following immunoprecipitation of the HA-CRLR, indicating an intermolecular interaction between the differentially tagged receptor that is consistent with the CRLR homo-dimerization

detected by BRET. No myc immunoreactivity was detected following immunoprecipitation with the anti-HA antibody in cells expressing either myc-CRLR or HA-CRLR alone (Figure 6B, lanes 1 and 2), demonstrating that the signal did not result from cross-immunoreactivity. In cells co-expressing myc-CRLR and HA-Fz1, immunoprecipitation of HA-Fz1 also lead to a detectable co-sedimentation of myc-CRLR (Figure 6B, lane 4). However, the myc-CRLR immunoreactivity detected was much weaker than that observed following HA-CRLR immunoprecipitation, despite equivalent levels of myc-CRLR (Figure 6B, lanes 5 and 6) and the similar amount of HA-tagged receptors immunoprecipitated (Figure 6B, lanes 7 and 8). The low level of co-immunoprecipitation between CRLR and Fz1 most likely represent non-specific interactions that are consistent with the low BRET signal observed between myc-CRLR-Rluc and Fz1-GFP in Figure 6A. Taken together, the BRET and co-immunoprecipitation data demonstrates for the first time that even though it requires a co-receptor for cell surface trafficking and function, CRLR has the same homo-oligomerization potential as the other GPCRs.

Homo- and hetero-dimerization of RAMP1

Even if the evidence is less compelling than for GPCRs, RAMP1 has also been proposed to form homo-dimers. For instance, species corresponding to the expected molecular weight for a dimer of RAMP1 were obtained following immunoprecipitation of an N-terminally tagged RAMP1 (1;6;16;17). Although this could indeed reflect RAMP1 homo-dimerization, the detection of a higher molecular weight species could also be a consequence of the association of RAMP1 with another protein of similar molecular weight, or of aggregation resulting from cell lysis and incomplete solubilization. To directly assess if RAMP1 could truly form homo-dimers in living cells, BRET titration experiments were carried out. A robust and saturable transfer of energy was obtained between myc-RAMP1-Rluc and myc-RAMP1-GFP (Figure 7A). As in the case of the CRLR/RAMP1 interaction, LRP6-GFP was used as a negative control. In spite of the low expression levels

of the negative control, it can be clearly seen that co-expression of myc-RAMP1-*Rluc* with LRP6-GFP lead to undetectable BRET signals at GFP/*Rluc* ratios for which sizable BRET levels were obtained between RAMP1-*Rluc* and RAMP1-GFP (inset of Figure 7A), thus confirming the selectivity of the signal observed. The negative results obtained with Fz1-GFP (Figure 6A) and LRP6-GFP (Figure 3 and 7A) does not result from the inability of these constructs to generate BRET signals, since significant BRET levels were obtained when co-expressing Fz1-*Rluc* with Fz1-GFP and LRP6-*Rluc* with LRP6-GFP (Supporting Information Figure S3). Taken together, these data provide the first evidence that RAMP1 can form homo-dimers in intact living cells. Given the existence of three RAMP subtypes, we investigated the ability of RAMP1 to hetero-dimerize with the two other members of the family, RAMP2 and RAMP3. For this purpose, RAMP2 and RAMP3 fused at their carboxyl terminus to GFP were used as potential BRET partners for myc-RAMP1-*Rluc*. As was the case for RAMP1, the addition of GFP to RAMP2 and RAMP3 did not affect the functional properties of these proteins as assessed by their ability to confer [¹²⁵I]AM binding (data not shown). BRET titration curves revealed that RAMP1 readily interacts with both RAMP2 and RAMP3, as indicated by the fact that the BRET signal observed between myc-RAMP1-*Rluc* and either RAMP2- or RAMP3-GFP increased as a hyperbolic function of the GFP partner concentration (Figure 7B and 7C respectively). The selectivity of the interaction was once again confirmed by the lack of BRET between myc-RAMP1-*Rluc* and LRP6-GFP. These data reveal that, in addition to self-associate, RAMP1 can also interact with the two other members of the family to form hetero-dimers.

Effects of RAMP1 dimerization on cell surface targeting of RAMP1Δ8

To further assess the functional relevance of RAMP1 dimerization, we took advantage of a truncated form of RAMP1 (RAMP1Δ8), which exhibits receptor-independent cell surface delivery as a result of the deletion of a retention signal (SKRT) located within its last 8 amino-acids (4). Indeed, as discussed before, the WT form of

RAMP1 is retained intracellularly when expressed alone. If, as the BRET experiments described above indicate, RAMP1 can homo-dimerize, co-expression of RAMP1 Δ 8 with WT-RAMP1 could impact on their cell surface expression. Either, RAMP1 Δ 8 could bring its WT counterpart to the cell surface, or the WT-RAMP1 could retain the truncated form intracellularly.

Before testing these possibilities, the functionality of myc-RAMP1 Δ 8-GFP, its cell surface trafficking property and its ability to dimerize with WT-RAMP1 were assessed. As can be seen in Table 1, similarly to WT-RAMP1, co-expression of myc-RAMP1 Δ 8-GFP with CRLR conferred high affinity [¹²⁵I]CGRP binding, confirming the functional status of the truncated form of RAMP1 (4). Using the quantitative cell surface targeting assay described above, the plasma membrane expression profile of myc-RAMP1 Δ 8-GFP was compared to that of the myc-RAMP1-GFP. As shown in Figure 8A, in contrast to the full length myc-RAMP1-GFP, increasing expression of the truncated RAMP1 alone led to the apparition of detectable cell surface RAMP1 expression, confirming the CRLR-independent cell surface delivery of myc-RAMP1 Δ 8-GFP. Finally, the ability of RAMP1 Δ 8 to dimerize with WT-RAMP1 was confirmed by the strong BRET signal observed upon co-expression of myc-RAMP1 Δ 8-GFP with HA-RAMP1-*Rluc* (Figure 8B).

To assess the potential influence of dimerization on RAMP cell surface trafficking, we then proceeded to measure the influence of HA-RAMP1-*Rluc* on the cell surface delivery of myc-RAMP1 Δ 8-GFP. As can be seen in Figure 9, co-expression of an excess of HA-RAMP1-*Rluc* prevented cell surface appearance of myc-RAMP1 Δ 8-GFP for a wide range of truncated RAMP1 expression levels. The intracellular retention of myc-RAMP1 Δ 8-GFP was dependent on the amount of HA-RAMP1-*Rluc* expressed, since titrating down its expression resulted in weaker retention (data not shown). Taken together, these results indicate that full length RAMP1 acts as a dominant negative of RAMP1 Δ 8 cell surface targeting, suggesting that the dimerization occurs intracellularly, most-likely in the ER or the Golgi, where it could play a role in the processing of RAMP1 through the secretory pathway. Such dimerization early in the secretory pathway is reminiscent of the

oligomerization of two lectin proteins, ERGIC-53 and VIP36, that share a similar topological organization with RAMP1 (type I single transmembrane protein) and are involved in ER-Golgi transport of glycoproteins (31;32). Interestingly, the oligomerization of ERGIC-53 was found to be essential for its cargo transport function (33). However, the role of RAMP1 dimerization in the transport of the CRLR/RAMP1 complex remains to be investigated.

CRLR/RAMP1 signalling complexes assessed by BRET

Binding of CGRP to its receptor (presumably the CRLR/RAMP1 complex) leads to the activation of the stimulatory G protein (Gs) that in turn activates adenylyl cyclase activity, promoting the appropriate cellular responses (34). In addition to its coupling to Gs, the CRLR/RAMP1 complex has also been proposed to interact with β -arrestin (6), an accessory protein that promotes the desensitization and the internalization of GPCRs, and may lead to the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway (35). However, the evidence linking CRLR itself to G proteins and β -arrestin are only indirect. Thus, we turned to BRET assays to probe the direct interaction between CRLR and its signalling partners, and tested the role of RAMP1 in such interactions. For the G protein coupling, the energy transfer between $G\gamma_2$ -Rluc and myc-CRLR-GFP was monitored in the presence or absence of co-transfected RAMP1. In all cases, the BRET partners were co-expressed with $G\alpha_s$ and $G\beta_1$ to attain the G protein subunits stoichiometry needed to allow the proper engagement of the hetero-trimeric G proteins by the receptor (19). As illustrated in Figure 10A, stimulation with CGRP led to a concentration-dependent increase in the BRET signal detected only in cells transfected with RAMP1. Interestingly, the expression of RAMP1 was sufficient to noticeably increase the basal BRET signal between CRLR and $G\gamma$, indicating that RAMP1 favors constitutive coupling between the 7TMR and the G protein. The existence of such pre-coupling between GPCRs and their cognate G proteins has been previously suggested (36) and recently confirmed for several receptors, using both BRET

(19) and FRET (fluorescence resonance energy transfer) (37) approaches. Taken together, these data demonstrate the necessity of RAMP1 for proper engagement of G proteins by CRLR. The data are also consistent with the notion that the CRLR/RAMP1 complex represents the functional receptor interacting with the G protein upon agonist stimulation. Yet, one cannot exclude the possibility that, although necessary for the trafficking of CRLR at the plasma membrane, RAMP1 could dissociate from the receptor once at the cell surface, thus allowing CRLR to interact on its own with the G protein. However, this possibility is unlikely since it was previously shown that CGRP can be chemically cross-linked to both CRLR and RAMP1 and that agonist stimulation leads to the endocytosis of CRLR/RAMP1 complex as a stable entity, suggesting that CRLR and RAMP1 remain associated following agonist binding and activation (6;11).

In the case of β -arrestin, the agonist-promoted recruitment was monitored in cells co-expressing β -arrestin2-Rluc and myc-CRLR-GFP. No detectable basal BRET was observed whether RAMP1 was co-transfected or not (Figure 10B), consistent with the notion that under resting conditions, β -arrestin resides in the cytosol and thus does not interact with either ER-retained or plasma membrane-targeted receptors. Following CGRP stimulation, a robust concentration-dependent increase in the energy transfer between β -arrestin2-Rluc and myc-CRLR-GFP was observed only in cells transfected with RAMP1, thus confirming that CRLR can recruit β -arrestin upon activation exclusively in the context of RAMP1 co-expression. These results are congruent with the observation that CRLR and RAMP1 undergo β -arrestin-dependent endocytosis as stable complex following receptor activation (6). It is noteworthy that the apparent potency (EC_{50}) of the CGRP-promoted interaction of CRLR with both $G\gamma$ and β -arrestin monitored by BRET (Figure 10A-B) was similar to the apparent affinity (IC_{50}) of the receptor as assessed in CGRP radioligand competition binding assay (Table 1). However, the apparent potency obtained in the BRET assays is significantly smaller than that observed for the CGRP-stimulated cAMP production (Figure 2A). This difference is not surprising when considering that the second

messenger generation greatly amplifies the signal, thus unmasking the presence of spare receptors that leads to a leftward shift of the concentration-response curve.

Overall, our results are in agreement with the notion that CRLR/RAMP1 complex represents the functional CGRP receptor (*1*) and demonstrate for the first time that such physical assembly occurs in living cells. They also clearly demonstrate that, in the context of RAMP1 co-expression, CRLR can engage both the G proteins and β -arrestin, confirming its signalling capacities. In addition to their ability to interact with one another, CRLR and RAMP1 were also found to form homo-dimers in living cells, thus raising the question of their stoichiometry of assembly in the CRLR/RAMP1 complex. Unfortunately, the assays currently available do not allow to readily address this question in intact cells and further methodological development will be needed before a satisfactory answer to this question can be offered. Despite this limitation, the BRET assays presented in this study offer new ways to probe CGRP receptor assembly and activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr S.M. Foord (GlaxoSmithKline) for the generous gift of CRLR, RAMP1, myc-CRLR and myc-RAMP1, Dr P.M. Sexton for the RAMP2-GFP and RAMP3-GFP, and Dr R.T. Moon for the Fz1-GFP and LRP6-GFP cDNAs. We also thank Dr M. Lagacé for critical reading of the manuscript.

Supporting Information Available

Cell surface trafficking of myc-CRLR (Figure S1), BRET between myc-RAMP1-*Rluc*/myc-CRLR-GFP (Figure S2A), CGRP effect on the BRET between myc-CRLR-*Rluc*/myc-RAMP1-GFP (Figure S2B), BRET between LRP6-*Rluc*/LRP6-GFP and Fz1-*Rluc*/Fz1-GFP (Figure S3). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

1. McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., and Foord, S. M. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor, *Nature* *393*, 333-339.
2. Leuthauser, K., Gujer, R., Aldecoa, A., McKinney, R. A., Muff, R., Fischer, J. A., and Born, W. (2000) Receptor-activity-modifying protein 1 forms heterodimers with two G-protein-coupled receptors to define ligand recognition, *Biochem. J.* *351 Pt 2*, 347-351.
3. Gujer, R., Aldecoa, A., Buhlmann, N., Leuthauser, K., Muff, R., Fischer, J. A., and Born, W. (2001) Mutations of the asparagine117 residue of a receptor activity-modifying protein 1-dependent human calcitonin gene-related peptide receptor result in selective loss of function, *Biochemistry* *40*, 5392-5398.
4. Steiner, S., Muff, R., Gujer, R., Fischer, J. A., and Born, W. (2002) The transmembrane domain of receptor-activity-modifying protein 1 is essential for the functional expression of a calcitonin gene-related peptide receptor, *Biochemistry* *41*, 11398-11404.
5. Flahaut, M., Rossier, B. C., and Firsov, D. (2002) Respective roles of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying proteins (RAMP) in cell surface expression of CRLR/RAMP heterodimeric receptors, *J. Biol. Chem.* *277*, 14731-14737.
6. Hilairet, S., Belanger, C., Bertrand, J., Laperriere, A., Foord, S. M., and Bouvier, M. (2001) Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin, *J. Biol. Chem.* *276*, 42182-42190.

7. Koller, D., Ittner, L. M., Muff, R., Husmann, K., Fischer, J. A., and Born, W. (2004) Selective inactivation of adrenomedullin over calcitonin gene-related peptide receptor function by the deletion of amino acids 14-20 of the mouse calcitonin-like receptor, *J. Biol. Chem.* 279, 20387-20391.
8. Ittner, L. M., Luessi, F., Koller, D., Born, W., Fischer, J. A., and Muff, R. (2004) Aspartate(69) of the calcitonin-like receptor is required for its functional expression together with receptor-activity-modifying proteins 1 and -2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1203-1209.
9. Ittner, L. M., Koller, D., Muff, R., Fischer, J. A., and Born, W. (2005) The N-terminal extracellular domain 23-60 of the calcitonin receptor-like receptor in chimeras with the parathyroid hormone receptor mediates association with receptor activity-modifying protein 1, *Biochemistry* 44, 5749-5754.
10. Koller, D., Born, W., Leuthauser, K., Fluhmann, B., McKinney, R. A., Fischer, J. A., and Muff, R. (2002) The extreme N-terminus of the calcitonin-like receptor contributes to the selective interaction with adrenomedullin or calcitonin gene-related peptide, *FEBS Lett.* 531, 464-468.
11. Hilairret, S., Foord, S. M., Marshall, F. H., and Bouvier, M. (2001) Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins, *J. Biol. Chem.* 276, 29575-29581.
12. Christopoulos, G., Perry, K. J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N. J., Main, M. J., Foord, S. M., and Sexton, P. M. (1999) Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product, *Mol. Pharmacol.* 56, 235-242.

13. Christopoulos, A., Christopoulos, G., Morfis, M., Udawela, M., Laburthe, M., Couvineau, A., Kuwasako, K., Tilakaratne, N., and Sexton, P. M. (2003) Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins, *J. Biol. Chem.* 278, 3293-3297.
14. Bouschet, T., Martin, S., and Henley, J. M. (2005) Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane, *J. Cell Sci.* 118, 4709-4720.
15. Terrillon, S. and Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization, *EMBO Rep.* 5, 30-34.
16. Sexton, P. M., Albiston, A., Morfis, M., and Tilakaratne, N. (2001) Receptor activity modifying proteins, *Cell Signal.* 13, 73-83.
17. Udawela, M., Hay, D. L., and Sexton, P. M. (2004) The receptor activity modifying protein family of G protein coupled receptor accessory proteins, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 299-308.
18. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer, *J. Biol. Chem.* 277, 44925-44931.
19. Gales, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T. E., and Bouvier, M. (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells, *Nat. Methods* 2, 177-184.
20. Charest, P. G. and Bouvier, M. (2003) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation, *J. Biol. Chem.* 278, 41541-41551.

21. Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y., and Maniatis, T. (1981) Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system, *Cell* 27, 279-288.
22. Durocher, Y., Perret, S., and Kamen, A. (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells, *Nucleic Acids Res.* 30, E9.
23. Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., and He, X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature* 407, 530-535.
24. Steiner, S., Born, W., Fischer, J. A., and Muff, R. (2003) The function of conserved cysteine residues in the extracellular domain of human receptor-activity-modifying protein, *FEBS Lett.* 555, 285-290.
25. Seck, T., Baron, R., and Horne, W. C. (2003) The alternatively spliced deltae13 transcript of the rabbit calcitonin receptor dimerizes with the C1a isoform and inhibits its surface expression, *J. Biol. Chem.* 278, 23085-23093.
26. Kraetke, O., Wiesner, B., Eichhorst, J., Furkert, J., Bienert, M., and Beyermann, M. (2005) Dimerization of corticotropin-releasing factor receptor type 1 is not coupled to ligand binding, *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 25, 251-276.
27. Ding, W. Q., Cheng, Z. J., McElhiney, J., Kuntz, S. M., and Miller, L. J. (2002) Silencing of secretin receptor function by dimerization with a misspliced variant secretin receptor in ductal pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res.* 62, 5223-5229.
28. Harikumar, K. G., Morfis, M. M., Lisenbee, C. S., Sexton, P. M., and Miller, L. J. (2006) Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-

coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors, *Mol. Pharmacol.* 69, 363-373.

29. Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J. F., Lagace, M., Marullo, S., and Bouvier, M. (2004) Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting, *J. Biol. Chem.* 279, 33390-33397.
30. Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation, *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 131-137.
31. Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C. (2000) ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 587-596.
32. Fiedler, K., Parton, R. G., Kellner, R., Etzold, T., and Simons, K. (1994) VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells, *EMBO J.* 13, 1729-1740.
33. Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999) The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins, *Nat. Cell Biol.* 1, 330-334.
34. Foord, S. M. and Marshall, F. H. (1999) RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 184-187.
35. Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins, *Science* 308, 512-517.
36. Rebois, R. V. and Hebert, T. E. (2003) Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction, *Receptors. Channels* 9, 169-194.

37. Nobles, M., Benians, A., and Tinker, A. (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18706-18711.

Table 1. Binding properties of *Rluc*- and GFP-fused RAMP1.

DNA constructs	Specific [¹²⁵ I]CGRP binding (fmol/well)	IC ₅₀ (nM)
CRLR	0.12 ± 0.06	2.4 ± 0.8 ^a
CRLR + RAMP1	2.45 ± 0.19	28.6 ± 6.7
CRLR + myc-RAMP1- <i>Rluc</i>	0.24 ± 0.04	4.6 ± 1.6 ^a
CRLR + myc-RAMP1-GFP	1.35 ± 0.38	25.7 ± 13.7
CRLR + myc-RAMP1Δ8-GFP	1.32 ± 0.27	7.1 ± 1.6

Specific binding was determined by subtracting the [¹²⁵I]CGRP binding obtained in the absence and presence of unlabeled 1 μM CGRP. IC₅₀ corresponds to the concentrations of unlabelled CGRP inhibiting 50% of the [¹²⁵I]CGRP binding. [¹²⁵I]CGRP was used at a tracer concentration of 200 pM. Conditions were selected such that the amount of receptor-bound radioligand is negligible (less than 6 %) compare to the total [¹²⁵I]CGRP added (ie: free ligand concentration ≈ total ligand concentration added). Specific binding represented 45% (CRLR alone), 93% (CRLR + RAMP1), 61% (CRLR + myc-RAMP1-*Rluc*), 89% (CRLR + myc-RAMP1-GFP) and 94% (CRLR + myc-RAMP1Δ8-GFP) of the total binding. In all cases, the difference between total and non-specific binding was statistically significant ($P < 0.05$; unpaired Student's t-test). Values are expressed as the mean ± S.E.M. calculated from three to four independent experiments, except for (^a) where the value is expressed as the mean ± S.D. calculated from two independent experiments.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cell surface targeting of *Rluc*- and GFP-fused CRLR and RAMP1.

HEK293T cells were transfected with myc-CRLR-*Rluc*, myc-CRLR-GFP, myc-RAMP1-*Rluc* or myc-RAMP1-GFP, alone or in combination with RAMP1 (in the case of myc-CRLR-*Rluc* and myc-CRLR-GFP), or CRLR (in the case of myc-RAMP1-*Rluc* and myc-RAMP1-GFP). Cellular localization of the fusion proteins was assessed by immunofluorescence confocal microscopy in intact (-) or permeabilized (+) cells, using anti-myc antibodies and Texas Red-conjugated secondary antibodies. The figures shown are representative of two independent experiments.

Figure 2. Signalling properties of *Rluc*- and GFP-fused CRLR.

HEK293T cells transfected with the empty vector (mock) or the indicated plasmids were stimulated with increasing concentrations of CGRP and the cAMP production was measured. The curves shown represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

Figure 3. Interaction between CRLR and RAMP1 assessed by BRET.

BRET titration curves were obtained using cells transfected with a constant amount of myc-CRLR-*Rluc* and increasing amount of either myc-RAMP1-GFP or LRP6-GFP. BRET values are plotted as a function of the ratio of total GFP over *Rluc* expression obtained by measuring the total fluorescence and luminescence in each condition. Data points obtained in three to four independent experiments were pooled and used to generate the curves.

Figure 4. Cell surface targeting of RAMP1.

HEK293T cells were transfected with increasing amount of myc-RAMP1-GFP alone or in combination with fix amount of CRLR. Cell surface expression of myc-RAMP1-GFP was assessed by ELISA detection of the myc epitope and correlated with its total expression

level determined by measuring the GFP fluorescence. Data points obtained in three independent experiments were pooled and used to generate the curves.

Figure 5. RAMP1C104A cell surface targeting and interaction with CRLR.

A) HEK293T cells were transfected with a fix amount of CRLR and increasing amounts of either myc-RAMP1-GFP or myc-RAMP1C104A-GFP. Cell surface expression of the RAMP1 constructs was assessed by ELISA detection of the myc epitope and correlated with their total expression levels by measuring the GFP fluorescence. B) BRET titration curves were obtained using cells transfected with a constant amount of myc-CRLR-*Rluc* and increasing amount of either myc-RAMP1-GFP, myc-RAMP1C104A-GFP or LRP6-GFP. BRET values are plotted as a function of the ratio of total GFP over *Rluc* expression obtained by measuring the total fluorescence and luminescence in each condition. The $BRET_{max}$ and $BRET_{50}$ values were derived from non-linear least-squares regressions curve fitting (GraphPad Prism). $BRET_{max}$: 0.55 ± 0.03 for myc-RAMP1-GFP and 0.32 ± 0.02 for myc-RAMP1C104A-GFP. $BRET_{50}$: 0.16 ± 0.04 for myc-RAMP1-GFP and 0.05 ± 0.02 for myc-RAMP1C104A-GFP. Data points obtained in three independent experiments were pooled and used to generate the curves.

Figure 6. Homo-dimerization of CRLR.

A) BRET titration curves were obtained using cells transfected with a constant amount of myc-CRLR-*Rluc* and increasing amount of either myc-CRLR-GFP or Fz1-GFP. BRET values are plotted as a function of the ratio of total GFP over *Rluc* expression obtained by measuring the total fluorescence and luminescence in each condition. Data points obtained in four to nine independent experiments were pooled and used to generate the curves. B) HA-tagged receptors were immunoprecipitated from cells transfected with the indicated constructs and the myc (lanes 1 to 4) and the HA (lanes 7 and 8) associated immunoreactivity were revealed by Western blot analysis. The presence of myc-CRLR in

cells extract was also revealed by Western blot analysis (lanes 5 and 6). The results shown are representative of three independent experiments.

Figure 7. Homo- and hetero-dimerization of RAMP1.

BRET titration curves were obtained using cells transfected with a constant amount of myc-RAMP1-*Rluc* and increasing amount of either myc-RAMP1-GFP (A), RAMP2-GFP (B), RAMP3-GFP (C) or LRP6-GFP (A, B, C). BRET values are plotted as a function of the ratio of total GFP over *Rluc* expression obtained by measuring the total fluorescence and luminescence in each condition. The inset corresponds to the enlargement of the region delineated by the dotted line. Data points obtained in four to nine independent experiments were pooled and used to generate the curves.

Figure 8. Cell surface targeting and dimerization of RAMP1 Δ 8.

A) HEK293T cells were transfected with increasing amount of myc-RAMP1-GFP or myc-RAMP1 Δ 8-GFP. Cell surface expression of these proteins was assessed by ELISA detection of the myc epitope and correlated with their total expression level determined by measuring the total fluorescence of GFP. Data points obtained in two independent experiments were pooled and used to generate the curves. B) BRET values, as well as total fluorescence and luminescence levels, were measured in cells expressing HA-RAMP1-*Rluc* in combination with either myc-RAMP1 Δ 8-GFP or LRP6-GFP. The total fluorescence/luminescence ratios for each condition are given under the bars corresponding to the BRET values. The data shown represent the mean \pm S.E.M. of three to four independent experiments.

Figure 9. Influence of WT-RAMP1 co-expression on RAMP1 Δ 8 cell surface targeting.

HEK293T cells were transfected with increasing amount of myc-RAMP1 Δ 8-GFP alone or in combination with a fix amount of HA-RAMP1-*Rluc*. Cell surface expression of myc-

RAMP1 Δ 8-GFP was assessed by ELISA detection of the myc epitope and correlated with its total expression level by measuring total fluorescence from the GFP. Data points obtained in three independent experiments were pooled and used to generate the curves

Figure 10. CRLR/RAMP1 signalling complexes assessed by BRET.

HEK293T cells were transfected with myc-CRLR-GFP and either the $G\gamma_2$ -Rluc, $G\beta_1$ and $G\alpha_s$ complex (A), or β -arrestin2-Rluc (B). The BRET values were determined in the absence (-RAMP1) or presence (+RAMP1) of co-transfected RAMP1, 10 min after stimulation with different concentrations of CGRP. GFP and Rluc fusion protein expression levels were controlled by measuring the total fluorescence and luminescence, and were found to be similar in the presence and absence of co-transfected RAMP1. The inset in (A) illustrates the agonist-promoted increase in BRET signal expressed as a percentage of the basal BRET value obtained in the absence of ligand. The EC_{50} values derived from these curves are: 16.1 ± 13.4 nM for $G\gamma_2$ -Rluc/myc-CRLR-GFP and 2.8 ± 0.5 nM for β -arrestin2-Rluc/myc-CRLR-GFP, both in the presence of RAMP1. The data shown represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

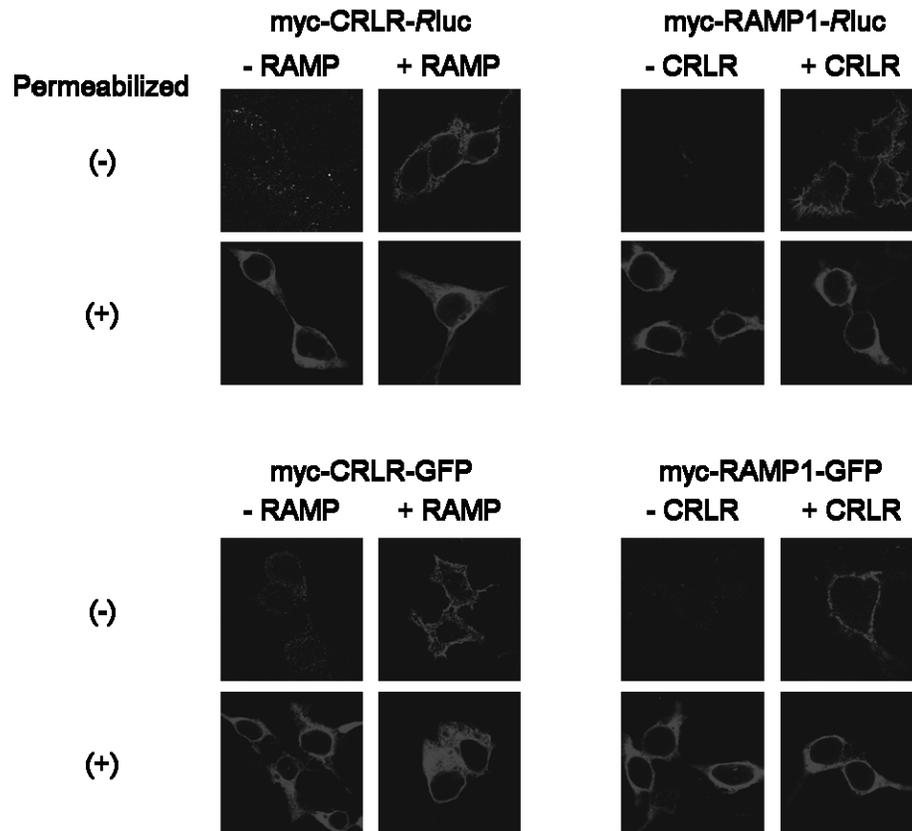
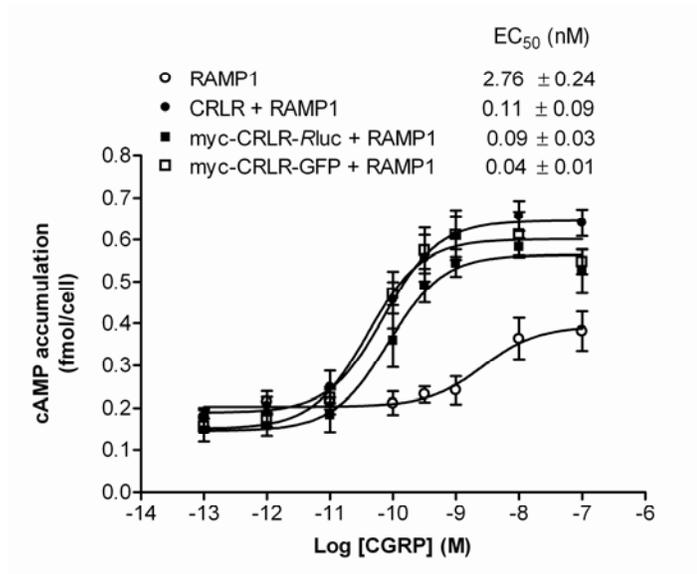
FIGURE 1

FIGURE 2

A



B

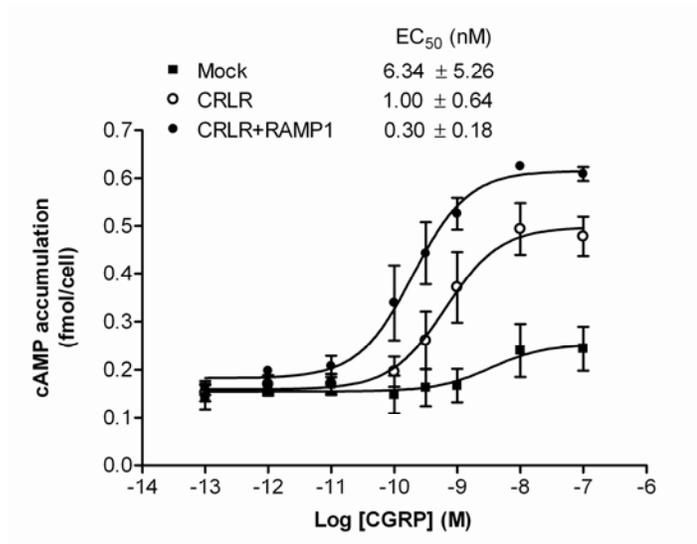


FIGURE 3

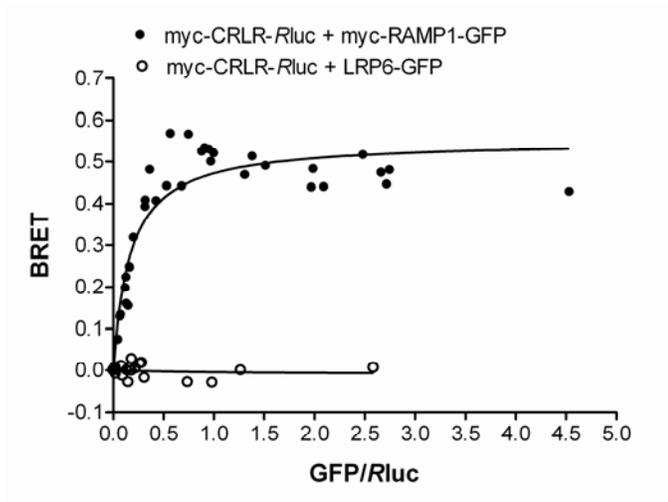


FIGURE 4

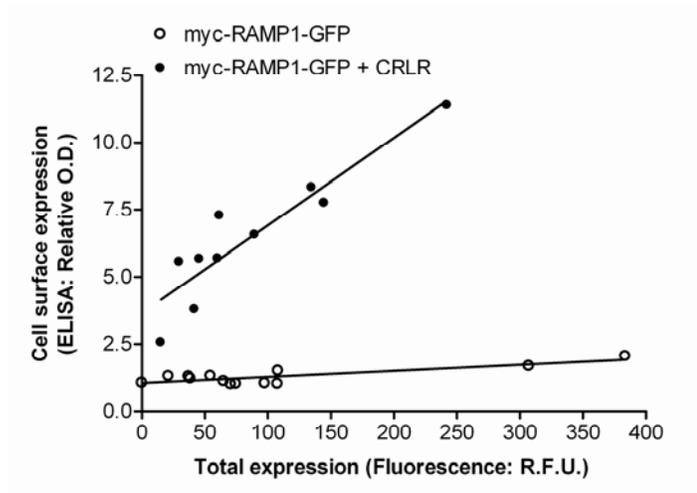
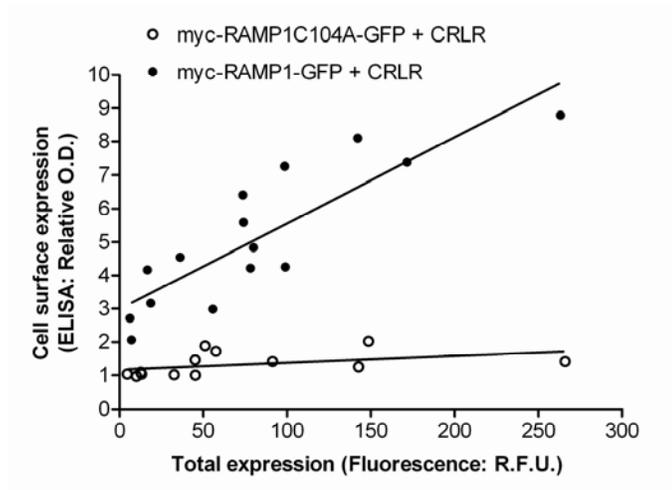


FIGURE 5

A



B

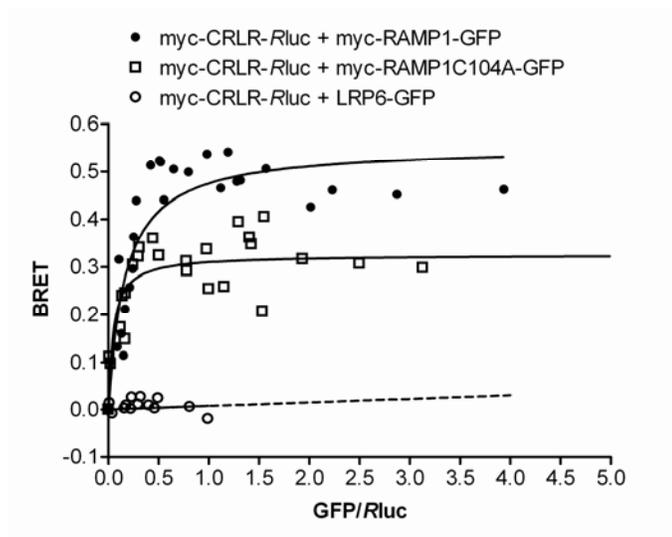
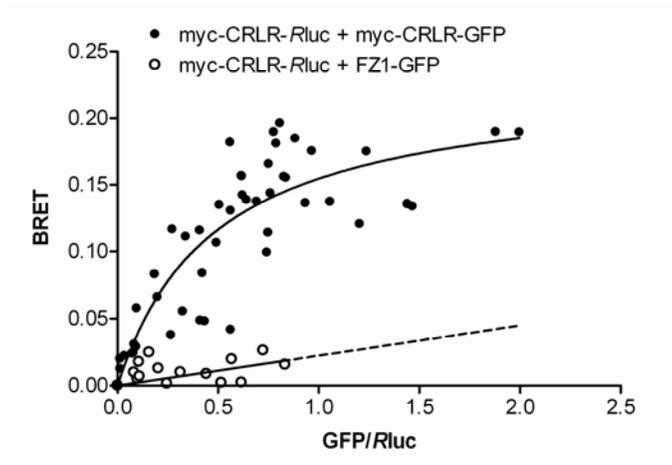


FIGURE 6

A



B

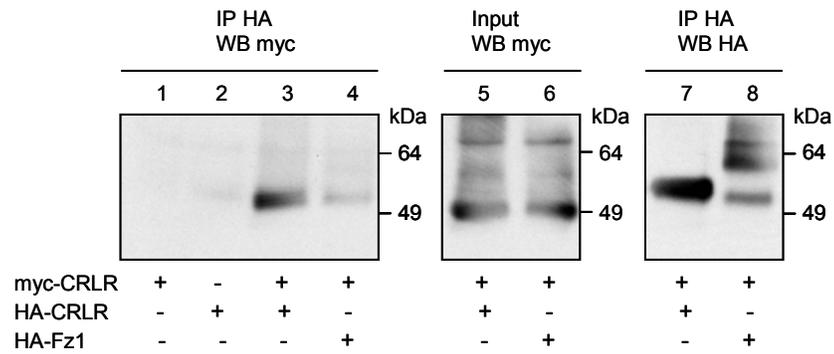
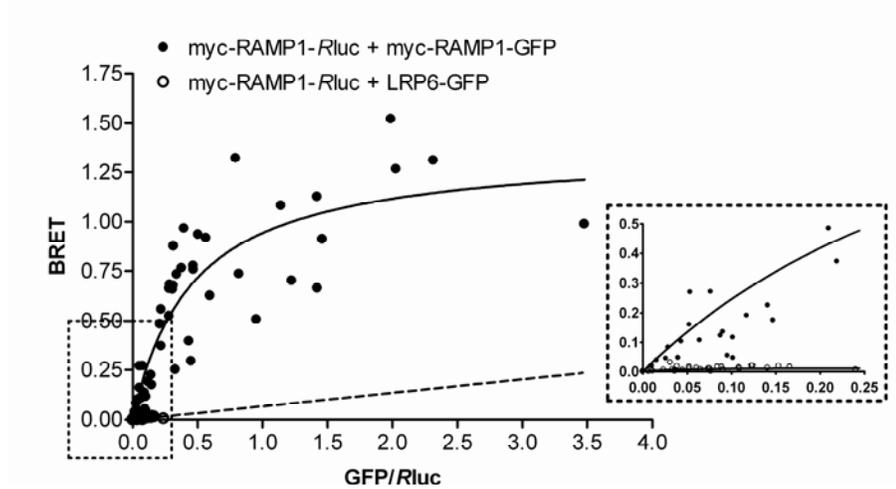


FIGURE 7

A



B

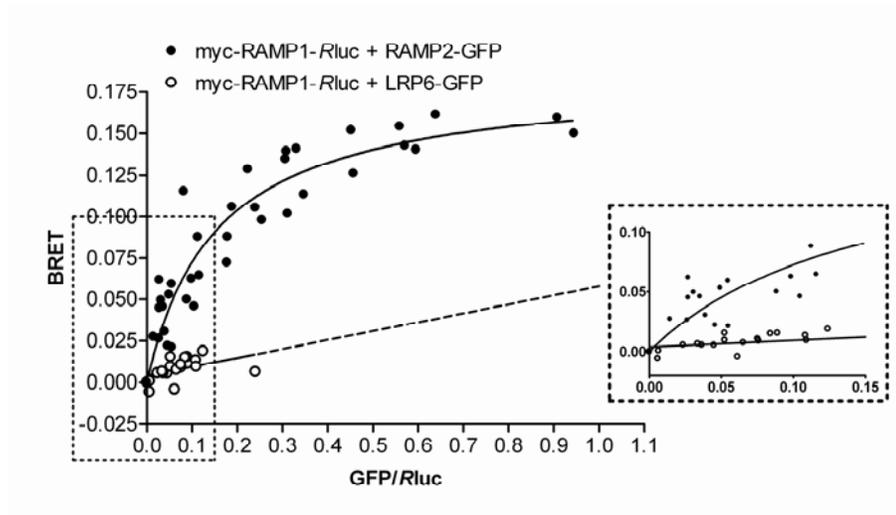


FIGURE 7

C

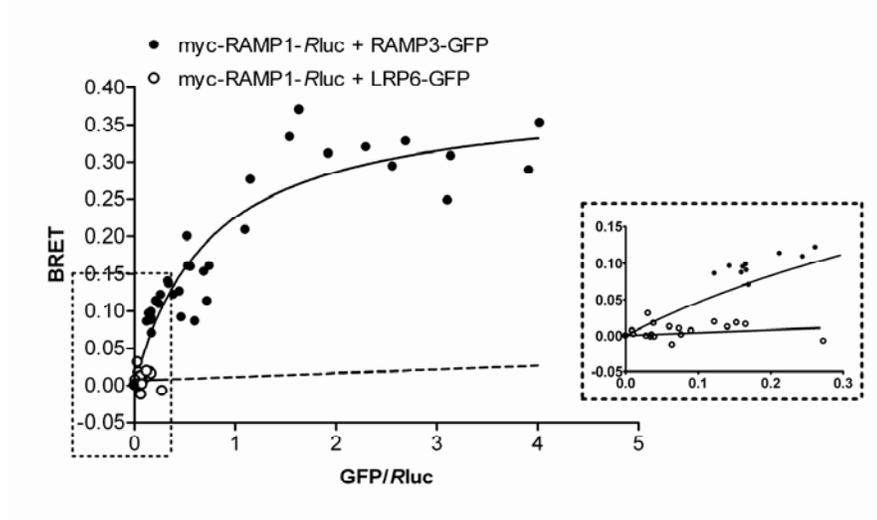
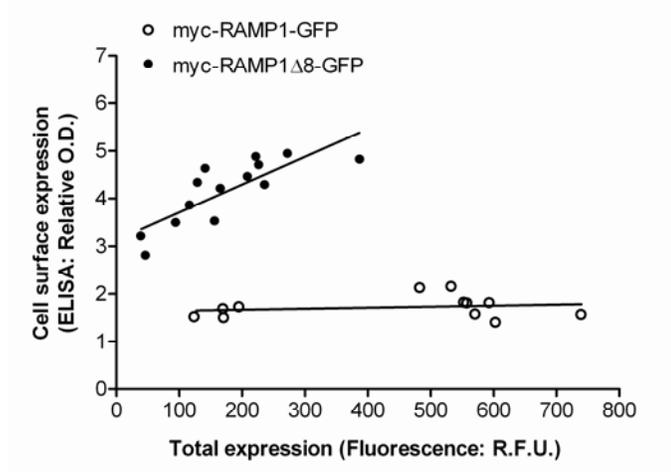


FIGURE 8

A



B

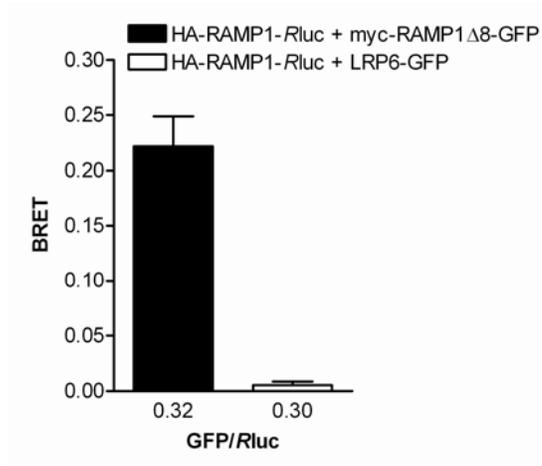


FIGURE 9

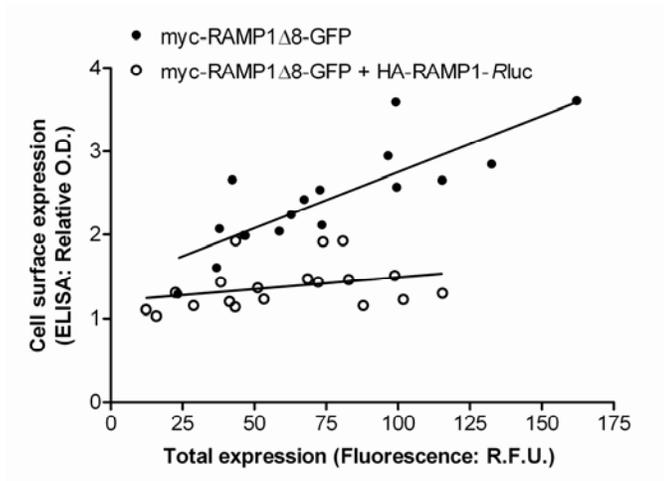
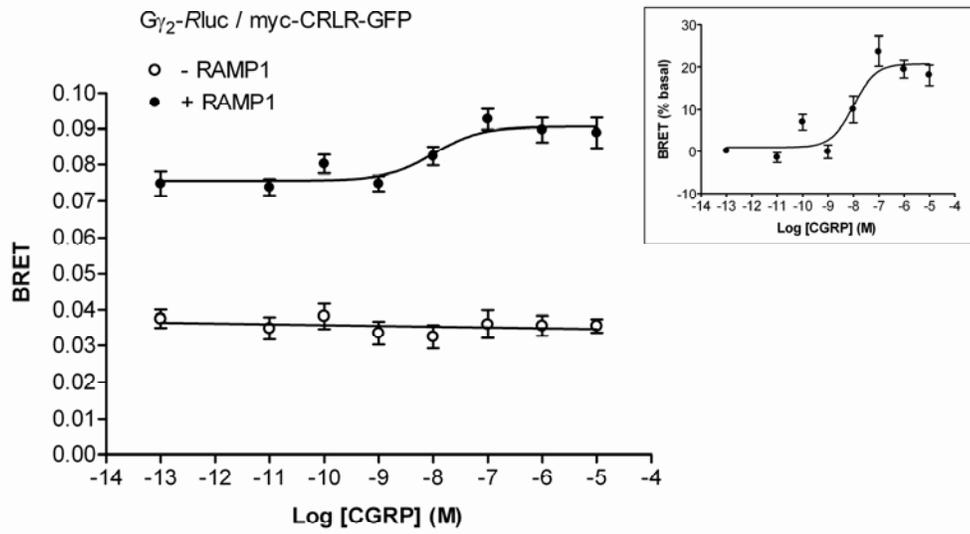
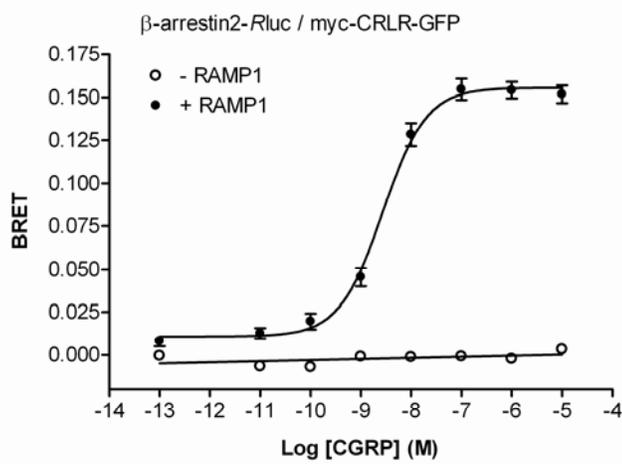


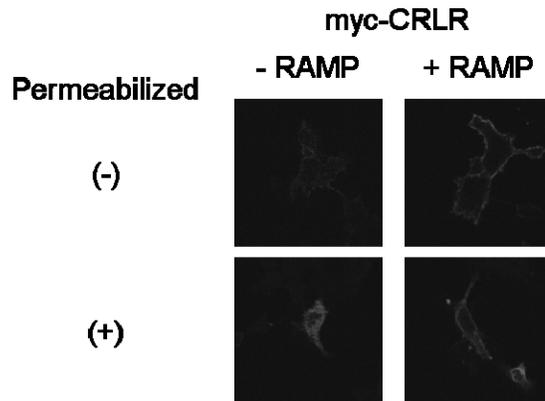
FIGURE 10

A



B



SUPPORTING INFORMATION**Figure S1. Cell surface targeting of myc-CRLR.**

HEK293T cells were transfected with myc-CRLR alone or in combination with RAMP1. Cellular localization of myc-CRLR was assessed by immunofluorescence confocal microscopy in intact (-) or permeabilized (+) cells, using anti-myc antibodies and Texas Red-conjugated secondary antibodies.

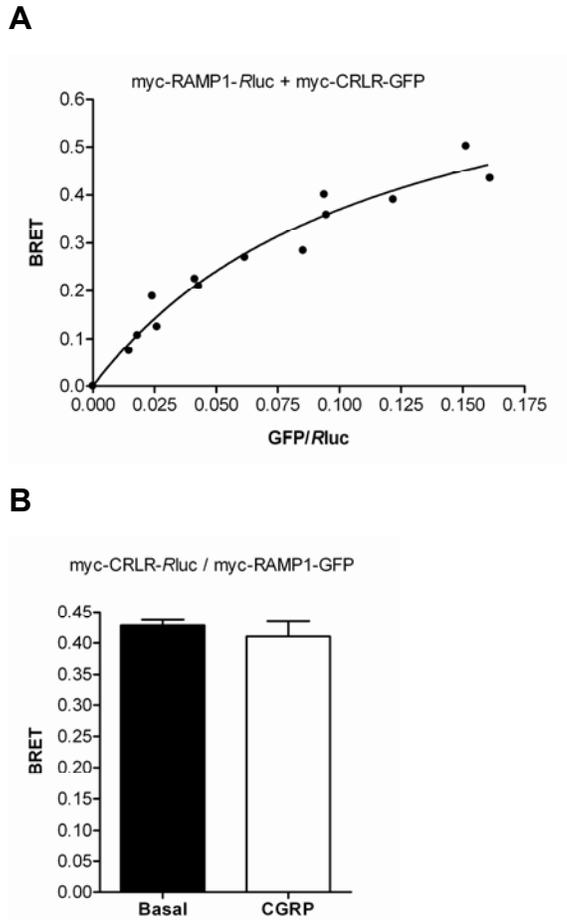


Figure S2.

A) Interaction between myc-RAMP1-Rluc and myc-CRLR-GFP assessed by BRET. BRET titration curve was obtained using cells transfected with a constant amount of myc-RAMP1-Rluc and increasing amount of myc-CRLR-GFP. BRET values are plotted as a function of the ratio of total GFP over Rluc expression obtained by measuring the total fluorescence and luminescence in each condition. Data points obtained in three independent experiments were pooled and used to generate the curve.

B) Influence of CGRP on the BRET between myc-CRLR-Rluc and myc-RAMP1-GFP. BRET was assessed on membranes prepared from HEK293T cells expressing myc-CRLR-Rluc and myc-RAMP1-GFP, 10 min after stimulation with 1 μ M of CGRP. The data shown represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

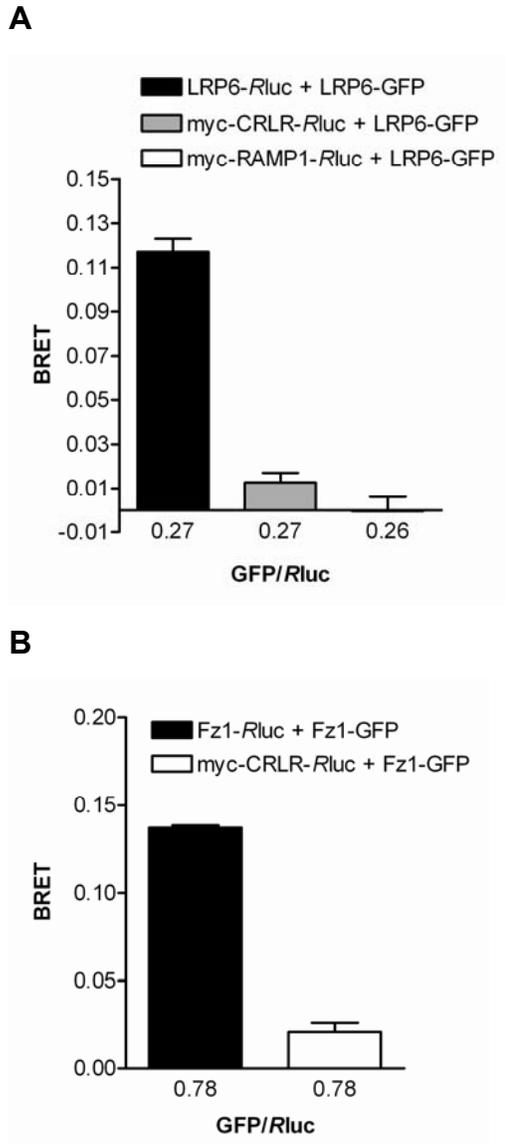


Figure S3. Homo-dimerization of LRP6 and Fz1.

BRET values, as well as total fluorescence and luminescence levels, were measured in cells expressing LRP6-GFP (A) in combination with either LRP6-Rluc, myc-CRLR-Rluc or myc-RAMP1-Rluc, or Fz1-GFP (B) in combination with either Fz1-Rluc, myc-CRLR-Rluc or myc-RAMP1-Rluc. The total fluorescence/luminescence ratios for each condition are given under the bars corresponding to the BRET values. The data shown represent the mean \pm S.E.M. of two to three independent experiments.

Article 2

Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1.

Madeleine Héroux, Mireille Hogue, Sébastien Lemieux et Michel Bouvier. *J. Biol. Chem.* 282 : 31610 (2007).

Durant la dernière décennie, l'émergence du concept d'oligomérisation des RCPGs a amené une nouvelle façon de concevoir cette grande famille de récepteurs membranaires, suite au rôle majeur que jouent ces assemblages multi-protéiques dans la transduction de la signalisation. L'étude précédente a permis de démontrer que l'assemblage des récepteurs en hétéro-oligomères obligatoires avec des protéines accessoires à 1TM ainsi que l'association de ces récepteurs avec d'autres RCPGs, ne représentent pas des phénomènes exclusifs l'un de l'autre, puisque ceux-ci peuvent coexister chez un même récepteur, comme dans le cas du CLR, qui peut à la fois interagir avec les RAMPs et former des homo-oligomères CLR/CLR. De façon similaire, en plus de s'associer avec le CLR, les RAMPs peuvent aussi interagir entre eux pour former des homo-oligomères RAMP/RAMP.

Cette découverte de l'homo-oligomérisation du CLR et du RAMP1 entraîne la question de la stoechiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1, à savoir est-ce que le CLR et le RAMP1 s'associent ensemble sous forme d'homo-oligomères? Afin de déterminer si plusieurs molécules de CLR et de RAMP1 forment le complexe récepteuriel *in vivo*, nous avons dû recourir à une nouvelle approche permettant l'étude d'interactions entre trois protéines simultanément dans un contexte de cellules vivantes. En effet, comme mentionné dans l'introduction (section 2.1.1), les techniques disponibles jusqu'à

maintenant pour l'étude de l'oligomérisation se limitaient à l'interaction entre deux protéines uniquement. Nous avons donc combiné l'approche de BRET avec celle de BiFC, pour obtenir une technique baptisée « BRET/BiFC » permettant la détection de trimères, afin de déterminer l'arrangement stœchiométrique du récepteur du CGRP.

À partir de cette nouvelle approche de BRET/BiFC, ainsi que des études de compétition de BRET, d'immunoprécipitation et d'imagerie de BiFC, nous avons pu démontrer que le complexe CLR/RAMP1 est formé d'un homo-oligomère de CLR interagissant avec un monomère de RAMP1.

**FUNCTIONAL CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE RECEPTORS
ARE FORMED BY THE ASYMMETRIC ASSEMBLY OF A CALCITONIN
RECEPTOR-LIKE RECEPTOR HOMO-OLIGOMER AND A MONOMER OF
RECEPTOR ACTIVITY-MODIFYING PROTEIN-1***

Madeleine Héroux[†], Mireille Hogue[†], Sébastien Lemieux[‡] and Michel Bouvier^{†,1}

From the [†]Department of Biochemistry and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament and [‡]Department of Computer Science and Operations Research, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Running Title: Asymmetrical assembly of the CRLR/RAMP1 complex

¹To whom correspondence should be addressed at: Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7. Tel: 514-343-6319; Fax: 514-343-6843; E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca.

In addition to their interactions with hetero-trimeric G proteins, seven transmembrane domain receptors are now known to form multimeric complexes that can include receptor homo- or hetero-oligomers and/or accessory proteins that modulate their activity. The calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor requires the assembly of the seven transmembrane domain calcitonin receptor-like receptor (CRLR) with the single transmembrane domain receptor activity-modifying protein-1 (RAMP1) to reach the cell surface and be active. However, the relative stoichiometric arrangement of these two proteins within a receptor complex remains unknown. Despite recent advances in the development of protein-protein interactions assays, determining the composition and stoichiometric arrangements of such signalling

complexes in living cells remains a challenging task. In the present study, we combined bimolecular fluorescence complementation (BiFC) with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) to probe the stoichiometric arrangement of the CGRP receptor complex. Together with BRET competition assays, co-immunoprecipitation experiments and BiFC imaging, dual BRET/BiFC revealed that functional CGRP receptors result from the association of a homo-oligomer of the CRLR with a monomer of the accessory protein RAMP1. In addition to reveal the existence of an unexpected asymmetric oligomeric organization for a GPCR, our study illustrates the usefulness of dual BRET/BiFC as a powerful tool for analysing constitutive and dynamically regulated multiprotein complexes.

Increasing evidence indicates that “signalosomes”, regrouping different components of a signalling pathway into multiprotein complexes with well defined stoichiometries, play crucial roles in defining the specificity and efficacy of signal transduction (1;2). For instance, the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor results from the association of the calcitonin receptor-like receptor (CRLR), a seven transmembrane domain (7TM) receptor belonging to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR), with a one transmembrane domain protein, the receptor activity-modifying protein-1 (RAMP1), which is part of a three member family (RAMP1, -2, and -3). When expressed individually, both CRLR and RAMP1 are retained intracellularly in the endoplasmic reticulum (ER) whereas their association permits their common plasma membrane targeting and determines the pharmacological properties of the receptor (3-5). From these data, it was proposed that the formation of a functional CGRP receptor requires a 1:1 stoichiometric association of CRLR and RAMP1. Consistent with this idea, cross-linking experiments, using bivalent reagents, captured complexes consisting of one CRLR and one RAMP1 molecule (6). However, the observation that both CRLR and RAMP1 can form homo-oligomers (often refer to as dimers) when expressed alone (3;6-8) adds a new level of complexity that re-actualize the question of the number of CRLR and RAMP1 molecules forming the receptor complex in

living cells. The present study was therefore undertaken to probe the composition and relative stoichiometric arrangement of the CGRP receptor.

Despite the emergence of several cell-based techniques to detect protein-protein interactions (9-11), the lack of assays monitoring interactions between more than two proteins simultaneously makes stoichiometric analysis of protein complexes in living cells a challenging endeavour. Among the techniques used to study protein-protein interactions in living cells, resonance energy transfer (RET) and protein fragments complementation assays (PCA) are gaining in popularity. RET approaches rely on the non-radiative transfer of energy between luminescent and/or fluorescent donor and acceptor molecules that are attached to potential protein partners (12). For PCA, the reconstitution of a reporter protein (typically an enzyme) from its two fragments attached to the potential protein partners under study is taken as evidence for interactions between the partners (9). The development of a protein complementation assay known as bimolecular fluorescence complementation (BiFC), based on the reconstitution of a yellow fluorescent protein (YFP) upon re-association of its two fragments (13), opens the possibility of combining this technology with resonance energy transfer approaches to probe interactions between at least three partners at the same time in living cells. (14;15). Taking advantage of this possibility, we combined BiFC with a bioluminescence resonance energy transfer assay (BRET¹) that uses *Renilla* luciferase (*Rluc*) and YFP as the energy donor and acceptor, respectively. Using this dual BRET/BiFC approach in combination with BRET competition, co-immunoprecipitation, and subcellular distribution microscopy studies, we found that at least two molecules of CRLR associate with a single molecule of RAMP1 to generate an asymmetrical oligomeric complex that can reach the cell surface as a functional entity. In addition to shed new light on the CGRP receptor structure, the present study demonstrates that it is possible to combine BiFC and BRET in a single assay to probe the composition of signalling complexes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression vectors - Plasmids encoding CRLR, RAMP1, Myc-CRLR and Myc-RAMP1 were generously provided by S.M. Foord (GlaxoSmithKline), CRLR-YFP by P.M. Sexton (Monash University, Clayton, Australia), Fz1-Rluc and Fz4m by R.T. Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, USA), CD8-C1 by R.C. Malenka (Stanford University School of Medicine, Palo Alto, USA) and YFP BiFC fragments by T.K. Kerppola (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, USA). GABA_BR1-Rluc and β -arrestin2-Rluc were previously described (16). Myc-CRLR-Rluc, Myc-RAMP1-Rluc and HA-RAMP1-Rluc (thereafter called CRLR-Rluc, RAMP1-Rluc and HA-RAMP1, respectively) have also been previously described (8). The RAMP1-YFP was generated by subcloning the coding sequence of enhanced YFP at the C-terminus of Myc-RAMP1, yielding a five amino acids linker encoding VPVAT between the two proteins. To obtain the CRLR, RAMP1 and CD8-C1 BiFC constructs, the cDNAs encoding amino acids residues 1-154 (YN) and 145-238 (YC) of enhanced YFP were fused at the C-terminus of Myc-CRLR, Myc-RAMP1 and CD8-C1, creating a 10 amino acids linker encoding VPVNSGGGGS between the CRLR, RAMP1 or CD8-C1 and the YFP fragment. The two YFP fragments provide a 10 amino acids overlapping region (145-154) that facilitates complementation (17).

Cell culture and transfections - Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) and simian kidney fibroblasts (COS7) were maintained as described previously (8). Transfections were performed using the calcium phosphate precipitation method for HEK293T cells (18) or the FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) for COS7 cells, according to manufacturer's protocol. Transfected cells were incubated at 37°C for 24 h and switched at 30°C for another 24 h to promote maturation of the YFP

fluorophore in BiFC experiments (17). For other experiments, transfected cells were incubated at 37°C for 48 h.

Radio-ligand binding - Transfected HEK293T cells were washed three times with cold PBS and incubated on ice for 3 h in binding buffer (DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES pH 7.4) with 200 pM [¹²⁵I]CGRP (GE Healthcare Life Sciences), in the absence (total binding) or presence of increasing concentrations of unlabeled CGRP (Bachem AG). Non-specific binding was defined as binding in the presence of 1 μM unlabeled CGRP. After incubation, cells were washed once with binding buffer, twice with PBS and then solubilized with 0.5 M NaOH. The associated cellular radioactivity was measured in a γ-counter.

BRET titration curves and BRET/BiFC assays - Transfected HEK293T cells were washed twice with PBS, detached and resuspended in PBS containing 0.1% glucose. Cells were then distributed in 96-well plates (100 000 cells/well) (white plates from Corning) and coelenterazine H (Molecular Probes) was added at a final concentration of 5 μM. Readings were collected immediately following coelenterazine H addition using a Mithras LB 940 instrument (Berthold Technologies). The BRET signal corresponds to the ratio of the light emitted by the YFP (510-550 nm) over the light emitted by the Rluc (460-500 nm). The values were corrected by subtracting the background BRET signal detected when Rluc constructs were expressed alone. For BRET titration curve experiments, cells were transfected with a constant amount of Rluc construct and increasing quantities of YFP construct. For competition assays, a constant amount of the competitor construct was also co-transfected. Total luminescence and fluorescence were measured (see below) to control for relative expression levels of donor and acceptor proteins, respectively. BRET values were then plotted as a function of the total fluorescence/luminescence ratios (YFP/Rluc) (19). For BRET/BiFC experiments, cells were transfected with the different Rluc, YN and

YC constructs. Total luminescence and fluorescence were measured to control for relative expression level of *Rluc* fusion proteins and reconstitution of YFP from YN- and YC-fused proteins, respectively. For β -arrestin2 recruitment experiments, cells distributed in 96-well plates were first treated with α CGRP (Bachem AG) for 10 min before addition of coelenterazine H and BRET reading.

Total fluorescence and luminescence measurements - Transfected HEK293T cells resuspended in PBS 0.1% glucose were distributed in 96-well plates (100 000 cells/well) (white plates clear bottom from Corning) and total fluorescence, emitted by YFP constructs or reconstituted YFP from YN and YC constructs, was measured using a FluoroCount (Packard Bioscience) with excitation and emission filters set at 485 nm and 530 nm, respectively. The values were corrected by subtracting the background signal detected in cells that were not transfected with YFP or BiFC constructs. Cells were then incubated for 10 min with coelenterazine H at a final concentration of 5 μ M and total luminescence was determined using a LumiCount (Packard Bioscience).

Fluorescence imaging - COS7 cells expressing the different fusion proteins were fixed and analysed by confocal laser-scanning microscopy using a LSM 510 META Zeiss. YFP fluorescence was measured after excitation at 488 nm with a 505-530 nm emission filter, while DsRed fluorescence was detected after excitation at 543 nm with a 560 nm long pass emission filter.

Co-immunoprecipitation - Transfected HEK293T cells were lysed for 1 hour at 4°C in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM iodoacetamide, 10 μ g/ml benzamidine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor and 5 μ g/ml leupeptin) and centrifuged at 150 000 x g for 1 h at 4°C in order to

remove unsolubilized material. Protein concentration of the lysates was determined and the total fluorescence emitted by reconstituted YFP was measured for each condition by distributing 130 μ g of lysate in 96-well plates (see above). For each condition, the same quantity of lysate was then incubated overnight at 4°C with immobilized anti-HA rat antibodies (Roche Molecular Biochemicals). Antibody/antigen complexes were washed four times with cold RIPA buffer containing 150, 250, 350 and finally 150 mM NaCl, respectively, and transferred to 96-well plates in order to measure the total fluorescence emitted by reconstituted YFP associated with the immunoprecipitate. In order to control for the amount of HA-RAMP1 immunoprecipitated in each condition, antibody/antigen complexes were then resuspended in sample buffer (60 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 4.5 M urea and 100 mM dithiothreitol), resolved onto 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting using rabbit anti-HA antibodies (1/10 000; Santa Cruz Biotechnology).

Statistical analysis - In Fig. 1, multiple non-linear regression analysis were performed using a bootstrap strategy in order to determine whether the $BRET_{max}$ and $BRET_{50}$ values obtained for each curves were significantly different. Non-linear regressions were generated using equation (A) where $BRET_{max}$ and $BRET_{50}$ parameters were optimized using the Levenberg-Marquardt method (20) following the implementation proposed by Press et al. (21). Using resampling with replacement (22), 100,000 bootstrap repetitions of this procedure were executed. The generated curves correspond to the optimal fit obtained from the data whereas the grey zones represent 0.05 to 0.95 percentiles of the 100,000 curves, calculated for each YFP/Rluc data points. Significance of the difference in $BRET_{max}$ and $BRET_{50}$ is quantified by P values that are determined by a one-sided resampling-based test carried out on 1,000,000 repetitions. The P values were obtained by counting the proportion of fitted $BRET_{max}$ or $BRET_{50}$ values that were not greater for the experimental conditions (ie: in the presence of RAMP1, CD8-C1, CRLR or Fz4m) than for the control

data set (ie: in the presence of empty vector). A P value below 0.05 was considered significant.

$$(A) \quad BRET = \frac{BRET_{\max} \cdot x}{BRET_{50} + x}, \text{ where } x \text{ is the YFP/Rluc ratio.}$$

In Fig. 2, 4, 5, 6 and 8 data represent the mean \pm S.E.M. calculated from three to four independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using ANOVA followed by Dunnett's test (Fig. 2 and 5), or student's t test (Fig. 4 Inset and 6).

RESULTS

Probing CRLR and RAMP1 interactions using BRET competition assays - Previous studies have indicated that both CRLR and RAMP1 can form homo-oligomers when expressed alone (3;6-8), raising questions about the oligomeric composition of the CRLR/RAMP1 complex. To examine whether the association of CRLR with RAMP1 competes with the homo-oligomerization of each of the partners or results from the association between homo-oligomers, we performed BRET competition assays that assess the effect of CRLR and RAMP1 co-expression on their homo-oligomerization status. For this purpose, CRLR and RAMP1 were genetically fused at their C-terminus to either the energy donor (*Rluc*) or acceptor (*YFP*). Such fusion did not significantly affect the normal subcellular distribution of CRLR or RAMP1, nor their ability to confer CGRP binding upon co-expression ((8) and data not shown). BRET titration curves were generated by expressing a constant level of the donor fusion protein and increasing amounts of the protein attached to the acceptor. As can be seen in Fig. 1, for both the CRLR-*Rluc*/CRLR-*YFP* and RAMP1-*Rluc*/RAMP1-*YFP* pairs, BRET signals increased as a hyperbolic function of the acceptor concentration (expressed as *YFP/Rluc*), representing the progressive engagements of the energy donors by the acceptor. Whereas the value of the curve asymptotes ($BRET_{\max}$) reflects the orientation and distance between the energy donor

and acceptor within the dimer, the concentration of acceptor/donor (YFP/*Rluc*) yielding 50% of the $BRET_{max}$ ($BRET_{50}$) indicates the relative amount of YFP-fused partner needed to saturate the energy donor (19). It should therefore be emphasized that the lower $BRET_{max}$ value observed for CRLR-*Rluc*/CRLR-YFP compared to RAMP1-*Rluc*/RAMP1-YFP is not an indication of a lower propensity to form oligomers but most likely reflects distinct relative position of the energy donor and acceptor within the oligomers.

To assess the influence of CRLR/RAMP1 complex formation on the homo-oligomerization profiles of both CRLR and RAMP1, the BRET titration curves were carried out in the presence of their untagged reciprocal partner (RAMP1 in the case of the CRLR-*Rluc*/CRLR-YFP and CRLR for the RAMP1-*Rluc*/RAMP1-YFP). If the association of CRLR with RAMP1 occurs at the expense of homo-oligomerization, the addition of a constant amount of untagged reciprocal partner would be predicted to cause a rightward shift in the BRET titration curve (increase in $BRET_{50}$) resulting from the scavenging of the YFP and *Rluc* fusion proteins by the untagged partner. Indeed, the reduction in the proportion of fusion proteins available for RET would lead to an increase in the YFP/*Rluc* ratio needed to reach $BRET_{max}$ values. In contrast, change in $BRET_{max}$ in the absence of $BRET_{50}$ modification would suggest a conformational rearrangement of the complex resulting from the association of the homo-oligomers with the untagged reciprocal partner leading to a change in the orientation and/or the distance between YFP and *Rluc* within the oligomeric complex. To determine whether the $BRET_{max}$ and $BRET_{50}$ values obtained for each curves were significantly affected by the addition of the untagged reciprocal partners, multiple repeated non-linear regression analysis of the BRET titration curves were performed using a bootstrap strategy described in the methods section.

Co-expression of RAMP1 in CRLR-*Rluc*/CRLR-YFP expressing cells led to a significant increase in $BRET_{max}$ without significantly affecting the $BRET_{50}$ (Fig. 1A), indicating that RAMP1 did not compete for CRLR homo-oligomerization but promoted a conformational change leading to a better orientation for RET or a smaller distance between YFP and *Rluc* within the CRLR/CRLR oligomer. To verify the selectivity of

action of RAMP1, we assessed the effect of another single transmembrane protein, CD8, which, similarly to RAMP1 and CRLR expressed alone, is retained in the ER as a result of its fusion to the C1 cassette of the NMDA receptor NR1 subunit (CD8-C1 (23)). Although properly expressed, as assessed by western blot analysis (data not shown) and fluorescence microscopy (see Fig. 3 below), CD8-C1 was without effect on the CRLR-*Rluc*/CRLR-YFP BRET titration curve, confirming that over-expressing a protein in the ER is not sufficient to affect the BRET signals.

When considering the RAMP1-*Rluc*/RAMP1-YFP pair, co-transfection of CRLR promoted a significant rightward shift in the titration curve (increase in BRET₅₀) with no change in the BRET_{max} (Fig. 1B) indicating that the presence of CRLR reduced the fraction of RAMP1 partners available for RET, thus suggesting that CRLR competes for RAMP1 homo-oligomerization. Although the change in BRET₅₀ is relatively modest (2.3 fold), bootstrapping analysis of the curves, determined by a one-sided re-sampling-based test, indicated that the difference between the curves carried out in the presence and absence of CRLR was highly significant ($P = 3 \times 10^{-6}$). The selectivity of RAMP1 homo-oligomerization competition by CRLR was assessed by evaluating the effect of an unrelated 7TM receptor, Frizzled 4, which was truncated from its last four amino acids (Fz4m) to mimic the intracellular localization of RAMP1 and CRLR expressed alone (24). As can be seen in Fig. 1B, the expression of Fz4m, which was confirmed by immunofluorescence microscopy (data not shown), did not significantly affect the RAMP1-*Rluc*/RAMP1-YFP BRET titration curve.

Taken together, the BRET competition assays indicate that RAMP1 association to the complex can occur without dissociation of the CRLR homo-oligomer, whereas CRLR interaction with RAMP1 appears to interfere with the formation of RAMP1 homo-oligomers. These data are compatible with an asymmetrical complex model whereby one molecule of RAMP1 associates with a CRLR homo-oligomer.

Establishing the BiFC assay for detection of the CRLR and RAMP1 homo- and hetero-oligomers - Although the BRET competition assays described above suggest that the CGRP receptor is formed by a CRLR homo-oligomer associated to a RAMP1 monomer, it does not provide a direct proof of the existence of such an asymmetric complex. To directly test this model, we combined the use of BRET and BiFC to probe the simultaneous interaction between three proteins. The dual BRET/BiFC approach is based on the transfer of energy between the luminescent enzyme *Rluc* and YFP reconstituted as a result of BiFC. In these experiments, the YFP is split in two parts (designated amino- (YN) and carboxyl- (YC) terminal fragments) that are each expressed as fusion proteins to the carboxyl end of CRLR and RAMP1. To verify the functionality of the fusion proteins, we assessed the ability of the different CRLR/RAMP1 BiFC combinations to confer radio-ligand binding. As can be seen in Fig. 2, fusion of YN and YC fragments did not prevent CRLR or RAMP1 to associate into a ligand binding competent CGRP receptor. Indeed, co-expression of all possible BiFC combinations (CRLR-YN/RAMP1-YC, CRLR-YC/RAMP1-YN, CRLR-YN/CRLR-YC + RAMP1 and RAMP1-YN/RAMP1-YC + CRLR) conferred [¹²⁵I]CGRP binding (Fig. 2A), with affinities comparable to that obtained upon co-expression of wild-type CRLR and RAMP1 (Fig. 2B). However, the maximal binding conferred by the co-expression of RAMP1-YN/RAMP1-YC with CRLR was significantly lower than that conferred by the other combinations. This difference most likely reflects the fact that, as will be demonstrated later (Fig. 5, 6 and 7), RAMP1 homo-oligomers are unable to interact with CRLR and thus cannot be part of an active CGRP receptor. Given that the interactions between protein partners are presumably stabilized by the reconstitution of YFP in a BiFC experiment (13), the amount of monomeric RAMP1 available for CGRP receptor formation should be lower in the RAMP1-YN/RAMP1-YC configuration, thus leading to lower maximal [¹²⁵I]CGRP binding.

To determine if BRET/BiFC can be used to probe the CRLR/RAMP1 complex, we first needed to establish whether the interactions between CRLR and RAMP1 can be detected using YFP BiFC. For this purpose, cells were transfected with either CRLR-

YN/CRLR-YC, RAMP1-YN/RAMP1-YC or CRLR-YN/RAMP1-YC pairs. As shown in Fig. 3A, the fluorescence resulting from the reconstitution of YFP could be detected by confocal microscopy for each of the three pairs, whereas no fluorescence was detected in cells expressing each of the constructs individually (data not shown). Only marginal fluorescence was observed upon co-expression of any of the CRLR or RAMP1 BiFC constructs with the CD8-C1-YN or -YC fusion proteins (CD8-C1-YN/CRLR-YC, CD8-C1-YN/RAMP1-YC, CRLR-YN/CD8-C1-YC and RAMP1-YN/CD8-C1-YC) used as negative controls (Fig. 3B). In contrast, a strong signal, expected for the CD8 constitutive dimer, was observed in cells co-transfected with CD8-C1-YN/ CD8-C1-YC (Fig. 3A, lower panel), indicating that the lack of fluorescence reconstitution upon co-expression with CRLR or RAMP1 BiFC partners did not result from inappropriate expression or folding of the CD8-C1-YN and -YC fusion proteins, thus confirming the selectivity of the BiFC signals observed. Taken together, these results demonstrate that BiFC allows the detection of both homo and hetero-oligomers between CRLR and RAMP1. Higher magnification images were then used to assess the subcellular distribution of the BiFC signal observed (Fig. 3C). The YFP fluorescence resulting from co-expression of CRLR-YN with CRLR-YC, or RAMP1-YN with RAMP1-YC co-localized extensively with the ER marker DsRed-ER, confirming that neither CRLR nor RAMP1 can efficiently exit the ER when expressed individually (3;6) and that the presence of the YFP fragments or their complementation did not affect their cellular trafficking. This result also clearly demonstrates that homo-oligomerization of each protein occurs in the ER. Notably, fluorescence reconstituted by the homo-oligomerization of CD8-C1-YN and -YC was also found to localize to the ER, confirming that this protein has a subcellular distribution identical to that of CRLR and RAMP1 expressed alone and thus represents an appropriate control. In contrast, co-transfection of CRLR-YN and RAMP1-YC led to YFP fluorescence detected throughout the secretory pathway and at the plasma membrane (Fig. 3C), demonstrating that the BiFC did not interfere with the documented ability of the CRLR/RAMP1 complex to exit the ER and reach the cell surface (3;6). Taken together, these results validate the usefulness of

BiFC to monitor CRLR and RAMP1 homo- and hetero-oligomerization and to assess the subcellular distribution of these complexes.

Validation of the dual BRET/BiFC approach to detect ternary complexes in living cells - To validate that BiFC can be combined with BRET to detect a ternary complex involving CRLR and RAMP1, we took advantage of the known complex formed between the CGRP receptor and β -arrestin2 upon agonist stimulation (6). As illustrated in Fig. 4, CGRP promoted a dose-dependent increase in BRET between β -arrestin2-*Rluc* and CRLR-YN/RAMP1-YC, reflecting the recruitment of β -arrestin2-*Rluc* to the YFP reconstituted by the formation of the CRLR/RAMP1 complex. Interestingly, the EC_{50} for the CGRP-promoted recruitment of β -arrestin2-*Rluc* to the CRLR-YN/RAMP1-YC and to the CRLR-YFP/RAMP1 complexes were very similar (72.4 ± 8.2 vs 11.8 ± 2.8 nM), confirming normal functionality of the CRLR-YN/RAMP1-YC BiFC pair. The significantly smaller maximal BRET signal observed for β -arrestin2-*Rluc* recruitment to CRLR-YN/RAMP1-YC vs CRLR-YFP/RAMP1 (Fig. 4 inset) is expected given the intrinsically lower level of fluorescence obtained by BiFC compared to that obtained for full length YFP ((25) and data not shown). BRET signal being dependent of the relative expression levels of the energy donor (*Rluc*) and acceptor (YFP), the partial YFP reconstitution achieved in BiFC is deemed to generate lower maximal BRET levels. No transfer of energy was detected after agonist stimulation of cells expressing β -arrestin2-*Rluc* with either the CRLR-YN and untagged RAMP1 or the RAMP1-YC and untagged CRLR (Fig. 4 inset), consistent with our previous observation that neither YN nor YC fragments alone generate a fluorescence signal. In addition to validate the use of dual BRET/BiFC to monitor dynamic interactions between three partners in living cells, these results confirm that YFP reconstitution at the C-terminus of CRLR and RAMP1 did not interfere with the functionality of the receptor.

Probing the arrangement of the CRLR/RAMP1 complex using BRET/BiFC - We next used the BRET/BiFC approach to directly test the asymmetrical organization of the CGRP receptor (1 molecule of RAMP1 associated with a homo-oligomer of CRLR) proposed by the BRET competition assays described above. For this purpose, different BRET/BiFC combinations were tested.

First, the CRLR-YN/RAMP1-YC pair was used. As shown in Fig. 5A, co-expression of CRLR-YN and RAMP1-YC with CRLR-Rluc yielded a significant BRET signal, indicative of the presence of a CRLR oligomer within the CGRP receptor complex. To verify the selectivity of the signal, we used an unrelated 7TM receptor, Frizzled 1 (Fz1), which similarly to the CRLR/RAMP1 complex is readily targeted at the cell surface. As expected, co-expression of the negative control Fz1-Rluc with CRLR-YN/RAMP1-YC only led to a marginal BRET, confirming that the signal observed between CRLR-YN/RAMP1-YC and CRLR-Rluc resulted from a true oligomeric interaction. When the CRLR-YN/RAMP1-YC BiFC pair was co-expressed with RAMP1-Rluc a negligible BRET signal, not different from that observed with the negative control Fz1, was detected, suggesting that the CRLR/RAMP1 complex could not interact with a second molecule of RAMP1. It should be noted that in all cases, the fluorescence and luminescence levels were equivalent, thus excluding the possibility that the differences in BRET could result from different levels of YFP reconstitution or distinct energy acceptor/donor ratios (see legend in the figure inset).

For the CRLR-YN/CRLR-YC BiFC pair (Fig. 5B), co-expression with RAMP1-Rluc led to a robust BRET signal, further supporting that RAMP1 can associate with a CRLR homo-oligomer. In this case, since CRLR-YN/CRLR-YC is retained intra-cellularly (Fig. 3C), the GABA_BR1 7TM receptor, which is also retained in the ER, was used as an appropriate control. Only a marginal signal was observed upon expression of CRLR-YN/CRLR-YC with GABA_BR1-Rluc, confirming the selectivity of the signal detected with RAMP1-Rluc. Interestingly, co-expression of CRLR-Rluc with CRLR-YN/CRLR-YC did

not generate a BRET signal significantly different from that obtained with GABA_BR1-Rluc, suggesting that CRLR cannot form complexes larger than dimers.

Finally, when the RAMP1-YN/RAMP1-YC pair (Fig. 5C) was co-expressed with CRLR-Rluc, the weak BRET signal observed was not significantly different from that obtained with the negative control GABA_BR1-Rluc, consistent with the notion that RAMP1 homo-oligomers cannot interact with CRLR. The lack of significant BRET signal did not result from the inability of the RAMP1-YN/RAMP1-YC pair to engage into protein complexes, since a significant BRET was observed upon co-expression with RAMP1-Rluc.

Assessment of CRLR/RAMP1 complexes by co-immunoprecipitation - The results obtained using BRET/BiFC are consistent with the notion that the CGRP receptor is formed by a CRLR homo-oligomer associated to a single RAMP1 molecule. However, these are based in part on the absence of BRET signal between two RAMP1 molecules and CRLR (Fig. 5A and C) that could result either from a lack of interaction or from a three dimensional configuration of the complex that is not permissive to BRET, due to an inadequate orientation or an excessive distance between the fluorophores. In order to confirm that the lack of BRET truly resulted from a lack of interaction, we applied a more direct biochemical approach involving the immunoprecipitation of the CRLR/RAMP1 complex. Classical co-immunoprecipitation does not allow monitoring the presence of three proteins in the same complex. Thus, to directly assess the existence of a ternary complex, we monitored the reconstitution of a fluorescent signal from the YFP fragments attached to two of the three potential partners, following the immunoprecipitation of the third one. More specifically, HA-RAMP1 was co-expressed with either CRLR-YN and CRLR-YC or CRLR-YN and RAMP1-YC, and HA-RAMP1 was immunoprecipitated. As shown in Fig. 6B, immunoprecipitation using an anti-HA antibody resulted in the co-sedimentation of a CRLR-YN/CRLR-YC complex, as indicated by the significant fluorescence signal detected in the immunoprecipitate of cells co-expressing HA-RAMP1, CRLR-YN and CRLR-YC.

In contrast, only marginal fluorescence was observed upon anti-HA immunoprecipitation in cells co-expressing HA-RAMP1, CRLR-YN and RAMP1-YC, indicating that no CRLR-YN/RAMP1-YC complex could be co-immunoprecipitated with HA-RAMP1. The difference in the co-immunoprecipitation results obtained for CRLRYN/CRLR-YC and CRLR-YN/RAMP1-YC cannot be attributed to variations in the expression levels or in the ability of the constructs to reconstitute YFP, since equivalent levels of fluorescence were detected before immunoprecipitation (Fig 6A) and similar amounts of HA-RAMP1 were immunoprecipitated for both conditions (Fig. 6B inset). Thus, in agreement with the BRET studies, co-immunoprecipitation experiments indicate that, whereas RAMP1 can interact with a CRLR homo-oligomer, CRLR can only associate with a single RAMP1 molecule.

Subcellular distribution of CRLR and RAMP1 complexes using BiFC fluorescence microscopy – Since the interaction between CRLR and RAMP1 is absolutely required for their cell surface targeting (3;6), we assess the subcellular distribution of CRLR and RAMP1 homo-oligomers as a mean to further explore the arrangement of the CRLR/RAMP1 complex. The presence of either CRLR or RAMP1 homo-oligomers within the CGRP receptor complex at the cell surface was assessed by determining the sub-cellular distribution of CRLR-YN/CRLR-YC and RAMP1-YN/RAMP1-YC in the presence of RAMP1 and CRLR, respectively. As seen in Fig. 7A, and previously illustrated in Fig. 3C, expression of the CRLR-YN/CRLR-YC pair in the absence of RAMP1 led to the reconstitution of intracellular YFP fluorescence that is entirely colocalized with the DsRed-ER marker. Co-expression of RAMP1 promoted the apparition of cell surface YFP fluorescence, thus confirming the presence of a CGRP receptor complex composed of a CRLR homo-oligomer and RAMP1 at the plasma membrane. These fluorescence patterns in the presence and absence of RAMP1 are identical to those observed for CRLR-YFP (Fig. 7B), indicating that CRLR oligomerization did not affect the ability of RAMP1 to promote CRLR plasma membrane targeting. When considering the RAMP1-YN/RAMP1-YC BiFC pair, the reconstituted YFP fluorescence was restricted to the ER, whether CRLR was

expressed or not, indicating that RAMP1 homo-oligomers do not reach the plasma membrane even in the presence of CRLR (Fig. 7C). This contrasts with the cell surface fluorescence observed when co-expressing RAMP1-YFP with CRLR (Fig. 7D), thus suggesting that RAMP1 can traffic to the plasma membrane only as a monomer associated to CRLR. Altogether, the BRET/BiFC, co-immunoprecipitation and confocal microscopy data demonstrate the presence of a complex formed by at least two CRLR and one RAMP1 molecule at the plasma membrane.

Functionality of the asymmetrical CRLR/RAMP1 complex - To determine whether the asymmetrical complex formed by a CRLR homo-oligomer and a RAMP1 monomer represents a functional CGRP receptor, we assessed the ability of this complex to recruit β -arrestin2 upon receptor stimulation. For this purpose, we monitored agonist-promoted BRET between β -arrestin2-Rluc and the YFP reconstituted by the assembly of CRLR-YN and CRLR-YC in the presence and absence of RAMP1. As shown in Fig. 8, in the absence of co-expressed RAMP1, only a marginal agonist-stimulated BRET could be detected (most likely reflecting the low level of endogenous RAMP1 expressed in these cells (3)). Co-transfection of RAMP1 led to a robust increase of this dose-dependent BRET signal between β -arrestin2-Rluc and CRLR-YN/CRLR-YC, indicating that β -arrestin2 is recruited to a CRLR homo-oligomer and that RAMP1 is needed for this interaction. The presence of RAMP1 in the functional receptor complex is further supported by the CGRP-promoted BRET observed between β -arrestin2-Rluc and CRLR-YN/RAMP1-YC presented in Fig. 4. Taken with the previous results, indicating that only one RAMP1 molecule can associate with a CRLR homo-oligomer, these observations demonstrate that asymmetrical complexes formed by at least two CRLR and one RAMP1 represent genuine CGRP receptors.

DISCUSSION

In the present study, the combination of BRET competition, co-immunoprecipitation, BiFC microscopy and dual BRET/BiFC assays allows to propose a new protein composition for the CGRP receptor. Several lines of evidence converge to suggest that the receptor complex is composed of a CRLR homo-oligomer and a single RAMP1 molecule. Arguments supporting the presence of at least two CRLR molecules within the CGRP receptor include: 1) the observation that co-expression of RAMP1 did not compete with the formation of CRLR homo-oligomer but rather induced a conformational rearrangement of the oligomer as assessed by BRET competition assays (Fig. 1A), 2) the robust BRET signal obtained between CRLR-YN/RAMP1-YC and CRLR-*Rluc* (Fig. 5A) as well as between CRLR-YN/CRLR-YC and RAMP-*Rluc* (Fig. 5B), and the co-immunoprecipitation of CRLR-YN/CRLR-YC with HA-RAMP1 (Fig. 6), directly demonstrating the association of a CRLR homo-oligomer with RAMP1, 3) the detection of YFP fluorescence reconstituted from the CRLR-YN/CRLR-YC pair at the plasma membrane in the presence of RAMP1 (Fig. 7A), indicating that CRLR homo-oligomer can be trafficked to the cell surface, and 4) the agonist-promoted recruitment of β -arrestin2-*Rluc* to the CRLR-YN/CRLR-YC/RAMP1 complex detected by BRET (Fig. 8), illustrating that the CRLR homo-oligomer is part of an active CGRP receptor. The same set of experiments revealed that only one molecule of RAMP1 contributes to the receptor complex. Indeed, 1) in BRET competition assays, CRLR was found to compete with the assembly of RAMP1 homo-oligomer (Fig. 1B), 2) no BRET could be detected between CRLR-YN/RAMP1-YC and RAMP1-*Rluc* (Fig. 5A) nor between RAMP1-YN/RAMP1-YC and CRLR-*Rluc* (Fig. 5C), suggesting that RAMP1 homo-oligomers cannot interact with CRLR, 3) CRLR-YN/RAMP1-YC could not be co-immunoprecipitated with HA-RAMP1, confirming that two RAMP1 molecules cannot be associated to CRLR, and 4) the RAMP1-YN/RAMP1-YC reconstituted fluorescence was restricted to the ER even in the presence of CRLR (Fig. 7C), confirming that RAMP1 homo-oligomer cannot associate

with CRLR and be trafficked to the plasma membrane. Taken together, the data indicate that although both CRLR and RAMP1 can form homo-oligomers in the ER, only RAMP1 monomer can associate with CRLR homo-oligomer to form an asymmetrical CGRP receptor complex that can reach the cell surface.

However, the evidence indicating that RAMP1 homo-oligomers cannot interact with CRLR is partly based on the absence of BRET, co-immunoprecipitation and lack of cell surface trafficking observed with certain BiFC pairs. It could be argued that YFP reconstitution at the C-terminus of CRLR and RAMP1 could force conformational rearrangements that would artefactually prevent interactions between RAMP1 homo-oligomers and CRLR. It should however be emphasized that lack of interaction between CRLR and a RAMP1 homo-oligomer in these different experimental settings was observed whether the BiFC pairs used were formed by the CRLR/RAMP1 or the RAMP1/RAMP1 complexes. Yet, these two BiFC pairs had normal interaction patterns with their other partners (ie: CRLR-Rluc and β -arrestin2-Rluc with CRLR-YN/RAMP1-YC, and RAMP1-Rluc with RAMP1-YN/RAMP1-YC; Fig. 4, 5A and 5C). It therefore seems highly unlikely that the YFP reconstitution by the two distinct BiFC pairs only aberrantly affected the complexes involving two RAMP1 and one CRLR. It seems more reasonable that this convergence reflects an intrinsic inability of the native RAMP1 homo-oligomer to associate with CRLR. The latter interpretation is also supported by the results of the BRET competition assays (Fig. 1) that do not rely on the reconstitution of YFP. Indeed, these experiments showed that the interaction of CRLR with RAMP1 competed with the RAMP1 homo-oligomerization, indicating that only monomeric RAMP1 could associate with CRLR. This contrasted with the lack of competition of RAMP1 on the CRLR homo-oligomerization, which is consistent with the overall model that a single RAMP1 interacts with a CRLR homo-oligomer.

In addition to provide new insights on the CRLR/RAMP1 complex, our study represents a proof of principle that BRET can be combined with BiFC and fluorescence microscopy to probe stoichiometry of both constitutive and dynamically regulated

complexes in living cells. Combination between BRET and BiFC has previously been used to monitor the interaction between the constitutive G $\beta\gamma$ dimer, used as the BiFC pair and either G α or G protein effectors (14;15). However, to our knowledge, this is the first use of BRET/BiFC to probe the stoichiometric arrangement of a protein complex. Changes in FRET signals observed upon co-expression of potential partners have previously been used to infer stoichiometries of protein complexes (26;27). However, as is the case for the BRET competition assays presented in Fig. 1, the interpretations drawn from these experiments are based on several assumptions that make definitive conclusions more difficult. In contrast, dual BRET/BiFC assays directly monitor interactions between three proteins and thus represent a direct stoichiometric readout. However, since it is still a matter of debate whether or not BiFC fragments can dissociate after reconstitution (25), the YFP assembly could stabilize complexes between proteins that normally associate only transiently. This is particularly important when studying dynamically regulated interactions. As much as possible, proteins that form a stable complex should be used as the BiFC pair, whereas the regulated partner of the complex should be fused to *Rluc*. This strategy is well illustrated by our experiments monitoring the CGRP-promoted recruitment of β -arrestin2 to the CRLR/RAMP1 complexes (Fig. 4 and 8), where the dynamically regulated partner, β -arrestin2, was fused to *Rluc*, whereas CRLR and RAMP1 that form a constitutive complex were used as BiFC pairs.

The notion that the functional CGRP receptor is composed of a CRLR oligomer associated to a single RAMP1 molecule introduces an unanticipated level of complexity in the oligomeric assembly of this receptor. Indeed, our previous study using a membrane impermeable cross-linker failed to detect molecular species including more than one CRLR and one RAMP1 (6). The lack of stabilization of CRLR homo-oligomer or CRLR oligomer associated to RAMP1 by the bivalent cross-linker used in that previous study most likely reflects the absence of available neighbouring lysines allowing the capture of these complexes. However, the detection of a CRLR oligomer/RAMP1 monomer complex in the present study is consistent with the previous observation that the amount of RAMP1 homo-

dimers detected by Western blot analysis following immunoprecipitation decreased upon co-transfection of CRLR that suggested a competition between CRLR/RAMP1 complex and RAMP1 homo-oligomer formation (6;28). Such competition is also seen in living cells, as indicated by the inhibitory effect of CRLR expression on the BRET signal generated by the RAMP1 homo-oligomer observed in the present study (Fig. 1).

The asymmetry of the CRLR/RAMP1 complex raises intriguing questions concerning its tri-dimensional arrangement and the contribution of each subunit in agonist binding and subsequent G protein activation. Although the currently available data do not allow to conclude on the binding and activation mode of the complex, the fact that [¹²⁵I]CGRP can be cross-linked to both CRLR and RAMP1 (3;5) suggests that domains from the two proteins participate or are in close proximity to the binding pocket. Given that only one RAMP1 molecule is present in the complex, these data indicate either that RAMP1 possesses multiple CGRP interaction sites, allowing simultaneous hormone binding to two or more CRLR molecules, or that only one CRLR unit per receptor complex can bind a CGRP molecule at a time.

Our finding, indicating that only one molecule of RAMP1 contributes to the CGRP receptor complex, also raises questions concerning the potential role of RAMP1 homo-oligomerization. Given that it competes with the formation of the CRLR/RAMP1 complex, the homo-typic RAMP1 interaction may have a regulatory influence on the formation of the CGRP receptor by titrating the available RAMP1 able to interact with CRLR. In addition to this potential regulatory role, the homo-oligomer could also have intrinsic functions, independent of RAMP1's role as co-receptor. Given that RAMP1 homo-oligomers subcellular distribution is limited to the ER, a role in protein folding, maturation and/or cargo export could be envisaged for substrates other than CRLR. Consistent with this notion, RAMP1 has a membrane topological organization similar to that of ER-export proteins, such as VIP36 and ERGIC-53, that exert their cargo trafficking function as oligomers (29;30).

In conclusion, in addition to demonstrate the usefulness of the dual BRET/BiFC approach to investigate multiprotein complexes organization, our study revealed an unexpected arrangement for a G protein-coupled receptor signalling module formed between a 7TM receptor oligomer and a 1TM accessory protein monomer. Considering the increasing number of partners that were shown to interact with 7TM receptors (31), dual BRET/BiFC assays should prove to be useful tools to monitor both the composition and the stoichiometry of newly identified signalling modules. The asymmetrical nature of the complex formed by the association between a CRLR homo-oligomer and a single RAMP1 molecule raises several intriguing questions concerning the three dimensional organization as well as the binding and signalling modes of the CGRP receptor. Given the importance of the CGRP receptor as a potential target for the development of new anti-migraine therapeutics, the structural and functional consequences of the receptor asymmetrical oligomeric assembly will undoubtedly be investigated in future studies.

REFERENCES

1. Hoeller, D., Volarevic, S., and Dikic, I. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 107-111
2. Luttrell, L. M. (2005) *J. Mol. Neurosci.* 26, 253-264
3. McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., and Foord, S. M. (1998) *Nature* 393, 333-339
4. Leuthauser, K., Gujer, R., Aldecoa, A., McKinney, R. A., Muff, R., Fischer, J. A., and Born, W. (2000) *Biochem. J.* 351 Pt 2, 347-351
5. Hilairet, S., Foord, S. M., Marshall, F. H., and Bouvier, M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 29575-29581
6. Hilairet, S., Belanger, C., Bertrand, J., Laperriere, A., Foord, S. M., and Bouvier, M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42182-42190

7. Sexton, P. M., Albiston, A., Morfis, M., and Tilakaratne, N. (2001) *Cell Signal.* 13, 73-83
8. Heroux, M., Breton, B., Hogue, M., and Bouvier, M. (2007) *Biochemistry* 46, 7022-7033
9. Michnick, S. W. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 472-477
10. Wallrabe, H. and Periasamy, A. (2005) *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 19-27
11. Pflieger, K. D. and Eidne, K. A. (2006) *Nat. Methods* 3, 165-174
12. Truong, K. and Ikura, M. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 573-578
13. Hu, C. D., Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2002) *Mol. Cell* 9, 789-798
14. Rebois, R. V., Robitaille, M., Gales, C., Dupre, D. J., Baragli, A., Trieu, P., Ethier, N., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2006) *J. Cell Sci.* 119, 2807-2818
15. Dupre, D. J., Robitaille, M., Ethier, N., Villeneuve, L. R., Mamarbachi, A. M., and Hebert, T. E. (2006) *J Biol. Chem.* 281, 34561-34573
16. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. (2003) *EMBO J.* 22, 3816-3824
17. Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21, 539-545
18. Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y., and Maniatis, T. (1981) *Cell* 27, 279-288
19. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 44925-44931
20. Marquardt, D. W. (1963) *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 11, 431-441
21. Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (2002) *Numerical recipes in C: the art of scientific computing*, Cambridge University Press, NY
22. Efron, B. and Tibshirani, R. J. (1994) *An introduction to the bootstrap*, Chapman & Hall/CRC, NY
23. Xia, H., Hornby, Z. D., and Malenka, R. C. (2001) *Neuropharmacology* 41, 714-723

24. Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Heroux, M., Shah, K. V., Bouvier, M., and Moon, R. T. (2004) *Nat. Cell Biol.* 6, 52-58
25. Kerppola, T. K. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 449-456
26. Zheng, J. and Zagotta, W. N. (2004) *Neuron* 42, 411-421
27. Kerschensteiner, D., Soto, F., and Stocker, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 6160-6165
28. Udawela, M., Hay, D. L., and Sexton, P. M. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 299-308
29. Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, 330-334
30. Fiedler, K., Parton, R. G., Kellner, R., Etzold, T., and Simons, K. (1994) *EMBO J.* 13, 1729-1740
31. Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A., and Marin, P. (2004) *Pharmacol. Ther.* 103, 203-221

FOOTNOTES

*We are grateful to S.M. Foord (GlaxoSmithKline) for the generous gift of CRLR, RAMP1, Myc-CRLR and Myc-RAMP1, R.T. Moon for Fz4m and Fz1-Rluc, P.M. Sexton for CRLR-YFP, R.C. Malenka for CD8-C1 and T.K. Kerppola for YFP BiFC fragments cDNAs. We acknowledge the contribution of Y. Percherancier and F.F. Hamdan in the conception of the BiFC partners used in this study. We also thank P. René and M. Lagacé for critical reading of the manuscript and C. Charbonneau for help with confocal microscopy. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (M.B.). M.H. holds a studentship from the Canadian Institute for Health Research. M.B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

²The abbreviations used are: 7TM, seven transmembrane domain; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CGRP, calcitonin gene-related peptide; COS7, simian kidney fibroblasts; CRLR, calcitonin receptor-like receptor; ER, endoplasmic reticulum; Fz1, Frizzled-1; Fz4m, Frizzled-4 mutant; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293T, human embryonic kidney 293T cells; PCA, protein complementation assay; RAMP1, receptor activity-modifying protein-1; RET, resonance energy transfer; *Rluc*, Renilla luciferase; YFP, yellow fluorescent protein; YC, carboxyl-terminal fragment of YFP; YN, amino-terminal fragment of YFP.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. CRLR and RAMP1 homo-oligomers BRET titration curves in the presence and absence of competitors. BRET signal, total fluorescence and luminescence were measured in HEK293T cells transfected with the indicated plasmids. Data points obtained in three independent experiments were pooled and used to generate the curves. The greyed zone represents the confidence intervals generated from bootstrapping analysis derived from 100,000 random re-sampling of data sets. In parallel, the expression of the negative controls (CD8-C1 and Fz4m) was verified by western blot (CD8-C1) and immunofluorescence (Fz4m) (data not shown).

FIGURE 2. Binding properties of CRLR and RAMP1 BiFC constructs. HEK293T cells expressing the indicated combinations of CRLR and RAMP1 BiFC constructs were incubated with 200 pM [¹²⁵I]CGRP. A, Specific binding was determined by subtracting binding obtained in the absence and presence of unlabeled 1 μM CGRP. *, P < 0.05 and #, P < 0.05, compared to cells expressing CRLR or RAMP1 alone, respectively (n=3). B, The relative affinities of the different constructs (IC₅₀) were derived from the curves obtained in

the absence or presence of increasing concentrations of unlabeled CGRP. No statistically significant differences were observed between the IC_{50} ($n=3$).

FIGURE 3. Detection of CRLR and RAMP1 homo- and hetero-oligomers using BiFC. Fluorescence images of COS7 cells expressing DsRed-ER and the indicated YN and YC fusion proteins. A, Detection of the YFP fluorescence resulting from complementation. B, Specificity of the complementation using CD8-C1-YN or CD8-C1-YC as negative control. The left panels show the absence of YFP fluorescence, while the right panels represent fluorescence from DsRed for the same field (shown to demonstrate the presence of transfected cells in this field). Identical detector gain, amplifier gain, and amplifier offset were used for A and B. C, A greater magnification is used to show the co-localization of YFP fluorescence resulting from complementation as in A (left), with an ER marker, DsRed-ER (center). Right panels show the merged images. White bars represent the scale of the image (50 μ m).

FIGURE 4. Validation of the BRET/BiFC approach. Agonist-induced β -arrestin2-Rluc recruitment to CRLR-YN/RAMP1-YC complexes was assessed in transfected HEK293T cells by BRET after 10 min of stimulation with increasing concentrations of CGRP. Inset: BRET levels were measured in cells expressing β -arrestin2-Rluc and the indicated constructs after 10 min of stimulation with 10 μ M CGRP. *, $P < 0.05$ compared to unstimulated cells ($n=3$).

FIGURE 5. Probing the arrangement of CRLR/RAMP1 complex using BRET/BiFC. BRET was measured in HEK293T cells co-expressing CRLR-YN/RAMP1-YC (A), CRLR-YN/CRLR-YC (B) or RAMP1-YN/RAMP1-YC (C) and the indicated Rluc fusion proteins. Similar levels of YFP reconstitution and equivalent YFP/Rluc ratio were used for

each different condition within a BiFC pair subset. *, $P < 0.05$ compared to cells expressing the control *Rluc* fusion protein (Fz1-*Rluc* (A) or GABA_BR1-*Rluc* (B, C)) (n=3-4).

FIGURE 6. Probing the arrangement of CRLR/RAMP1 complex using co-immunoprecipitation. Fluorescence was measured in solubilized HEK293T cells co-expressing HA-RAMP1 with either CRLR-YN/RAMP1-YC or CRLR-YN/CRLR-YC, before (A) and after (B) immunoprecipitation using anti-HA antibodies. Inset of B: Representative Western Blot and quantified HA-RAMP1 immunoreactivity following immunoprecipitation with anti-HA antibodies. No statistically significant differences of fluorescence or immunoreactivity were observed between the cells expressing HA-RAMP1/CRLR-YN/RAMP1-YC and HA-RAMP1/CRLR-YN/CRLR-YC (A and Inset of B). *, $P < 0.05$ compared to cells expressing HA-RAMP1/CRLR-YN/RAMP1-YC (B) (n=4).

FIGURE 7. Probing the arrangement of CRLR/RAMP1 complex using BiFC fluorescence microscopy. Cell surface targeting of CRLR and RAMP1 homo-oligomers was visualized by microscopy of COS7 cells expressing DsRed-ER and the indicated plasmids. Left panels represent YFP fluorescence, whereas center panels show DsRed fluorescence. Right panels correspond to merged images.

FIGURE 8. Functionality of the asymmetrical CRLR/RAMP1 complex. Agonist-induced β -arrestin2-*Rluc* recruitment to CRLR-YN/CRLR-YC complexes was assessed by BRET in transfected HEK293T cells, in the absence or presence of RAMP1, after 10 min stimulation with increasing concentrations of CGRP (n=3).

FIGURE 1

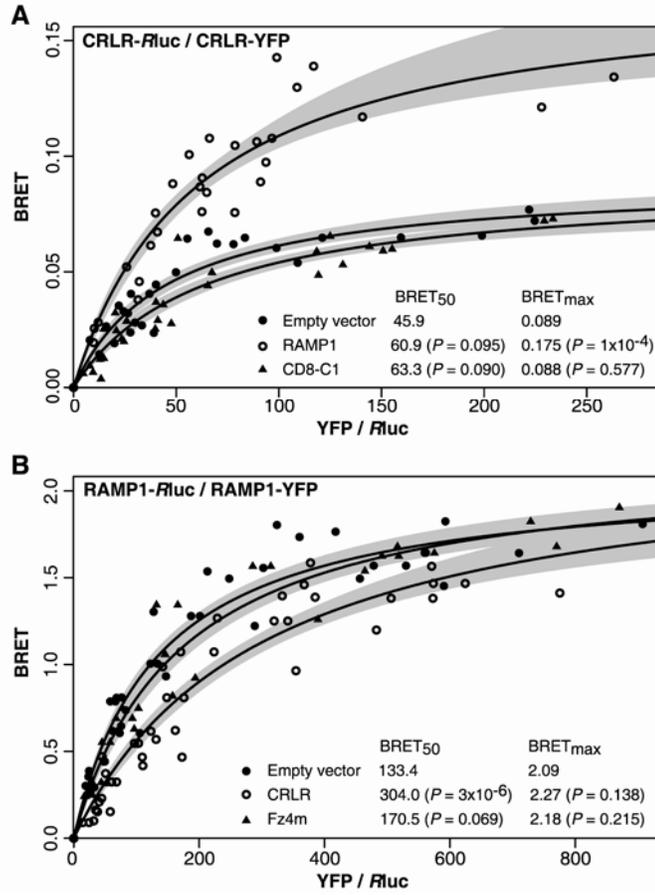


FIGURE 2

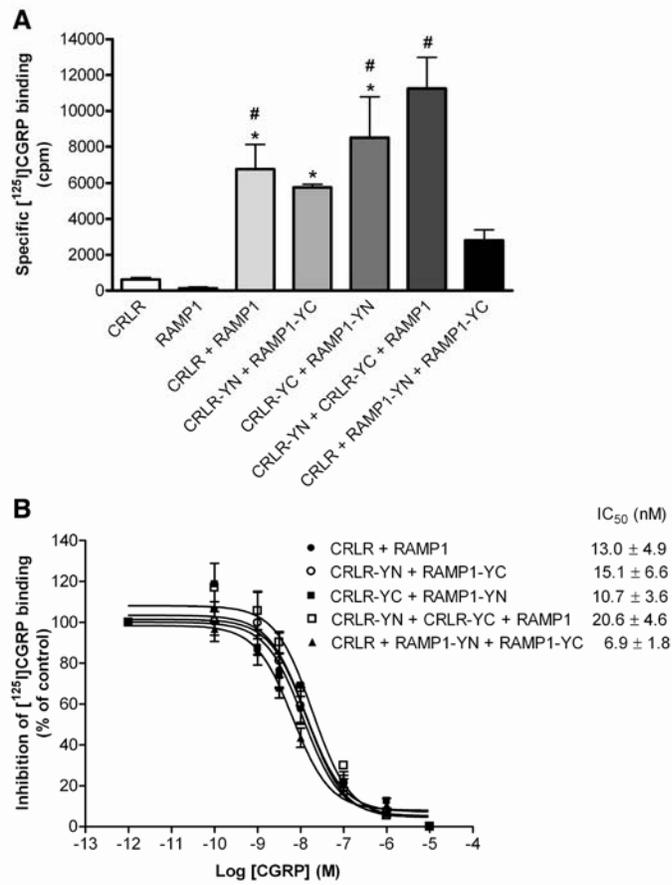


FIGURE 3

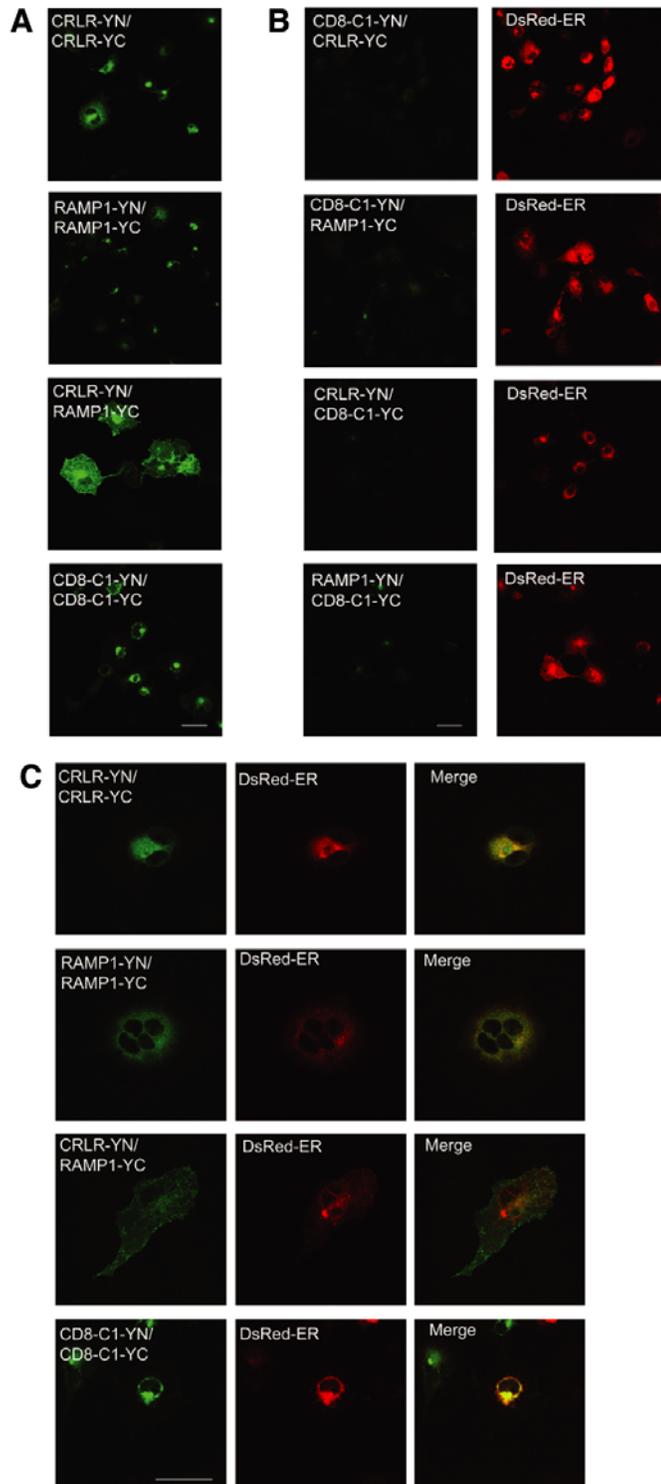


FIGURE 4

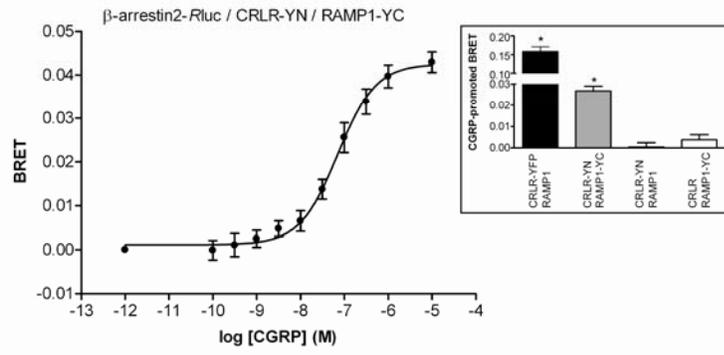


FIGURE 5

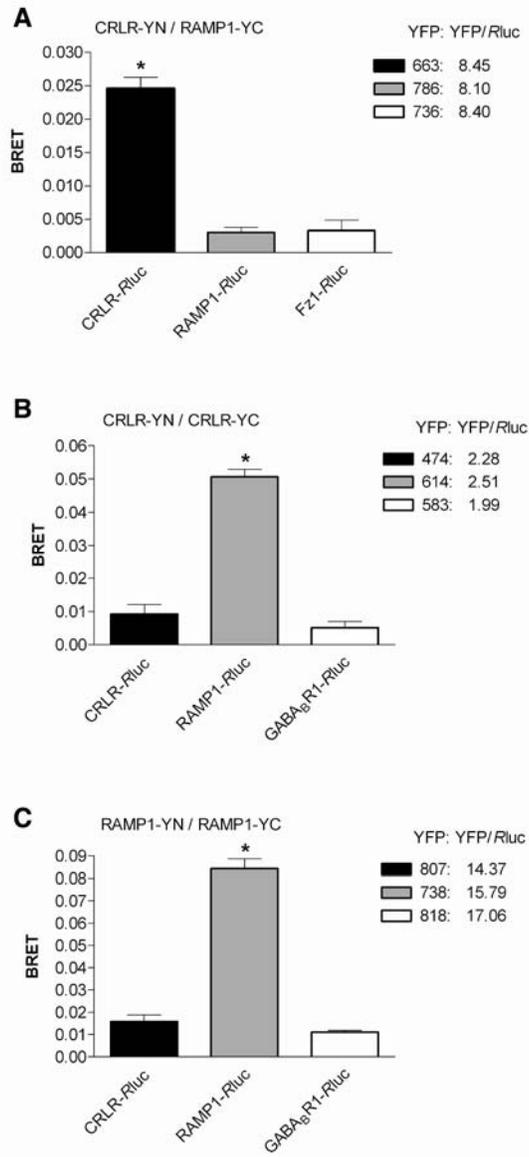


FIGURE 6

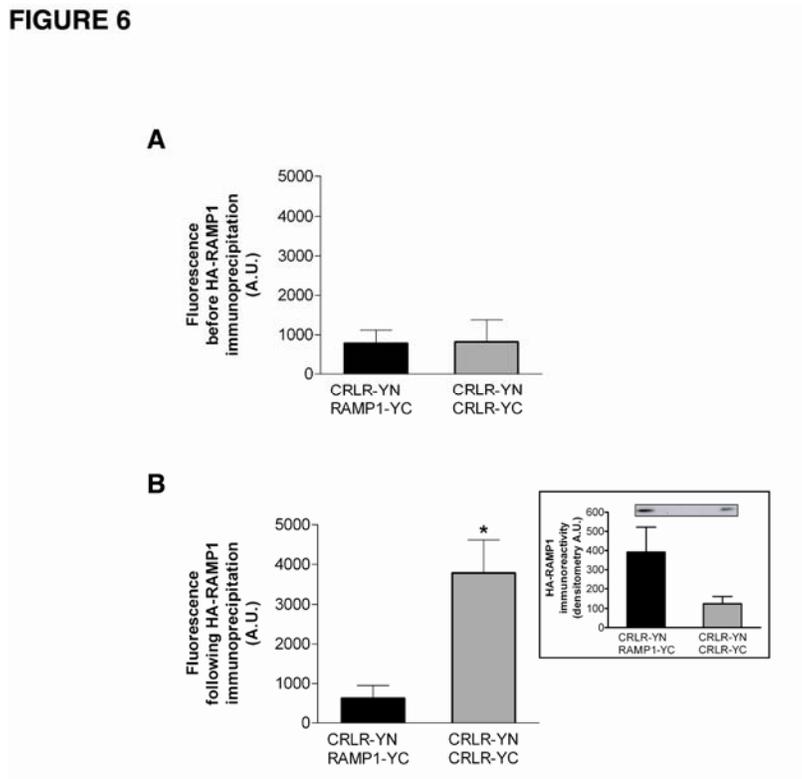


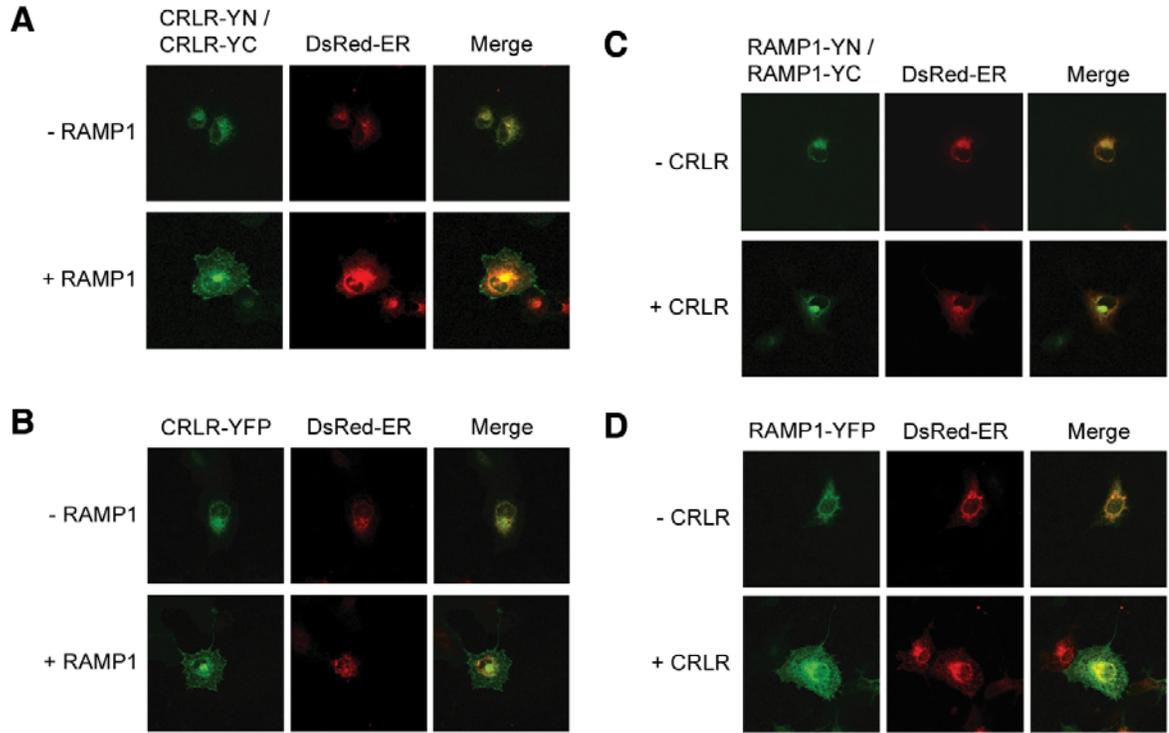
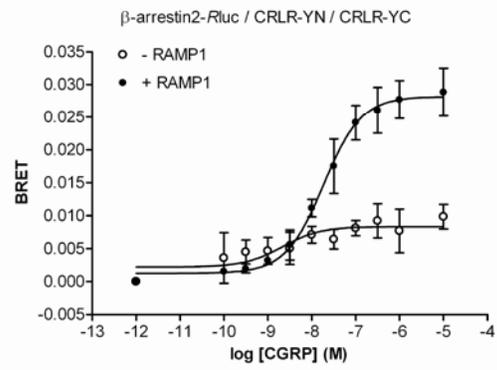
FIGURE 7

FIGURE 8



DISCUSSION

À la fin des années 90, la découverte de protéines à 1TM modulant l'activité de certains RCPGs baptisées RAMPs (White et al., 1998;McLatchie et al., 1998), a amené les chercheurs à revisiter leur conception de la signalisation par ces récepteurs. Il est alors apparu clair que les interactions protéine-protéine dans lesquelles sont impliquées les récepteurs comprend l'assemblage avec d'autres protéines transmembranaires, et que celles-ci jouent un rôle essentiel dans la transmission de l'information du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'approfondir nos connaissances sur l'assemblage oligomérique d'un RCPG, le récepteur CLR, avec les protéines accessoires à 1TM RAMPs.

Afin d'investiguer la stœchiométrie d'interaction entre le CLR et les RAMPs, nos travaux ont également mené à l'élaboration d'une nouvelle approche permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines dans les cellules vivantes, en combinant la technique de BRET avec le BiFC. Étant donné que les conclusions tirées dans cette thèse reposent en bonne partie sur l'utilisation de la technique de BRET ainsi que l'usage de cette nouvelle approche de BRET/BiFC, celles-ci seront tout d'abord discutées en détail, avant d'aborder les conclusions biologiques concernant le récepteur CLR et les protéines accessoires RAMPs.

1. Utilisation du BRET pour l'étude d'interactions protéine-protéine

1.1 Technique de BRET appliquée à l'étude des interactions entre deux protéines

L'approche de BRET permet de détecter l'interaction entre deux protéines dans des cellules vivantes. Comme pour toutes les approches permettant l'étude d'interactions protéine-protéine, l'utilisation de contrôles appropriés est nécessaire afin de distinguer une interaction spécifique, d'une association non-spécifique entre les deux protéines d'intérêt. La spécificité des résultats de BRET présentés dans cette thèse a été validée par la génération de courbes de titration telles que proposées par Mercier *et al.* (Mercier et al., 2002), ainsi que l'utilisation de contrôles négatifs se comportant de façon similaire aux protéines d'intérêt.

Les courbes de titration de BRET sont générées en mesurant le signal de BRET obtenu à partir de cellules exprimant une quantité fixe de donneur d'énergie avec une quantité croissante d'accepteur d'énergie. Dans ce type d'expérience, le signal de BRET mesuré est exprimé en fonction du niveau d'expression du donneur et de l'accepteur d'énergie (ratio GFP/Rluc). Contrairement au BRET déterminé à partir d'une seule concentration de donneur et d'accepteur d'énergie, les courbes de titration permettent de s'assurer de la spécificité du transfert d'énergie observé. En effet, dans le cas d'une interaction spécifique, en présence d'une quantité fixe de donneur, l'ajout d'une quantité croissante d'accepteur d'énergie entraînera une augmentation graduelle du signal de BRET, jusqu'à l'atteinte d'un plateau, alors que tous les donneurs sont associés aux accepteurs. À contrario, dans le cas d'une association non-spécifique, le signal de BRET provenant des collisions aléatoires entre les deux protéines d'intérêt continuera d'augmenter suite à l'accroissement de la quantité de donneur d'énergie. La saturation du signal de BRET indique donc la présence d'une interaction spécifique entre les deux protéines fusionnées au

donneur et à l'accepteur d'énergie. Deux paramètres peuvent être mesurés à partir d'une courbe de titration : le $BRET_{max}$ et le $BRET_{50}$. Le $BRET_{max}$, qui correspond à la valeur de BRET au plateau, représente non seulement la quantité de dimères formés, mais aussi la distance et l'orientation entre la *Rluc* et la GFP à l'intérieur d'un dimère. Le $BRET_{50}$ quant à lui, correspond au ratio GFP/*Rluc* auquel 50% du $BRET_{max}$ est obtenu. Cette valeur de $BRET_{50}$ reflète l'affinité relative du donneur pour l'accepteur d'énergie. Une mesure plus quantitative de l'affinité des deux protéines d'intérêt peut être obtenue en corrélant l'émission de luminescence de la *Rluc* et de fluorescence de la GFP, à des niveaux d'expression réels des protéines d'intérêt, en effectuant par exemple des études de radio-liaison (Mercier et al., 2002). Au cours de cette thèse, nous avons utilisé les courbes de titration afin de démontrer l'association entre CLR et RAMP1, ainsi que l'homooligomérisation de ces deux protéines (*Figures 3, 5B, 6A et 7, article 1*).

L'utilisation de contrôles négatifs se comportant de façon similaires aux protéines d'intérêt, permet également de valider la spécificité des interactions observées. De façon idéale, le contrôle négatif devrait se retrouver dans le même compartiment sub-cellulaire que les protéines d'intérêt, et posséder une organisation topologique semblable à celles-ci. Même si un certain signal de BRET peut être détecté pour de tels contrôles négatifs, dans une courbe de titration ce transfert d'énergie augmentera de façon linéaire plutôt qu'hyperbolique, en fonction de l'augmentation de la concentration d'accepteur d'énergie.

Dans le cas où des courbes de titration ne peuvent être générées, comme pour le BRET/BiFC par exemple (voir section 1.2 de la discussion), le minimum requis afin de s'assurer de la spécificité d'un signal de BRET mesuré entre les protéines d'intérêt, est de comparer ce signal à celui obtenu avec un contrôle négatif, dans des conditions où les niveaux d'expression du donneur et de l'accepteur d'énergie sont similaires pour toutes les différentes paires testées. À défaut de pouvoir générer des courbes de titration, ce type de contrôle a été utilisé lors des expériences de BRET/BiFC que nous avons réalisées entre plusieurs molécules de CLR et de RAMP1 (*Figure 5, article 2*). Dans ces expériences, en plus de s'assurer que les niveaux d'expression de la YFP reconstituée et de la *Rluc* étaient

similaires dans tous les cas, nous avons utilisé comme contrôle négatif une protéine fusionnée à la *Rluc*, dont la localisation sub-cellulaire est identique à celle des partenaires YN et YC: *Fz1-Rluc* pour le complexe CLR-YN/RAMP1-YC qui est localisé à la surface cellulaire, et *GABA_BR1-Rluc* pour les complexes CLR-YN/CLR-YC ou RAMP1-YN/RAMP1-YC qui sont retenus à l'intérieur de la cellule.

Lorsque les contrôles adéquats sont utilisés, la présence d'un transfert d'énergie reflète une interaction entre les deux protéines fusionnées au donneur et à l'accepteur d'énergie. Toutefois, l'absence de transfert d'énergie n'équivaut pas nécessairement à l'absence d'interaction entre les deux protéines d'intérêt. En effet, le transfert d'énergie étant non seulement dépendant de la distance, mais aussi de l'orientation entre le donneur et l'accepteur d'énergie à l'intérieur du complexe, une absence de BRET peut aussi être due à une orientation non-permissive au transfert d'énergie. Dans le cas d'une absence de BRET entre deux protéines d'intérêt, l'absence d'association entre ces protéines doit donc être confirmée par d'autres techniques avant de pouvoir affirmer que ces protéines n'interagissent pas dans les cellules vivantes. Ainsi, au cours de notre étude sur la stœchiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1, nous avons confirmé que l'absence de BRET observé entre deux molécules de RAMP1 et un CLR reflète bel et bien l'absence d'interaction entre le CLR et l'homo-oligomère de RAMP1 par diverses approches, dont la compétition de BRET, la co-immunoprécipitation et l'imagerie de BiFC (*article 2*).

1.2 Approche de BRET/BiFC pour l'étude des interactions entre trois protéines

Les conclusions apportées dans cette thèse sur l'assemblage oligomérique du complexe CLR/RAMP1, ont été obtenues en partie grâce au développement d'une approche permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines dans un contexte de cellules vivantes, le BRET/BiFC. En effet, en combinant le BRET avec la technique de

complémentation bimoléculaire de fluorescence, utilisant la *Rluc* comme donneur d'énergie et les deux fragments de la YFP comme accepteur d'énergie, nous avons pu déterminer la stœchiométrie du complexe CLR/RAMP1. La technique de BRET/BiFC repose sur le fait que le transfert d'énergie sera observé uniquement si les trois protéines auxquelles sont fusionnées la *Rluc* et les deux fragments de la YFP forment un complexe, permettant ainsi la reconstitution de la fluorescence de la YFP à partir de ces deux fragments et son excitation suite à l'émission de luminescence par la *Rluc* avoisinante. De façon similaire à ce qui a été décrit ci-dessus pour le BRET, l'approche de BRET/BiFC doit être adéquatement contrôlée afin de pouvoir confirmer la spécificité des interactions mesurées.

La détection de complexes protéiques constitués de plus de deux sous-unités est longtemps demeurée un défi de taille pour les scientifiques. Traditionnellement, la co-immunoprécipitation séquentielle, à partir de protéines portant trois épitopes différents, représentait la seule approche disponible permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines. Même si cette technique a été précédemment utilisée dans l'étude de la trimérisation des RCPGs (Park and Wells, 2004), il n'en demeure pas moins qu'elle comporte comme désavantage considérable l'utilisation de détergents et la solubilisation des protéines, qui peuvent entraîner divers artéfacts (voir section 2.1.1 de l'introduction). Étant donné l'importance des complexes multi-protéiques aussi appelés « signalosomes » dans la transduction de la signalisation, le développement de l'approche de BRET/BiFC permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines dans un contexte de cellules vivantes, représente donc une avancée notable dans le domaine de la signalisation cellulaire.

Lorsque nous avons débuté l'étude de la stœchiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1, aucune technique permettant de détecter l'interaction entre plus de deux protéines dans un contexte de cellules vivantes n'était disponible. Nous avons ainsi développé l'approche de BRET/BiFC et appliqué celle-ci à l'étude des RCPGs et de leur stœchiométrie d'interaction. Parallèlement, le groupe du Dr Hebert a rapporté l'utilisation du BRET/BiFC appliquée à l'étude de l'interaction entre la sous-unité $G\alpha$ ou les différents

effecteurs des protéines G et le dimère constitutif G $\beta\gamma$ (Rebois et al., 2006; Dupre et al., 2006). Depuis la parution de notre article, deux autres groupes de recherche ont appliqué la technique de BRET/BiFC à l'étude de l'oligomérisation des RCPGs, afin de démontrer que les RCPGs forment des oligomères de récepteurs comprenant plus de deux sous-unités (Gandia et al., 2008; Guo et al., 2008).

D'autres approches analogues, basées sur le transfert d'énergie entre divers fluorophores permettant de suivre les interactions à trois partenaires, ont aussi été développées par la suite, tels le FRET/BiFC, le 3-FRET et le SRET. Dans le cas du FRET/BiFC, la technique est identique au BRET/BiFC, à l'exception que dans ce cas-ci, le donneur d'énergie n'est pas une enzyme, mais une protéine fluorescente. Par exemple, cette technique a été développée en utilisant la CFP comme donneur d'énergie et la YFP séparée en deux fragments comme accepteur d'énergie (Shyu et al., 2008). Toutefois, jusqu'à maintenant, cette approche s'est limitée à l'étude des facteurs de transcription et n'a pas été appliquée aux complexes protéiques comprenant des RCPGs. Le 3-FRET, quant à lui, repose sur le transfert d'énergie séquentiel entre la CFP, la YFP et la RFP, suite à l'excitation de la CFP. Contrairement au BRET/BiFC et au FRET/BiFC, plutôt que d'être basé sur le transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur d'énergie reconstitué à partir de deux fragments, dans ce cas-ci, le transfert d'énergie se fait entre trois protéines entières. Cette approche a été utilisée pour démontrer l'assemblage en oligomère comprenant plus de deux sous-unités pour les récepteurs α_{1b} AR (Lopez-Gimenez et al., 2007). Le principal désavantage de la technique de 3-FRET provient du fait qu'un transfert d'énergie direct entre la CFP et la RFP, indépendant de la YFP, est aussi observé, compliquant de façon considérable l'analyse et l'interprétation des résultats. Il faut ainsi déterminer quelle proportion du signal provient réellement du transfert d'énergie entre les trois partenaires CFP, YFP et RFP, et le dissocier du signal provenant du transfert direct entre CFP et RFP. Finalement, une technique baptisée SRET, qui combine le BRET et le FRET, permet aussi la détection d'interactions entre trois protéines. Dans cette approche, la *luc*, utilisée comme donneur d'énergie, provoque l'excitation de la GFP (BRET), qui à

son tour entraîne l'excitation de la YFP (FRET), par exemple. Le SRET a permis de suggérer la présence de complexes comprenant les récepteurs cannabinoïde CB1, dopamine D2 et adénosine A_{2A} (Carriba et al., 2008). Encore une fois, le désavantage principal de cette technique découle du fait qu'un transfert d'énergie direct peut être observé entre la *Rluc* et le troisième partenaire YFP, pouvant donc entraîner une interprétation erronée des résultats. Tout comme dans le cas du 3-FRET, l'utilisation de cette technique requiert une analyse complexe des données obtenues. Par ailleurs, dans les expériences basées sur le transfert d'énergie de résonance, une perte d'énergie est observée à chaque transfert d'un donneur vers un accepteur d'énergie. Ainsi, dans le cas du 3-FRET et du SRET, cette perte d'énergie est très importante puisque ces approches reposent sur deux transferts d'énergie successifs, ce qui entraîne une baisse considérable de la sensibilité de ces deux approches.

Ces dernières années ont donc vu l'apparition de plusieurs techniques permettant l'étude de complexes trimériques dans un contexte de cellules vivantes. Chacune d'entre elles comportent des avantages et des inconvénients. L'approche de BRET/BiFC exposée dans la présente thèse se démarque des techniques de 3-FRET et de SRET de part le fait qu'aucun transfert d'énergie n'est possible en l'absence de reconstitution des deux fragments de la YFP, ce qui simplifie considérablement l'analyse et l'interprétation des résultats. D'autre part, il est possible de combiner le BRET/BiFC avec un essai de complémentation de la *Rluc*, ce qui permet la détection d'une interaction stable entre quatre protéines dans un contexte de cellules vivantes (Guo et al., 2008), représentant un outil de choix pour l'étude des « signalosomes ». Toutefois, le principal inconvénient de l'approche de BRET/BiFC provient de la possibilité de stabilisation d'un complexe transitoire entre deux protéines suite à la reconstitution de la YFP. En effet, un débat subsiste toujours à savoir si les deux fragments de la YFP peuvent se dissocier à nouveau suite au réassemblage de la protéine fluorescente (Kerppola, 2006). Cet inconvénient ne pose pas de problèmes pour la détection des interactions protéiques stables, mais limite l'étude des complexes dynamiques. L'utilisation d'un essai de BRET basé sur la complémentation de fragments de la *Rluc* plutôt que de la YFP, permet de pallier à cet inconvénient. En effet, il

a été récemment démontré que pour certains essais de complémentation de la *Rluc*, les deux fragments peuvent se dissocier suite à leur réassemblage (Stefan et al., 2007), permettant ainsi la détection de complexes dynamiques. Une autre limitation de l'approche de BRET/BiFC est due à la difficulté de générer des courbes de titration à partir de cette approche, ce qui rend plus difficile la validation de la spécificité des signaux mesurés (voir section 1.1 de la discussion). La génération de courbes de titration implique l'expression d'une quantité croissante d'accepteur d'énergie, ce qui est impossible dans le cas du BRET/BiFC dû aux faibles niveaux de fluorescence obtenus suite à la reconstitution de la YFP. En effet, dans les essais de complémentation, l'activité de la protéine reconstituée est généralement beaucoup plus faible que celle de la protéine native (Kerppola, 2006). Afin de pouvoir s'assurer de la spécificité des signaux de BRET/BiFC détectés, il est donc important d'utiliser des contrôles négatifs appropriés, et de s'assurer que les niveaux d'expression des donneurs et accepteurs d'énergie sont similaires dans toutes conditions. Encore une fois, l'utilisation d'un essai de BRET basé sur la complémentation de fragments de la *Rluc* plutôt que de la YFP permet de pallier à cette limitation du BRET/BiFC, puisque contrairement aux faibles niveaux de fluorescence de la YFP, des niveaux de luminescence de la *Rluc* peu élevés ne représentent pas un problème pour la génération de courbes de titration.

Dans tous les cas, ces approches basées sur le transfert d'énergie entre divers fluorophores impliquent la fusion des protéines d'intérêts avec les différents donneurs et accepteurs d'énergie. De telles protéines chimériques peuvent voir leurs fonctions affectées par la présence de ces accepteurs et donneurs d'énergie. Bien que cette altération potentielle de la fonction des protéines suite à l'ajout de la *Rluc* ou des différents variants de la GFP puisse limiter l'application de ces techniques de transfert d'énergie, il est intéressant de noter que de telles protéines de fusion ont été générées avec succès pour diverses familles de protéines. En effet, la fusion du donneur ou de l'accepteur d'énergie sous forme complète ou sous forme de fragments, ne semble pas affecter les rôles joués par les RCPGs, les protéines G hétéro-trimériques, la β -arrestine, la β_2 -adaptine et les GRKs dans la

signalisation cellulaire (Angers et al., 2000;Gales et al., 2005;Hamdan et al., 2007;Jorgensen et al., 2008) (*Tableau I, Figure 1 et 2, article 1; Figure 2, article 2*).

2. Modèle proposé pour l'assemblage oligomérique du CLR et de RAMP1

À partir de l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse, un modèle a pu être élaboré concernant l'assemblage oligomérique du CLR et de RAMP1, présenté à la Figure 16. En absence de récepteurs partenaires, RAMP1 sous forme d'homo-oligomères plus grand que le dimère (représenté ici en trimères) peut voyager entre le RE et le Golgi, sans toutefois parvenir à la membrane plasmique. RAMP1 peut également former des hétéro-oligomères avec RAMP2 et RAMP3 (non représentés ici), qui seront eux-aussi retenus à l'intérieur de la cellule. Le récepteur CLR quant à lui, est retenu dans le RE en absence des RAMPs, sous forme d'homo-dimères. La co-expression du CLR avec RAMP1, entraîne la formation de complexes constitués d'un homo-dimère de CLR interagissant avec un monomère de RAMP1, qui seront acheminé à la membrane plasmique pour former le récepteur CGRP1. Le modèle présente les RAMPs sous formes trimériques plutôt que dimériques en absence du CLR, et le récepteur sous forme dimérique plutôt que trimérique, ce qui a été suggéré par nos résultats mais demeure à être confirmé (voir sections 3 et 4 de la discussion).

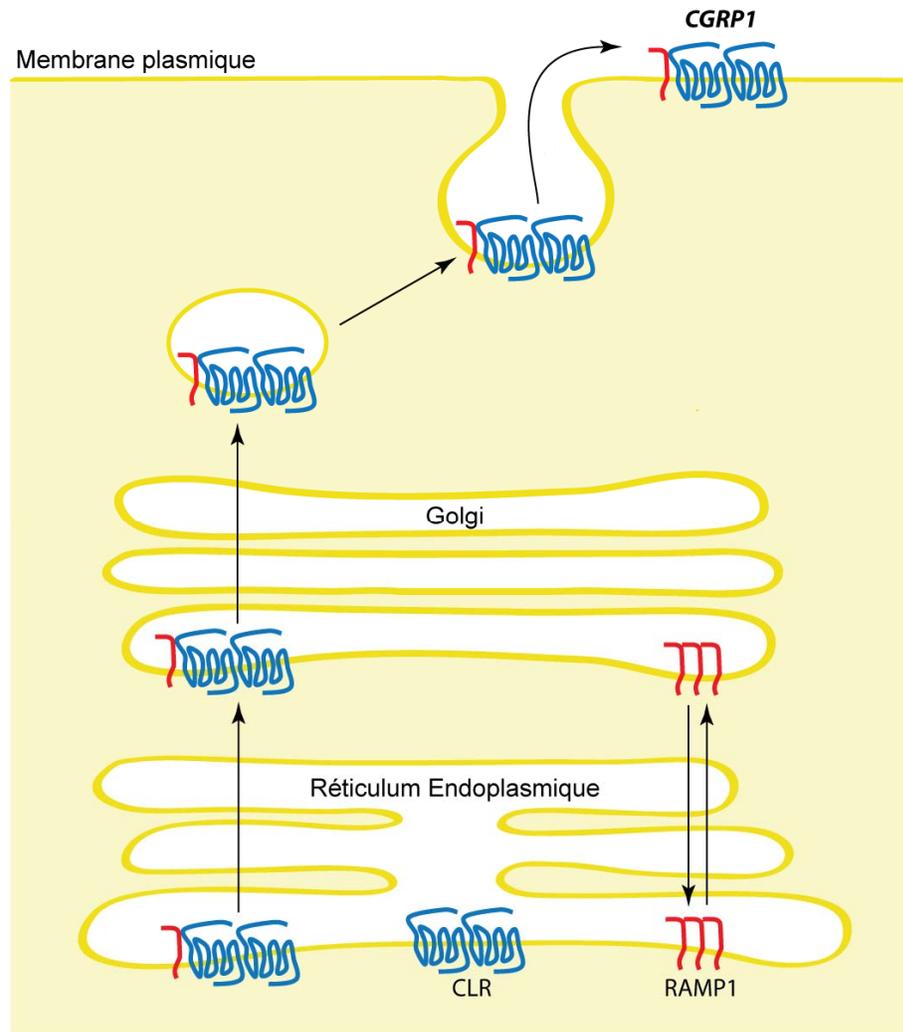


Figure 16. Modèle proposé pour l'assemblage oligomérique du CLR et de RAMP1.

Tel qu'illustré à la Figure 16, les travaux que nous avons réalisés ont permis de démontrer que RAMP1, qui forme des homo-oligomères en absence du CLR, se retrouve sous forme monomérique lorsqu'associé avec le récepteur à la surface cellulaire. Afin d'expliquer ce changement d'état d'oligomérisation de RAMP1, nous pouvons envisager différents scénarios. D'une part, le RAMP1 néo-synthétisé pourrait être immédiatement séquestré dans un complexe CLR/RAMP1, et donc ce RAMP1 associé au récepteur ne

formerait à aucun moment des homo-oligomères. Les formes monomériques et homo-oligomériques de RAMP1 pourraient également être en équilibre à l'intérieur de la cellule, et le CLR viendrait se lier à la forme monomérique. Finalement, le CLR pourrait promouvoir la dissociation des homo-oligomères de RAMP1 pré-formés. Cette dissociation pourrait avoir lieu de façon précoce, au niveau du RE, lors de la rencontre initiale entre le récepteur et la protéine accessoire à 1TM (modèle 1 de la Figure 17), ou alors survenir plus loin dans la voie de sécrétion, au niveau du Golgi par exemple, impliquant la formation d'un complexe transitoire entre le CLR et les homo-oligomères de RAMP1 (modèle 2 de la Figure 17). De façon similaire, les formes monomériques et homo-oligomériques du RAMP1 pourraient être en équilibre au niveau du RE et du Golgi, et alors que le CLR serait lié à la forme homo-oligomérique du RAMP1 dans le RE, l'homo-oligomère de RAMP1 serait ensuite échangé pour le monomère au niveau du Golgi (modèle 2 de la Figure 17). Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'une dissociation de l'homo-oligomère de RAMP1 en monomères ou d'un échange entre la forme homo-oligomérique et monomérique du RAMP1 associée au CLR, ce modèle implique la formation d'un complexe transitoire entre le CLR et les homo-oligomères de RAMP1, entre le RE et le Golgi par exemple, que nous n'aurions pas détecté dans nos expériences dû à sa nature transitoire. La formation d'un tel complexe CLR/CLR/RAMP1/RAMP1/RAMP1 le long de la voie de sécrétion est intéressante, puisqu'elle permettrait d'appuyer un rôle pour les homo-oligomères de RAMP1 dans l'acheminement à la surface du récepteur CLR. Ainsi, nous pourrions suggérer que dans le cas du CLR, pour lequel les RAMPs jouent deux rôles distincts (un rôle de chaperone ainsi qu'un rôle de co-récepteur), chaque état d'oligomérisation de RAMP1 serait associé à une fonction particulière: l'acheminement à la surface cellulaire du récepteur serait effectuée par les homo-oligomères de RAMP1, qui seraient ensuite dissociés ou échangés pour permettre à la forme monomérique de RAMP1 de moduler la pharmacologie du CLR au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats ne permettent pas de confirmer, ni d'exclure ce modèle 2 présenté à la Figure 17. En effet, la limite de sensibilité des approches de BRET/BiFC et de co-immunoprécipitation/BiFC pourrait

expliquer que nous n'ayons pas pu détecter le complexe transitoire formé entre le récepteur et les homo-oligomères de RAMP1 (*Figures 5 et 6, article 2*). Par ailleurs, bien que nous ayons observé une compétition du CLR pour les homo-oligomères de RAMP1, il reste toujours une proportion importante d'homo-oligomères de RAMP1 même en présence du récepteur (*Figure 1B, article 2*). Finalement, la localisation intracellulaire de ces homo-oligomères de RAMP1 en présence du CLR concorde avec un rôle pour les complexes RAMP1/RAMP1 dans l'acheminement du récepteur le long de la voie de sécrétion (*Figure 7C, article 2*).

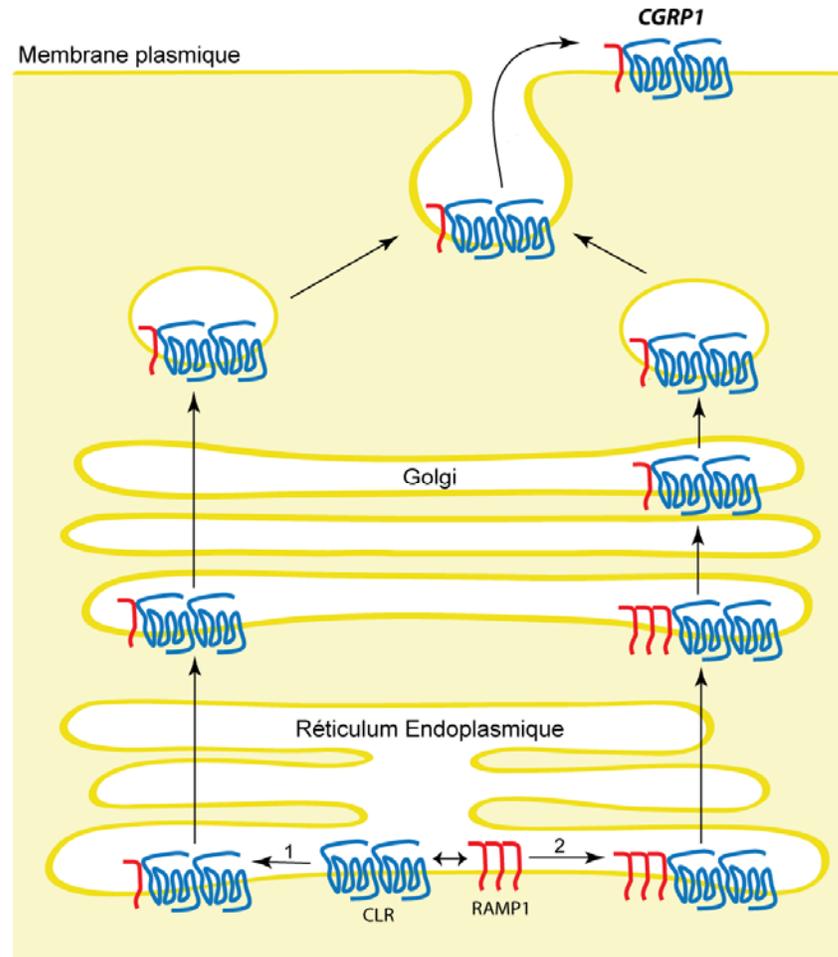


Figure 17. Modèles proposés pour la formation du complexe entre un homo-oligomère de CLR et un monomère de RAMP1.

Selon le premier modèle, le CLR interagit uniquement avec la forme monomérique de RAMP1. Lors de la rencontre initiale entre le récepteur et la protéine accessoire au niveau du RE, le CLR s'associe avec le monomère de RAMP1. Dans le second modèle, un complexe transitoire est formé entre le CLR et l'homo-oligomère de RAMP1 au niveau du RE, et l'homo-oligomère de RAMP1 associé au CLR sera dissocié en monomères ou échangé pour la forme monomérique de RAMP1, plus loin dans la voie de sécrétion, au niveau du Golgi par exemple.

3. Homo-oligomérisation de RAMP1

Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'assemblage homo-oligomérique de la protéine accessoire RAMP1 dans un contexte de cellules vivantes. Des expériences de courbe de titration de BRET et de rétention intracellulaire d'un RAMP1 tronqué par son homologue sauvage, ont permis de démontrer l'association entre un minimum de deux molécules de RAMP1 (*Figure 7A et 9, article 1*). Par ailleurs, un robuste signal de BRET/BiFC a été observé entre RAMP1-Rluc et le complexe RAMP1-YN/RAMP1-YC (*Figure 5C, article 2*), suggérant la présence d'une interaction entre trois molécules de RAMP1. Toutefois, quoiqu'intéressante, cette observation devra attendre la confirmation par d'autres techniques avant de pouvoir conclure que les homo-oligomères de RAMP1 sont bel et bien constitués de plus de deux sous-unités. En effet, à partir de l'approche de BRET/BiFC, nous avons observé le transfert d'énergie entre trois molécules de RAMP1 à une seule quantité donnée de donneur et d'accepteur d'énergie. Afin de pouvoir confirmer cette observation, il serait utile par exemple de générer des courbes de titration en utilisant la complémentation de la Rluc combinée avec le BRET (voir section 1.2 de la discussion).

Peu importe le nombre exact de molécules de RAMP1 formant l'homo-oligomère, celui-ci est vraisemblablement localisé au niveau du RE et du Golgi. En effet, en absence de co-expression du CLR, même si RAMP1 ne peut être acheminé à la membrane plasmique, celui-ci peut voyager entre le RE et le Golgi (Hilairt et al., 2001a). Ainsi, étant donné que les résultats démontrant la présence d'homo-oligomères de RAMP1 ont été obtenus en absence de co-expression d'un récepteur partenaire (*Figure 7A, article 1; Figure 5C, article 2*), nous pouvons suggérer que de tels assemblages oligomériques sont localisés au niveau du RE et du Golgi. Par ailleurs, nous avons également tiré avantage de l'utilisation d'un RAMP1 tronqué, dont l'abolition de la queue C-terminale entraîne son acheminement à la surface cellulaire de façon indépendante de l'association avec le CLR (Steiner et al., 2002), afin de confirmer cette localisation intracellulaire des homo-oligomères de RAMP1. En effet, nous avons démontré que l'association de ce RAMP1

tronqué avec son homologue sauvage entraîne sa rétention intracellulaire, suggérant ainsi que l'assemblage homo-oligomérique de RAMP1 survient tôt durant sa biosynthèse, probablement au niveau du RE et du Golgi (*Figure 9, article 1*).

D'autre part, les résultats de BRET que nous avons obtenus ont également permis de suggérer la présence d'hétéro-oligomères entre RAMP1/RAMP2 et RAMP1/RAMP3 (*Figure 7B et 7C, article 1*). Cette observation est confirmée par la rétention intracellulaire du RAMP1 tronqué en présence du RAMP3 sauvage (Figure 18). En effet, comme dans le cas de l'homo-oligomère de RAMP1, nous avons constaté que la co-expression du RAMP1 tronqué avec le RAMP3 sauvage, entraîne la rétention à l'intérieur de la cellule de ce RAMP1 tronqué. En plus de valider la présence d'hétéro-oligomères RAMP1/RAMP3, cette observation indique que comme dans le cas des homo-oligomères de RAMP1, ces hétéro-oligomères sont formés tôt au cours de la biosynthèse.

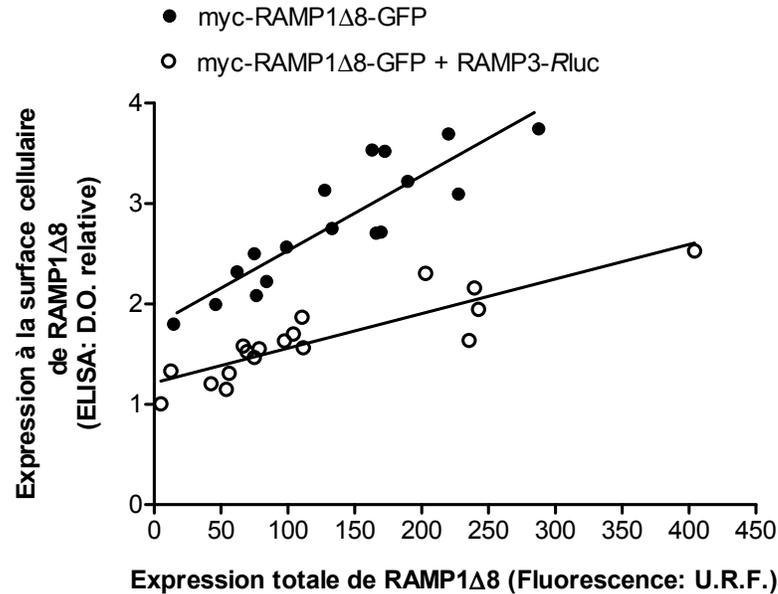


Figure 18. Influence de la co-expression du RAMP3 sauvage sur le ciblage à la membrane plasmique de RAMP1Δ8.

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec des quantités croissantes de myc-RAMP1Δ8-GFP seul ou en combinaison avec une quantité fixe de RAMP3-Rluc. L'expression à la surface cellulaire de myc-RAMP1Δ8-GFP a été testée en suivant l'épitope myc par ELISA, et corrélée avec son expression totale en mesurant la fluorescence provenant de la GFP. Les droites représentent les résultats obtenus dans trois expériences indépendantes.

3.1 Rôles de l'assemblage homo-oligomérique de RAMP1

Des évidences obtenues à partir d'études de co-immunoprécipitation avaient permis de suggérer que tout comme dans le cas de RAMP1, les protéines accessoires à 1TM MRAP et LRP6, partenaires des récepteurs MC2 et Fz respectivement, forment également

des homo-oligomères. De façon surprenante, dans le cas de MRAP, les homo-dimères sont antiparallèles (une protéine est dans l'orientation de type I, alors que la deuxième protéine est de type II) (Sebag and Hinkle, 2007). Le rôle de l'assemblage oligomérique de MRAP demeure toutefois inconnu et il reste à déterminer si la forme homo-oligomérique de MRAP interagit avec le récepteur MC2. Pour ce qui est du co-récepteur LRP6, il a été démontré que la formation d'homo-oligomères de LRP6 est requise pour sa phosphorylation, ce qui permet la stabilisation de la β -caténine (Bilic et al., 2007). Ainsi, l'interaction LRP6/LRP6 serait essentielle à l'activation de la voie β -caténine par les récepteurs Fz. En ce qui a trait à NinaA, ODR4/RTP et M10, les protéines accessoires des récepteurs rhodopsine, olfactifs et des phéromones V2, leur état oligomérique reste à être déterminé.

À la lumière de nos résultats démontrant qu'une seule molécule de RAMP1 se retrouve associée au CLR dans le récepteur CGRP1 (*article 2*), il paraît clair que contrairement au co-récepteur LRP6 qui doit oligomériser pour assurer la transmission de la signalisation par les récepteurs Fz, dans le cas de RAMP1, c'est la forme monomérique qui est impliquée dans la propagation de l'information via le CLR. Ainsi, un rôle direct pour l'homo-oligomérisation de RAMP1 dans la signalisation par le CLR est à exclure. Cependant, il pourrait être envisagé que la présence de complexes RAMP1/RAMP1 régule la formation du récepteur CGRP1 en séquestrant le RAMP1 monomérique disponible pour l'interaction avec le CLR.

Étant donné la localisation intracellulaire des oligomères de RAMP1, un rôle dans le transport le long de la voie de sécrétion pourrait également être envisagé. D'autres protéines à 1TM localisées au niveau du RE et du Golgi, possédant une topologie similaire à RAMP1 (type I avec une courte queue C-ter cytoplasmique), tels les récepteurs-cargos ERGIC-53 et les protéines de la famille p24, doivent obligatoirement oligomériser pour permettre la translocation de leurs divers substrats protéiques du RE vers le Golgi (Appenzeller et al., 1999; Emery et al., 2000). Par ailleurs, similairement à RAMP1 qui semble former des complexes homo-oligomériques comprenant plus de deux sous-unités,

ERGIC-53 s'associe en homo-hexamères. Bien que la forme monomérique de ERGIC-53 puisse lier son substrat protéique, celle-ci est incapable de sortir du RE, et seule la forme homo-oligomérique peut acheminer le substrat protéique du RE au Golgi (Appenzeller et al., 1999). De façon analogue, l'homo-oligomérisation des RAMPs pourraient être nécessaire à leur fonction de chaperone pour les récepteurs. Dans le modèle 2 proposé à la Figure 17, nous évoquons l'hypothèse que dans le cas du CLR, la forme homo-oligomérique de RAMP1 pourrait permettre d'acheminer le récepteur le long de la voie de sécrétion, pour finalement se dissocier afin d'obtenir un monomère de RAMP1 lié au CLR à la surface cellulaire. Toutefois, ce modèle implique la formation d'un complexe transitoire entre l'homo-oligomère de RAMP1 et le CLR, que nous n'aurions pas détecté au cours de nos travaux.

Par ailleurs, il pourrait également être proposé que l'assemblage asymétrique entre un monomère de RAMP1 et un homo-oligomère de récepteur tel que démontré dans le cas du CLR (*article 2*), ne s'applique pas à tous les récepteurs interagissant avec les RAMPs. Ainsi, nous pourrions envisager que pour certains récepteurs où l'interaction avec les RAMPs sert uniquement à l'acheminement à la surface cellulaire du RCPG (comme c'est le cas pour le CaSR par exemple, où les RAMPs agissent seulement comme chaperones et non comme co-récepteurs), la forme homo-oligomérique de RAMP s'associe avec le récepteur et permet sa translocation du RE vers le Golgi. Alors que dans les cas où les RAMPs agissent comme co-récepteurs des RCPGs, tels le CLR et le CTR, on pourrait proposer que le modèle asymétrique d'un homo-oligomère de RCPG interagissant avec un monomère de RAMP s'applique. Cette possibilité d'assemblage différentiel entre les RCPGs et les RAMPs, selon le rôle joué par le RAMP dans la fonction du récepteur, demeure une hypothèse. Ainsi, il reste à déterminer si l'asymétrie démontrée pour la stœchiométrie du récepteur CGRP1 s'applique aussi aux autres récepteurs interagissant avec les RAMPs. Par ailleurs, on peut également s'interroger sur la stœchiométrie d'interaction des récepteurs AM1 et AM2. On peut évidemment poser l'hypothèse que de façon analogue aux complexes CLR/RAMP1, les complexes CLR/RAMP2 et

CLR/RAMP3 sont également constitué d'un homo-oligomère de récepteur interagissant avec un monomère de RAMP, mais celle-ci demeure à être testée.

Pour ce qui est des hétéro-oligomères formés entre RAMP1/RAMP2 et RAMP1/RAMP3, des rôles similaires à ceux proposés pour l'homo-oligomère de RAMP1 peuvent être envisagés, étant donné leur localisation intracellulaire. Ainsi, un rôle dans le transport le long de la voie de sécrétion pourrait être proposé pour les hétéro-oligomères de RAMP1. De façon intéressante, il a été démontré que la délétion des 8 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale des différents RAMPs affecte leur ciblage vers la membrane plasmique de façon différente (voir section 3.3.1 de l'introduction). En effet, la délétion de la queue C-ter de RAMP1 entraîne l'acheminement à la surface cellulaire de ce RAMP1 de façon indépendante du CLR, alors que la même délétion sur RAMP2 provoque sa rétention intracellulaire même en présence d'un récepteur partenaire (Steiner et al., 2002; Kuwasako et al., 2006). Une délétion équivalente sur RAMP3 n'a aucun effet sur le ciblage à la membrane plasmique du complexe CLR/RAMP3 (Kuwasako et al., 2006). Ainsi, les mécanismes impliqués dans l'acheminement à la surface cellulaire semblent différents selon le RAMP concerné. En présumant que l'assemblage oligomérique des RAMPs joue un rôle dans le ciblage vers la membrane plasmique des récepteurs, il pourrait être envisagé que les hétéro-oligomères RAMP1/RAMP2 et RAMP1/RAMP3 modulent le transport des récepteurs le long de la voie de sécrétion par le biais de mécanismes différents de ceux employés par les homo-oligomères de RAMP1.

Malgré toutes ces hypothèses, la fonction réelle de ces assemblages homo- et hétéro-oligomériques de RAMP1 reste à éclaircir. Afin d'établir un lien entre l'acheminement à la membrane plasmique et l'assemblage oligomérique de RAMP1, nous nous sommes intéressés à une étude rapportant la rétention intracellulaire de RAMP1 mutés sur différents résidus cystéines, même en présence du CLR. En effet, il a été démontré que la mutation ponctuelle d'un des quatre résidus cystéine conservés dans le N-ter de RAMP1 bloque l'acheminement à la surface du complexe CLR/RAMP1 (Steiner et al., 2003). Par ailleurs, cette rétention intracellulaire d'un RAMP1 muté au niveau d'un de ces résidus

cystéine conservés (RAMP1C104A) n'est pas causée par une incapacité de cette protéine accessoire à interagir avec le CLR (*Figure 5B, article 1*). Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'incapacité du RAMP1C104A à être acheminé vers la membrane plasmique serait due à une incapacité de ce RAMP1 mutant à former des homo-oligomères. Tel que montré à la Figure 19, un transfert d'énergie spécifique a été détecté entre le RAMP1C104A et son équivalent sauvage, indiquant que ce RAMP1 mutant possède toujours sa capacité d'homo-oligomérisation. Ainsi, le blocage du transport le long de la voie de sécrétion de ce RAMP1 mutant n'est pas dû à une incapacité à homo-oligomériser. Les évidences reliant le ciblage à la membrane plasmique et l'oligomérisation de RAMP1 sont donc toujours manquantes.

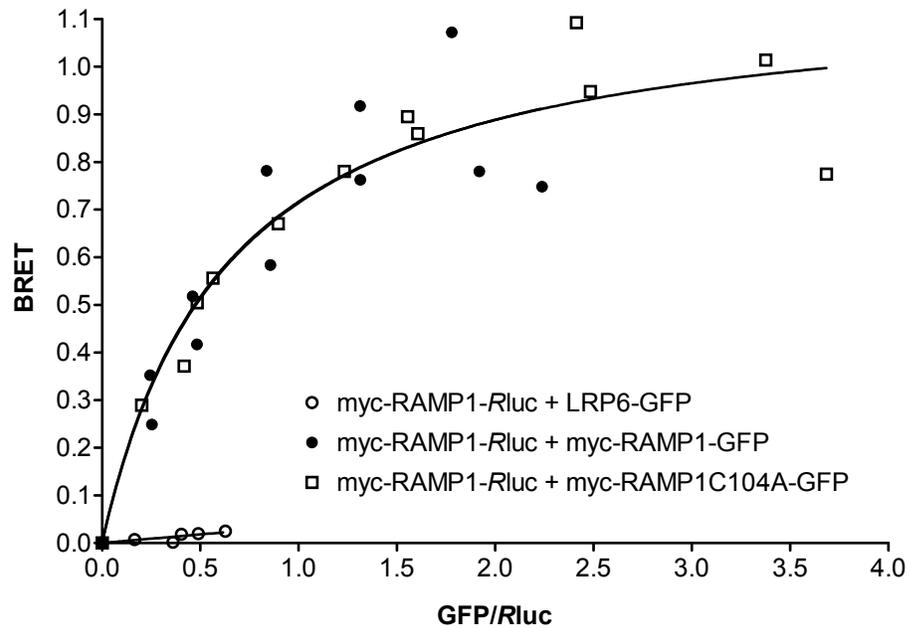


Figure 19. Homo-oligomérisation de RAMP1C104A.

Les courbes de titration de BRET ont été obtenues à partir de cellules HEK293T transfectées avec une quantité constante de myc-RAMP1-Rluc et une quantité croissante de LRP6-GFP (utilisé comme contrôle négatif), myc-RAMP1-GFP ou myc-RAMP1C104A-GFP. Les valeurs de BRET sont exprimées en fonction du ratio total de GFP sur Rluc obtenu en mesurant la fluorescence et la luminescence pour chaque condition. Les courbes représentent les résultats de deux expériences indépendantes.

Afin de clarifier la fonction des assemblages homo- et hétéro-oligomériques entre les RAMPs, une étude des déterminants moléculaires nécessaires à l'interaction RAMP/RAMP serait requise. En générant des mutants incapable d'oligomériser, il serait alors possible de tester directement le rôle de ces interactions dans les diverses fonctions des RAMPs. Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de démontrer que ni le

domaine C-ter, ni le résidu cystéine 104 du domaine N-ter ne sont impliqués dans l'assemblage homo-oligomérique de RAMP1. En effet, un RAMP1 auquel le domaine C-ter a été tronqué, ou auquel le résidu C104 a été muté, conserve sa capacité d'interaction avec son homologue sauvage (*Figure 8B, article 1* et *Figure 19*). À partir de ces résultats, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie des résidus nécessaires à l'interaction RAMP1/RAMP1 afin d'éventuellement attribuer un rôle à de tels assemblages oligomériques.

4. Homo-oligomérisation du CLR

Étant donné que l'oligomérisation entre les RCPGs joue un rôle similaire à l'assemblage hétéro-oligomérique des récepteurs avec les protéines accessoires à 1 TM dans le ciblage à la surface cellulaire, la pharmacologie, l'activation et la régulation fine de la signalisation des RCPGs (section 2 de l'introduction), nous avons voulu déterminer si ces deux types d'assemblage oligomérique des RCPGs interfèrent l'un avec l'autre. Les résultats de co-immunoprécipitation et de BRET que nous avons obtenu ont indiqué que même s'il doit obligatoirement interagir avec les RAMPs, le CLR conserve malgré tout sa capacité d'homo-oligomérisation (*Figure 6, article 1*). D'autres membres de la famille S dont l'association avec les RAMPs a été proposée, tels le CTR et le VPAC1R (voir Tableau II), ont aussi été démontré comme formant des complexes RCPGs/RCPGs (Seck et al., 2003; Harikumar et al., 2006), indiquant une fois de plus que même si un récepteur peut utiliser une protéine accessoire comme partenaire, il peut également s'assembler avec d'autres R7TM.

De façon analogue, d'autres RCPGs interagissant avec des protéines accessoires à 1TM différentes des RAMPs, possèdent eux-aussi la capacité d'interagir avec des R7TM. Par exemple, une étude dans laquelle nous avons été impliqués (*article 3* en annexe), a démontré que les récepteurs Fz peuvent s'assembler en oligomères avec d'autres récepteurs

Fz. De façon intéressante, cette étude a mis en évidence un rôle physiologique pour cet assemblage en homo-oligomères Fz/Fz. Une mutation du récepteur Fz4 présente chez les individus atteints de la pathologie autosomale dominante de vitréorétinopathie exsudative familiale entraîne la rétention du récepteur au niveau du RE. Dans cet article, nous avons pu démontrer que l'assemblage en oligomères entre la forme mutante de Fz4 et son homologue sauvage, entraîne la rétention intracellulaire de la forme sauvage du Fz4, ce qui contribue probablement à la dominance génétique de cette pathologie. Comme mentionné dans l'introduction, les récepteurs Fz interagissent avec la protéine accessoire à 1TM LRP6, et cette interaction est requise pour l'activation de la signalisation par la voie de la β -caténine (voir section 2.2 de l'introduction). Ainsi, tout comme dans le cas du CLR et des RAMPs, la capacité d'interaction des récepteurs Fz avec le co-récepteur LRP6 n'interfère pas avec la formation d'homo-oligomères Fz/Fz.

Par ailleurs, contrairement au RAMP1 qui semble former des homo-oligomères comprenant plus de deux sous-unités, aucun transfert d'énergie n'a pu être détecté entre trois molécules de CLR (*Figure 5B, article 2*), suggérant que ce récepteur ne s'assemble pas en complexe plus grand que l'homo-dimère, et que le récepteur CGRP1 serait constitué uniquement de deux molécules de CLR liées à un monomère de RAMP1. Cette information demande toutefois à être confirmée par d'autres approches avant de pouvoir conclure de façon définitive sur l'absence de formes oligomériques plus grandes que le dimère pour le CLR. En effet, une absence de transfert d'énergie n'est pas nécessairement synonyme d'une absence d'interaction, et l'utilisation de la technique de co-immunoprécipitation séquentielle serait utile afin de valider cette absence d'assemblage en homo-oligomères de plus de deux sous-unités pour le CLR. Récemment, la possibilité d'assemblage en oligomères de récepteurs comprenant plus de deux sous-unités a été étudiée pour plusieurs RCPGs, en utilisant la co-immunoprécipitation séquentielle ainsi que des nouvelles techniques basées sur le transfert d'énergie et la reconstitution de la fluorescence. Par exemple, en effectuant l'immunoprécipitation séquentielle de trois récepteurs portant des épitopes différents, il a été suggéré que le récepteur muscarinique M2 puisse s'assembler en

complexes comprenant plus de deux récepteurs (Park and Wells, 2004). Diverses variantes du FRET ont aussi permis de proposer que contrairement au récepteur mGluR1 qui se limite à l'assemblage dimérique, le récepteur α_{1b} -adrénergique (α_{1b} AR) s'assemble au minimum en homo-trimères, alors que le récepteur GABA_B forme au minimum des tétramères GABA_BR1/GABA_BR1/GABA_BR2/GABA_BR2 (Lopez-Gimenez et al., 2007;Maurel et al., 2008). D'autre part, la technique de BRET/BiFC seule ou combinée avec un essai de complémentation de la Rluc, a été utilisée pour démontrer que le récepteur adénosine A_{2A} s'assemble au minimum en homo-trimères et que les récepteurs dopamine D2 forment des complexes comprenant plus de trois sous-unités (Gandia et al., 2008;Guo et al., 2008). Finalement, une étude combinant le BRET et le FRET a suggéré que de tels assemblages constitués d'un minimum de trois récepteurs existent entre des sous-types de RCPGs différents, en étudiant les récepteurs cannabinoïde CB1, dopamine D2 et adénosine A_{2A} qui s'assemblent au minimum en trimères CB1/D2/A_{2A} (Carriba et al., 2008). Ainsi, dépendamment du récepteur étudié, la forme dimérique (CLR et mGluR1) ou une forme plus grande que le dimère (α_{1b} AR, GABA_BR, CB1, D2 et A_{2A}) est observée. Il pourrait être envisagé que dans le cas des récepteurs formant uniquement des dimères, la capacité d'interaction avec d'autres partenaires protéiques membranaires, tels les RAMPs, bloque la formation d'oligomères de récepteurs plus grand que le dimère.

4.1 Rôles de l'assemblage homo-oligomérique du CLR

En absence de RAMPs, le CLR est localisé au niveau du RE (Hilairt et al., 2001a). Étant donné que les évidences démontrant l'homo-oligomérisation du CLR ont été obtenues lorsque le récepteur est exprimé seul (*Figure 6, article 1*), nous pouvons donc proposer que ces homo-oligomères sont localisés au niveau du RE en absence des RAMPs. Cette localisation intracellulaire des homo-oligomères de CLR suggère un rôle pour l'assemblage homo-oligomérique du CLR dans l'export du RE des récepteurs. Un rôle similaire a d'ailleurs été démontré pour l'homo-oligomérisation du récepteur β_2 AR, qui serait requise

pour l'acheminement à la membrane plasmique de ce récepteur (Salahpour et al., 2004). Ainsi, nous pourrions poser l'hypothèse que non seulement le CLR a besoin d'interagir avec les RAMPs, mais il doit également former des complexes CLR/CLR afin d'être adéquatement acheminé vers la surface cellulaire. On pourrait par exemple imaginer que la forme homo-oligomérique du CLR est nécessaire pour masquer le signal de rétention présent au niveau de l'extrémité C-ter de RAMP1, ce qui permet ensuite au complexe CLR/CLR/RAMP1 d'être ciblé à la membrane plasmique.

Par ailleurs, l'homo-oligomère de CLR en association avec RAMP1, représente une entité signalétique fonctionnelle. Cette fonctionnalité du complexe constitué d'un homo-oligomère de CLR associé à RAMP1 en tant que récepteur du CGRP, a été validée par le recrutement de la β -arrestine au complexe CLR/CLR en présence de RAMP1, suite à la stimulation par le neuropeptide CGRP (*Figure 8, article 2*). En démontrant la formation d'un complexe stable entre la β -arrestine et l'homo-oligomère de CLR, cette observation valide par le fait même la fonctionnalité des oligomères de RCPGs. Deux autres évidences avaient permis de démontrer précédemment que la β -arrestine interagit avec les oligomères de RCPGs. Tout d'abord, il a été observé que suite au recrutement forcé de la β -arrestine à l'une des sous-unités du dimère formé entre les récepteurs V1a et V2 vasopressine, on peut détecter par BRET l'interaction entre l'autre sous-unité réceptorielle et la β -arrestine, validant la présence d'un complexe à trois partenaires entre la β -arrestine et les deux récepteurs vasopressine (Terrillon and Bouvier, 2004). Ensuite, il a été démontré que le recrutement de la β -arrestine au récepteur muscarinique M3 requiert l'activation des deux récepteurs composants le dimère de RCPG (Novi et al., 2005). Nos résultats ainsi que ceux présentés dans ces deux études, démontrent donc clairement la présence de complexes formés entre les oligomères de RCPG et la β -arrestine. De façon intéressante, la β -arrestine peut elle aussi former des oligomères dans les cellules vivantes (Storez et al., 2005). Même si certaines évidences ont d'abord suggéré un recrutement de la forme monomérique de la β -arrestine aux récepteurs (Milano et al., 2006), deux études récentes ont révélé la nécessité

de l'assemblage oligomérique de la β -arrestine dans l'activation de certaines voies de signalisation, dont les voies p53 et MAPK (Boullaran et al., 2007; Xu et al., 2008). Par ailleurs, en manipulant génétiquement les niveaux d'expression de la rhodopsine et de l'arrestine, Hanson *et al.* ont suggéré une stœchiométrie de 1 :1 pour la liaison de cette protéine régulatrice à la rhodopsine, à partir de souris transgéniques (Hanson et al., 2007). Ainsi, les résultats les plus récents tendent à suggérer une association entre les oligomères de récepteurs et les oligomères de β -arrestine, avec une stœchiométrie d'une molécule d'arrestine pour chaque récepteur.

5. Assemblage et signalisation du complexe CLR/RAMP1

5.1 Interaction entre CLR et RAMP1

Les conséquences fonctionnelles découlant de la co-expression du récepteur CLR avec la protéine accessoire RAMP sur le ciblage à la membrane plasmique et la pharmacologie du récepteur (McLatchie et al., 1998), combinées avec les études de co-immunoprécipitation et de réticulation d'un CGRP radio-marqué sur CLR et RAMP1 (Leuthauser et al., 2000; Hilairet et al., 2001a; Hilairet et al., 2001b), avaient suggéré la présence d'une interaction entre le récepteur et la protéine accessoire. Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de confirmer l'existence de tels complexes dans les cellules vivantes, en démontrant à partir de courbes de titration de BRET, la présence d'un transfert d'énergie spécifique entre le CLR et le RAMP1 auxquels ont été fusionnés un donneur et un accepteur d'énergie (*Figure 3, article 1*).

Dans le but de tester l'hypothèse selon laquelle un nombre beaucoup plus important de récepteurs que ce qui a été suggéré jusqu'à maintenant pour les récepteurs de la famille S et le CaSR, pourraient interagir avec les RAMPs, nous avons appliqué cet essai de BRET

mis au point entre CLR et RAMP1, à d'autres récepteurs. Comme récepteurs modèles, nous avons utilisé un récepteur de la famille S, le CTR, pour lequel de nombreuses évidences dans la littérature suggèrent son association avec les RAMPs, ainsi qu'un récepteur de la famille R, le β_2 AR, pour lequel aucune évidence ne suggère jusqu'à maintenant une interaction avec les RAMPs. La Figure 20 représente les courbes de titration de BRET obtenues entre RAMP1 et les récepteurs CTR ou β_2 AR, en utilisant le récepteur CLR comme contrôle positif. La présence d'une interaction spécifique entre le récepteur CTR et la protéine accessoire RAMP1 a été confirmée par la saturation du signal de BRET observée dans des cellules co-exprimant CTR-*Rluc* et RAMP1-YFP, avec un $BRET_{50}$ similaire à celui obtenu pour l'interaction entre CLR et RAMP1 ($BRET_{50}$ CTR/RAMP1 = 3.5 ± 0.3 ; $BRET_{50}$ CLR/RAMP1 = 8.1 ± 1.7). Ce résultat valide les données de co-immunoprécipitation (Leuthauser et al., 2000) et de pharmacologie (Christopoulos et al., 1999) retrouvées dans la littérature selon lesquelles les RAMPs servent de co-récepteurs pour le CTR. Contrairement au CLR et au CTR, dans le cas du β_2 AR, aucune saturation du signal n'a pu être observée et le $BRET_{50}$ mesuré est beaucoup plus élevé que celui calculé pour l'interaction entre CLR ou CTR et RAMP1 ($BRET_{50}$ β_2 AR/RAMP1 = 699.9 ± 188.8), ce qui suggère que l'affinité du β_2 AR pour RAMP1 est beaucoup plus faible que l'affinité du CLR ou du CTR pour cette même protéine accessoire à 1TM. Ainsi, le β_2 AR ne formerait pas de complexes avec RAMP1 dans les cellules vivantes. Toutefois, afin d'obtenir une mesure plus exacte de l'affinité des différents récepteurs pour RAMP1, il serait nécessaire de corréliser les niveaux de luminescence obtenus pour les différents récepteurs fusionnés à la *Rluc*, à des niveaux réel d'expression de ces récepteurs. Par ailleurs, avant de conclure de façon définitive que le récepteur β_2 AR ne forme pas de complexes avec les RAMPs, il serait nécessaire de confirmer ce résultat avec les techniques de co-immunoprécipitation et de BiFC par exemples. Les résultats que nous avons obtenus pour les récepteurs CTR et β_2 AR suggèrent que l'approche de BRET décrite dans cette thèse pourrait être utilisée pour discriminer les récepteurs interagissant avec les RAMPs, de ceux qui seraient incapables de former des complexes avec ces protéines accessoires à

1TM. Il serait intéressant d'appliquer cette approche de courbe de titration de BRET à un nombre beaucoup plus important de RCPGs, afin de déterminer si l'interaction avec les RAMPs est plus répandue que ce qui a été montré jusqu'à maintenant. Dans le cas où une saturation du signal de BRET entre un récepteur et un RAMP donné serait observée, il serait ensuite important de confirmer ce résultat avec des études fonctionnelles, dans lesquelles la modulation par le RAMP de l'acheminement à la surface cellulaire et des propriétés pharmacologiques de ce récepteur serait testée.

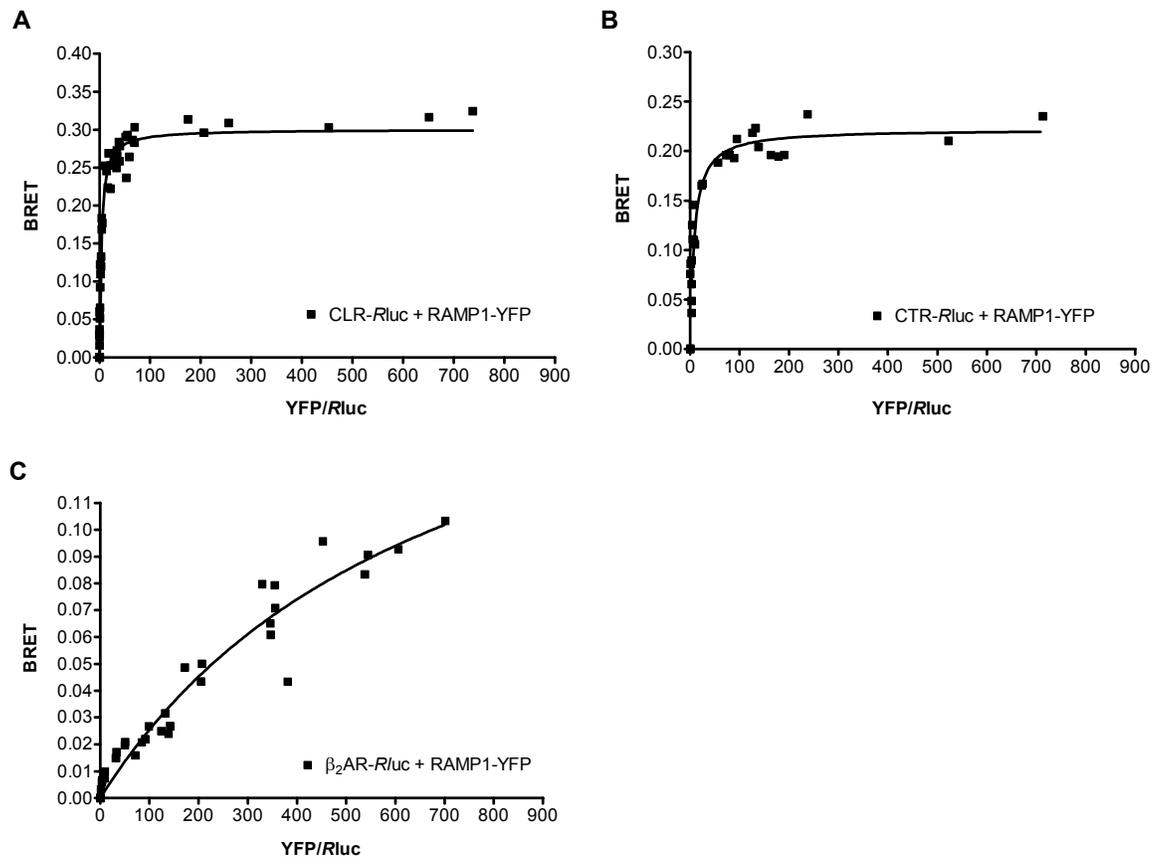


Figure 20. Courbe de titration de BRET entre RAMP1 et CLR, CTR ou β_2 AR.

Les courbes de titration de BRET ont été obtenues à partir de cellules HEK293T transfectées avec une quantité constante de CLR-Rluc (a), CTR-Rluc (b) ou β_2 AR-Rluc (c) et une quantité croissante de RAMP1-YFP. Les valeurs de BRET sont exprimées en fonction du ratio total de YFP sur Rluc obtenu en mesurant la fluorescence et la luminescence pour chaque condition. Les courbes représentent les résultats de trois expériences indépendantes.

5.2 Signalisation du complexe CLR/RAMP1

L'approche de BRET a également été utilisée pour confirmer l'implication du complexe CLR/RAMP1 dans la signalisation par le CGRP, en démontrant l'interaction entre le récepteur CLR et les protéines de signalisation, β -arrestine et la sous-unité $G\gamma$ de la protéine G hétéro-trimérique, en présence de RAMP1. De façon intéressante, non seulement la présence de RAMP1 est nécessaire pour obtenir l'interaction dépendante du ligand entre le CLR et les protéines de signalisation (*Figure 10, article 1*), mais nos résultats ont également démontré que le complexe CLR/RAMP1 représente l'unité fonctionnelle impliquée dans cette signalisation. En effet, nous avons montré le recrutement de la β -arrestine au complexe CLR/RAMP1 suite à la stimulation par le CGRP à partir du BRET/BiFC (*Figure 4, article 2*), confirmant la formation d'un complexe ternaire entre le CLR, le RAMP1 et la β -arrestine, en présence du ligand. Cette observation permet d'exclure la possibilité qu'une fois acheminé à la surface cellulaire et stimulé par le ligand, le CLR soit dissocié du RAMP1 pour ensuite interagir avec les différents partenaires de signalisation. La stabilité du complexe CLR/RAMP1 est par ailleurs confirmée par l'absence de modulation du transfert d'énergie entre le CLR-Rluc et le RAMP1-GFP suite à la stimulation par le CGRP (*Figure S2B, article 1*). La formation d'un complexe stable entre CLR et RAMP1, maintenu suite à la stimulation par le ligand, avait par ailleurs été suggérée à partir d'une étude démontrant qu'en présence de CGRP, le complexe CLR/RAMP1 est internalisé sous forme d'une entité stable (Hilaret et al., 2001a). D'autre part, l'observation d'un complexe entre le CLR, le RAMP1 et la β -arrestine par le BRET/BiFC (*Figure 4, article 2*), confirme également la présence du complexe CLR/RAMP1 à la surface cellulaire, étant donné que le recrutement de la β -arrestine aux récepteurs a lieu spécifiquement au niveau de la membrane plasmique. L'ensemble de ces résultats permettent donc de confirmer que le complexe CLR/RAMP1, formé initialement au niveau des compartiments intracellulaires, est acheminé à la membrane plasmique, où il

pourra lier le ligand CGRP et interagir avec les différentes protéines de signalisation, sous forme d'un complexe stable entre le récepteur et la protéine accessoire à 1TM.

Par ailleurs, en plus de nécessité la présence de RAMP1, l'interaction entre le CLR et la protéine RCP a également été suggérée comme étant essentielle à la transmission de la signalisation, suite à la stimulation par le CGRP (Evans et al., 2000). Toutefois, cette protéine RCP a également été identifiée comme constituant une sous-unité de l'ARN polymérase III (Siaut et al., 2003), ce qui questionne les recherches impliquant RCP dans la signalisation du CGRP. Au cours de ces travaux de doctorat, nous avons également tenté de détecter l'interaction entre RCP et CLR ou RAMP1 par le BRET, mais sans aucun succès. Toutefois, une absence de BRET ne reflète pas nécessairement une absence d'interaction (voir section 1.1 de la discussion), et une étude plus approfondie du rôle de RCP dans la formation du complexe CLR/RAMP1 serait requise afin de clarifier la fonction de cette protéine dans la signalisation du CGRP.

6. Stœchiométrie d'interaction du complexe CLR/RAMP1

En démontrant la présence de complexes CLR/CLR et RAMP1/RAMP1 dans des cellules vivantes, la première étude que nous avons réalisée nous a amené à nous interroger sur la stœchiométrie du complexe CLR/RAMP1. Des travaux réalisés précédemment dans des systèmes non-natifs avaient suggéré que le récepteur du CGRP soit constitué d'une seule molécule de CLR interagissant avec un seul RAMP1. En effet, suite à la réticulation d'un CGRP radio-marqué sur des cellules exprimant CLR et RAMP1, le complexe obtenu après immunoprécipitation correspond au poids moléculaire d'un seul CLR lié à un seul RAMP1 (Hilairt et al., 2001b). D'autre part, la co-expression d'un récepteur partenaire CLR ou VPAC1R entraîne un changement du ratio homo-dimère/monomère de RAMP1 détecté sur « Western Blot » suite à l'immunoprécipitation cette protéine accessoire, de telle sorte que l'espèce de haut poids moléculaire diminue alors que la forme monomérique

de RAMP augmente (Hilairret et al., 2001a; Udawela et al., 2004). Combiné avec le fait que suite à l'immunoprécipitation du complexe CLR/RAMP1, seule la forme monomérique de RAMP ait été observée en association avec le CLR à la surface cellulaire, ces observations suggèrent que l'homo-oligomère de RAMP1 ne s'associe pas avec le récepteur (Hilairret et al., 2001a). Toutefois, l'ensemble de ces résultats ont été obtenus sans tester directement l'interaction entre les divers partenaires impliqués. Les conclusions ont été tirées à partir de déduction concernant la nature des espèces observées sur « Western Blot », en utilisant des techniques impliquant la solubilisation des protéines, ce qui peut engendrer divers artéfacts, surtout dans le cas de protéines hydrophobes tels les RCPGs et les RAMPs. Il nous semblait donc important d'étudier la question de la stœchiométrie du complexe CLR/RAMP1 dans un contexte de cellules vivantes, en utilisant des approches permettant de tester directement la présence d'interactions entre les différents partenaires protéiques.

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de conclure que le récepteur CGRP1 est constitué d'un homo-oligomère de CLR associé à un monomère de RAMP1. L'apparente contradiction entre cette observation et la détection d'un complexe correspondant à une seule molécule de CLR associée à un RAMP1 suite à la réticulation du CGRP radio-marqué par un agent liant spécifiquement les résidus lysines (Hilairret et al., 2001b), s'explique possiblement par l'absence de lysines disponibles à proximité les unes des autres dans l'homo-oligomère de récepteur, empêchant la stabilisation du complexe CLR/CLR/RAMP1.

6.1 Une seule molécule de RAMP1 est présente chez le récepteur CGRP1

Les résultats que nous avons obtenus ont démontré que la forme homo-oligomérique de RAMP1 ne s'associe pas avec le récepteur CLR. En effet, les expériences de BRET ont révélé une compétition entre la formation de complexes CLR/RAMP1 et la formation d'homo-oligomères de RAMP1 (*Figure 1, article 2*), en accord avec les résultats d'immunoprécipitation publiés précédemment selon lesquels la présence d'un récepteur

partenaire entraîne une diminution dans la proportion de dimères de RAMP1 détectés sur « Western Blot » (Hilairet et al., 2001a; Udawela et al., 2004). Par ailleurs, l'homo-oligomère de RAMP1 n'a pu être détecté à la surface cellulaire suite à la co-expression du CLR, et aucun transfert d'énergie n'a été décelé entre un complexe RAMP1/RAMP1 et le CLR (*Figure 7C et Figure 5C, article 2*). Cependant, il pourrait être argumenté que même si la forme homo-oligomérique de RAMP1 ne s'associe pas avec le récepteur, chaque protomère de l'homo-oligomère de CLR pourrait interagir avec un monomère de RAMP1. En effet, l'absence de BRET entre RAMP1-Rluc et le complexe CLR-YN/RAMP1-YC (*Figure 5A, article 2*) ne permet pas d'exclure cette possibilité, puisqu'une absence de transfert d'énergie peut être due à une orientation non-permissive ou à une distance trop grande entre les deux monomères de RAMP1 liés à l'homo-oligomère de CLR. Contrairement aux expériences de BRET/BiFC, la technique de co-immunoprécipitation/BiFC quant à elle, n'est pas dépendante de l'orientation ou de la distance entre les protéines d'un même complexe, ainsi l'absence de co-immunoprécipitation du complexe CLR-YN/RAMP1-YC suite à l'immunoprécipitation du HA-RAMP1, nous a permis d'exclure cette possibilité et de conclure qu'un seul monomère de RAMP1 est associé à l'homo-oligomère de CLR.

6.2 Asymétrie du complexe CLR/RAMP1

Nos résultats démontrant l'asymétrie du complexe CLR/RAMP1 posent la question de la stœchiométrie d'interaction du récepteur CGRP1 avec le ligand CGRP et la protéine G hétéro-trimérique. En effet, sachant qu'un monomère de RAMP1 est associé à un homo-oligomère de récepteur, et que les RAMPs définissent les propriétés pharmacologiques du CLR et sont possiblement impliqués dans la liaison du ligand et le couplage avec la protéine G (voir sections 3.3.2 et 3.3.3 de l'introduction), on peut se demander comment une seule molécule de RAMP peut accommoder en même temps deux molécules de récepteurs. De façon analogue, plusieurs oligomères de RCPGs fonctionnent asymétriquement, que ce soit au niveau de la liaison du ligand, du changement

conformationnel des TM induit par cette liaison du ligand, ou de l'activation de la protéine G. En effet, dans le cas du récepteur GABA_B, une seule sous-unité du dimère (GABA_BR1) lie le ligand, alors que l'autre sous-unité (GABA_BR2) active la protéine G (Duthey et al., 2002). Pour ce qui est du récepteur mGluR1, la liaison du ligand se fait au niveau des deux récepteurs composant le dimère, mais suite à la liaison des deux agonistes, un seul 7TM est activé, révélant une fois de plus une asymétrie dans ce dimère de RCPGs (Kniazeff et al., 2004; Hlavackova et al., 2005). Similairement, chez le récepteur des leukotriènes B4 BLT1, une seule sous-unité du dimère est activée à la fois (Damian et al., 2006). Ces diverses études démontrent clairement que pour de nombreux oligomères de RCPGs, les deux sous-unités d'un dimère ne sont pas équivalentes. À la lumière de cette analyse, la présence d'un seul RAMP1 pour un homo-oligomère de CLR paraît moins surprenante. On pourrait envisager que de façon analogue aux exemples présentés ci-dessus, le complexe CLR/RAMP1 fonctionne de façon asymétrique, avec une seule molécule de CLR à la fois impliquée dans la liaison du CGRP, le changement conformationnel et l'activation de la protéine G. Par ailleurs, il a été suggéré que dans le cas du récepteur mGluR1 et du récepteur des leukotriènes B4 BLT1, l'interaction du dimère de RCPG avec une seule protéine G hétéro-trimérique provoque l'asymétrie observée dans l'activation de ces récepteurs (Hlavackova et al., 2005; Damian et al., 2006; Damian et al., 2008). Toutefois, nous pourrions également envisager que cette asymétrie de fonction démontrée pour plusieurs RCPGs repose sur l'interaction asymétrique de ces récepteurs avec diverses protéines accessoires transmembranaires qui reste encore à être identifiées.

Les résultats présentés dans cette thèse, nous amène également à nous questionner sur l'assemblage tridimensionnel du récepteur CGRP1 : comment le monomère de RAMP1 et l'homo-oligomère de CLR formant le complexe récepteuriel sont-ils organisés dans l'espace? La réponse à cette question devra attendre la cristallographie du complexe CLR/RAMP1. D'autre part, il serait également intéressant d'établir si les interactions CLR/CLR/RAMP1 sont propres à leur structure respective, ou dépendent de modifications post-traductionnelles, telles la formation de ponts disulfures au niveau de CLR et RAMP1

ou la glycosylation sur le domaine N-terminal du récepteur. Pour ce faire, une stratégie de co-immunoprécipitation des protéines recombinantes obtenues suite à l'expression et la purification de CLR et RAMP1 chez la bactérie *E. Coli* par exemple, permettrait d'établir le rôle des modifications post-traductionnelles dans la formation du complexe CLR/CLR/RAMP1, étant donné l'absence de ces modifications chez les bactéries.

Quoiqu'il en soit, le récepteur CGRP1 étant une cible de choix pour le développement d'agents thérapeutiques contre les migraines (Doods et al., 2007), nos travaux démontrant l'asymétrie du complexe CLR/RAMP1 pourraient s'avérer utile dans le traitement de cette pathologie. En effet, il a été démontré que l'utilisation d'un antagoniste contre le récepteur du CGRP permet de traiter les attaques aiguës de migraine (Olesen et al., 2004). Bien que le mécanisme par lequel l'utilisation d'un tel antagoniste permet le traitement des migraines soit encore mal défini, il a été suggéré que la relâche de CGRP au niveau du nerf trigéminal entraîne la vasodilatation des artères craniennes, suite à la liaison de ce peptide sur son complexe récepteuriel situé au niveau du muscle lisse. Ainsi, en bloquant l'activation du récepteur du CGRP, on empêcherait la vasodilatation des artères craniennes, procurant ainsi un traitement pour les migraines. Il existe donc un grand intérêt pour le développement de composés non-peptidiques antagonistes du récepteur CGRP1, ainsi plusieurs études se penchent sur le lien entre la structure et l'activité de différents antagonistes du CGRP. Nous avons d'ailleurs été impliqués dans une telle étude portant sur la relation entre la structure et l'activité de différents analogues d'antagonistes peptidiques du CGRP (*article 4* en annexe). Une connaissance plus approfondie de la composition moléculaire du récepteur CGRP1, qui serait appuyée par la cristallographie du complexe CLR/CLR/RAMP1, pourrait faciliter le design rationnel de composés antagonistes du récepteur CGRP1.

CONCLUSION

Les récepteurs couplés aux protéines G doivent interagir avec de nombreuses protéines afin de pouvoir transmettre un signal du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. En plus de s'associer avec d'autres RCPGs, ceux-ci forment des complexes avec des protéines accessoires à 1TM, tels les RAMPs. En utilisant le récepteur CGRP1 comme modèle d'étude, les travaux présentés dans cette thèse ont permis de démontrer que le récepteur CLR qui doit s'associer avec RAMP1 pour former un récepteur du CGRP fonctionnel, peut également former des homo-oligomères. Par ailleurs, RAMP1 peut lui-aussi s'associer en homo- et hétéro-oligomères avec d'autres membres de la famille des RAMPs. De façon intéressante, nos résultats ont révélé un assemblage oligomérique asymétrique pour le récepteur CGRP1, qui est constitué d'un homo-oligomère de récepteur CLR interagissant avec un monomère de la protéine accessoire RAMP1. Étant donné le rôle primordial joué par l'assemblage des récepteurs avec les protéines accessoires à 1TM, ainsi que les associations RCPG/RCPG, tant au niveau de la localisation sub-cellulaire, qu'au niveau des propriétés pharmacologiques et signalétiques des récepteurs, une connaissance plus approfondie de ces associations oligomériques telle qu'apportée par cette thèse pour le récepteur CGRP1, est essentielle à une meilleure compréhension de la transmission de la signalisation par les RCPGs.

Finalement, en plus d'approfondir nos connaissances sur l'assemblage oligomérique du CLR avec les RAMPs, nos travaux ont mené à l'élaboration et la validation d'une nouvelle technique permettant l'étude de l'interaction entre trois protéines dans un contexte de cellules vivantes, le BRET/BiFC. Au-delà de la signalisation et des récepteurs couplés aux protéines G, étant donné l'importance des complexes protéiques dans les différentes fonctions cellulaires, cette approche se révélera sans aucun doute très utile dans le futur.

RÉFÉRENCES

- AbdAlla S, Lother H and Quitterer U (2000) AT1-Receptor Heterodimers Show Enhanced G-Protein Activation and Altered Receptor Sequestration. *Nature* **407**:94-98.
- Aiyar N, Rand K, Elshourbagy N A, Zeng Z, Adamou J E, Bergsma D J and Li Y (1996) A CDNA Encoding the Calcitonin Gene-Related Peptide Type 1 Receptor. *J Biol Chem* **271**:11325-11329.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilaiet S, Chelsky D, Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of Beta 2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3684-3689.
- Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F and Hauri H P (1999) The Lectin ERGIC-53 Is a Cargo Transport Receptor for Glycoproteins. *Nat Cell Biol* **1**:330-334.
- Armbruster BN and Roth B L (2005) Mining the Receptorome. *J Biol Chem* **280**:5129-5132.
- Audet M and Bouvier M (2008) Insights into Signaling From the Beta2-Adrenergic Receptor Structure. *Nat Chem Biol* **4**:397-403.
- Bai M, Trivedi S and Brown E M (1998) Dimerization of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaR) on the Cell Surface of CaR-Transfected HEK293 Cells. *J Biol Chem* **273**:23605-23610.

- Baker EK, Colley N J and Zuker C S (1994) The Cyclophilin Homolog NinaA Functions As a Chaperone, Forming a Stable Complex in Vivo With Its Protein Target Rhodopsin. *EMBO J* **13**:4886-4895.
- Baneres JL and Parello J (2003) Structure-Based Analysis of GPCR Function: Evidence for a Novel Pentameric Assembly Between the Dimeric Leukotriene B4 Receptor BLT1 and the G-Protein. *J Mol Biol* **329**:815-829.
- Bayburt TH, Leitz A J, Xie G, Oprian D D and Sligar S G (2007) Transducin Activation by Nanoscale Lipid Bilayers Containing One and Two Rhodopsins. *J Biol Chem* **282**:14875-14881.
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz R M, Medvedev I O, Sotnikova T D, Ghisi V, Wetsel W C, Lefkowitz R J, Gainetdinov R R and Caron M G (2008) A Beta-Arrestin 2 Signaling Complex Mediates Lithium Action on Behavior. *Cell* **132**:125-136.
- Bell D and McDermott B J (2008) Intermedin (Adrenomedullin-2): a Novel Counter-Regulatory Peptide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S247-S262.
- Benkirane M, Jin D Y, Chun R F, Koup R A and Jeang K T (1997) Mechanism of Transdominant Inhibition of CCR5-Mediated HIV-1 Infection by Ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**:30603-30606.
- Bilic J, Huang Y L, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat C M, Bienz M and Niehrs C (2007) Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science* **316**:1619-1622.

- Blumer KJ and Thorner J (2007) An Adrenaline (and Gold?) Rush for the GPCR Community. *ACS Chem Biol* **2**:783-786.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR Interacting Proteins (GIP). *Pharmacol Ther* **103**:203-221.
- Bomberger JM, Parameswaran N, Hall C S, Aiyar N and Spielman W S (2005a) Novel Function for Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMPs) in Post-Endocytic Receptor Trafficking. *J Biol Chem* **280**:9297-9307.
- Bomberger JM, Spielman W S, Hall C S, Weinman E J and Parameswaran N (2005b) Receptor Activity-Modifying Protein (RAMP) Isoform-Specific Regulation of Adrenomedullin Receptor Trafficking by NHERF-1. *J Biol Chem* **280**:23926-23935.
- Boularan C, Scott M G, Bourougaa K, Bellal M, Esteve E, Thuret A, Benmerah A, Tramier M, Coppey-Moisan M, Labbe-Jullie C, Fahraeus R and Marullo S (2007) Beta-Arrestin 2 Oligomerization Controls the Mdm2-Dependent Inhibition of P53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18061-18066.
- Bouschet T, Martin S and Henley J M (2005) Receptor-Activity-Modifying Proteins Are Required for Forward Trafficking of the Calcium-Sensing Receptor to the Plasma Membrane. *J Cell Sci* **118**:4709-4720.
- Bouvier M, Heveker N, Jockers R, Marullo S and Milligan G (2007) BRET Analysis of GPCR Oligomerization: Newer Does Not Mean Better. *Nat Methods* **4**:3-4.
- Caron KM and Smithies O (2001) Extreme Hydrops Fetalis and Cardiovascular Abnormalities in Mice Lacking a Functional Adrenomedullin Gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:615-619.

- Caron MG, Srinivasan Y, Pitha J, Kociolek K and Lefkowitz R J (1979) Affinity Chromatography of the Beta-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **254**:2923-2927.
- Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, Cortes A, Mallol J, Fuxe K, Canela E I, Lluís C and Franco R (2008) Detection of Heteromerization of More Than Two Proteins by Sequential BRET-FRET. *Nat Methods* **5**:727-733.
- Carrillo JJ, Lopez-Gimenez J F and Milligan G (2004) Multiple Interactions Between Transmembrane Helices Generate the Oligomeric Alpha1b-Adrenoceptor. *Mol Pharmacol* **66**:1123-1137.
- Cerione RA, Strulovici B, Benovic J L, Strader C D, Caron M G and Lefkowitz R J (1983) Reconstitution of Beta-Adrenergic Receptors in Lipid Vesicles: Affinity Chromatography-Purified Receptors Confer Catecholamine Responsiveness on a Heterologous Adenylate Cyclase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:4899-4903.
- Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, Rasmussen S G, Thian F S, Kobilka T S, Choi H J, Kuhn P, Weis W I, Kobilka B K and Stevens R C (2007) High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human Beta2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science* **318**:1258-1265.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N and Sexton P M (2003) Novel Receptor Partners and Function of Receptor Activity-Modifying Proteins. *J Biol Chem* **278**:3293-3297.
- Christopoulos G, Perry K J, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser N J, Main M J, Foord S M and Sexton P M (1999) Multiple Amylin Receptors Arise From Receptor Activity-Modifying Protein Interaction With the Calcitonin Receptor Gene Product. *Mol Pharmacol* **56**:235-242.

- Conner AC, Simms J, Howitt S G, Wheatley M and Poyner D R (2006) The Second Intracellular Loop of the Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Provides Molecular Determinants for Signal Transduction and Cell Surface Expression. *J Biol Chem* **281**:1644-1651.
- Cottrell GS, Padilla B, Pikios S, Roosterman D, Steinhoff M, Grady E F and Bunnett N W (2007) Post-Endocytic Sorting of Calcitonin Receptor-Like Receptor and Receptor Activity-Modifying Protein 1. *J Biol Chem* **282**:12260-12271.
- Cvejic S and Devi L A (1997) Dimerization of the Delta Opioid Receptor: Implication for a Role in Receptor Internalization. *J Biol Chem* **272**:26959-26964.
- Dackor R, Fritz-Six K, Smithies O and Caron K (2007) Receptor Activity-Modifying Proteins 2 and 3 Have Distinct Physiological Functions From Embryogenesis to Old Age. *J Biol Chem* **282**:18094-18099.
- Dackor RT, Fritz-Six K, Dunworth W P, Gibbons C L, Smithies O and Caron K M (2006) Hydrops Fetalis, Cardiovascular Defects, and Embryonic Lethality in Mice Lacking the Calcitonin Receptor-Like Receptor Gene. *Mol Cell Biol* **26**:2511-2518.
- Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin J P and Baneres J L (2006) Asymmetric Conformational Changes in a GPCR Dimer Controlled by G-Proteins. *EMBO J* **25**:5693-5702.
- Damian M, Mary S, Martin A, Pin J P and Baneres J L (2008) G Protein Activation by the Leukotriene B4 Receptor Dimer. Evidence for an Absence of Trans-Activation. *J Biol Chem* **283**:21084-21092.

- Dennis T, Fournier A, Cadieux A, Pomerleau F, Jolicoeur F B, St P S and Quirion R (1990) HCGRP8-37, a Calcitonin Gene-Related Peptide Antagonist Revealing Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Heterogeneity in Brain and Periphery. *J Pharmacol Exp Ther* **254**:123-128.
- Dennis T, Fournier A, St P S and Quirion R (1989) Structure-Activity Profile of Calcitonin Gene-Related Peptide in Peripheral and Brain Tissues. Evidence for Receptor Multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther* **251**:718-725.
- Dixon RA, Kobilka B K, Strader D J, Benovic J L, Dohlman H G, Frielle T, Bolanowski M A, Bennett C D, Rands E, Diehl R E, Mumford R A, Slater E E, Sigal I S, Caron M G, Lefkowitz R J and Strader C D (1986) Cloning of the Gene and cDNA for Mammalian Beta-Adrenergic Receptor and Homology With Rhodopsin. *Nature* **321**:75-79.
- Doods H, Arndt K, Rudolf K and Just S (2007) CGRP Antagonists: Unravelling the Role of CGRP in Migraine. *Trends Pharmacol Sci* **28**:580-587.
- Dulac C and Torello A T (2003) Molecular Detection of Pheromone Signals in Mammals: From Genes to Behaviour. *Nat Rev Neurosci* **4**:551-562.
- Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve L R, Mamarbachi A M and Hebert T E (2006) Seven Transmembrane Receptor Core Signaling Complexes Are Assembled Prior to Plasma Membrane Trafficking. *J Biol Chem* **281**:34561-34573.
- Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin J P and Prezeau L (2002) A Single Subunit (GB2) Is Required for G-Protein Activation by the Heterodimeric GABA(B) Receptor. *J Biol Chem* **277**:3236-3241.

- Dwyer ND, Troemel E R, Sengupta P and Bargmann C I (1998) Odorant Receptor Localization to Olfactory Cilia Is Mediated by ODR-4, a Novel Membrane-Associated Protein. *Cell* **93**:455-466.
- El-Asmar L, Springael J Y, Ballet S, Andrieu E U, Vassart G and Parmentier M (2005) Evidence for Negative Binding Cooperativity Within CCR5-CCR2b Heterodimers. *Mol Pharmacol* **67**:460-469.
- Emery G, Rojo M and Gruenberg J (2000) Coupled Transport of P24 Family Members. *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**:2507-2516.
- Ernst OP, Gramse V, Kolbe M, Hofmann K P and Heck M (2007) Monomeric G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin in Solution Activates Its G Protein Transducin at the Diffusion Limit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10859-10864.
- Evans BN, Rosenblatt M I, Mnayer L O, Oliver K R and Dickerson I M (2000) CGRP-RCP, a Novel Protein Required for Signal Transduction at Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Receptors. *J Biol Chem* **275**:31438-31443.
- Ferguson SS, Downey W E, III, Colapietro A M, Barak L S, Menard L and Caron M G (1996) Role of Beta-Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization. *Science* **271**:363-366.
- Ferreira PA, Nakayama T A, Pak W L and Travis G H (1996) Cyclophilin-Related Protein RanBP2 Acts As Chaperone for Red/Green Opsin. *Nature* **383**:637-640.
- Filipek S, Krzysko K A, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein D A, Engel A and Palczewski K (2004) A Concept for G Protein Activation by G Protein-Coupled Receptor Dimers: the Transducin/Rhodopsin Interface. *Photochem Photobiol Sci* **3**:628-638.

- Filipek S, Teller D C, Palczewski K and Stenkamp R (2003) The Crystallographic Model of Rhodopsin and Its Use in Studies of Other G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**:375-397.
- Fitzsimmons TJ, Zhao X and Wank S A (2003) The Extracellular Domain of Receptor Activity-Modifying Protein 1 Is Sufficient for Calcitonin Receptor-Like Receptor Function. *J Biol Chem* **278**:14313-14320.
- Flahaut M, Pfister C, Rossier B C and Firsov D (2003) N-Glycosylation and Conserved Cysteine Residues in RAMP3 Play a Critical Role for the Functional Expression of CRLR/RAMP3 Adrenomedullin Receptor. *Biochemistry* **42**:10333-10341.
- Flahaut M, Rossier B C and Firsov D (2002) Respective Roles of Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) and Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMP) in Cell Surface Expression of CRLR/RAMP Heterodimeric Receptors. *J Biol Chem* **277**:14731-14737.
- Fluhmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer J A and Born W (1995) A Human Orphan Calcitonin Receptor-Like Structure. *Biochem Biophys Res Commun* **206**:341-347.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein D A, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-Force Microscopy: Rhodopsin Dimers in Native Disc Membranes. *Nature* **421**:127-128.
- Fraser NJ, Wise A, Brown J, McLatchie L M, Main M J and Foord S M (1999) The Amino Terminus of Receptor Activity Modifying Proteins Is a Critical Determinant of Glycosylation State and Ligand Binding of Calcitonin Receptor-Like Receptor. *Mol Pharmacol* **55**:1054-1059.

- Fredriksson R, Lagerstrom M C, Lundin L G and Schioth H B (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256-1272.
- Gales C, Rebois R V, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert T E and Bouvier M (2005) Real-Time Monitoring of Receptor and G-Protein Interactions in Living Cells. *Nat Methods* **2**:177-184.
- Gales C, Van Durm J J, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the Activation-Promoted Structural Rearrangements in Preassembled Receptor-G Protein Complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**:778-786.
- Gandia J, Galino J, Amaral O B, Soriano A, Lluís C, Franco R and Ciruela F (2008) Detection of Higher-Order G Protein-Coupled Receptor Oligomers by a Combined BRET-BiFC Technique. *FEBS Lett* **582**:2979-2984.
- Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B and Pei G (2004) Identification of Beta-Arrestin2 As a G Protein-Coupled Receptor-Stimulated Regulator of NF-KappaB Pathways. *Mol Cell* **14**:303-317.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G and O'Dowd B F (2000) Oligomerization of Mu- and Delta-Opioid Receptors. Generation of Novel Functional Properties. *J Biol Chem* **275**:26128-26135.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le C S, Casado V, Canela E I, Rondin S, Lew J Y, Watson S, Zoli M, Agnati L F, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K and Franco R (2000) Dopamine D1 and Adenosine A1 Receptors Form Functionally Interacting Heteromeric Complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8606-8611.

- Gujer R, Aldecoa A, Buhlmann N, Leuthauser K, Muff R, Fischer J A and Born W (2001) Mutations of the Asparagine117 Residue of a Receptor Activity-Modifying Protein 1-Dependent Human Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Result in Selective Loss of Function. *Biochemistry* **40**:5392-5398.
- Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H and Javitch J A (2005) Crosstalk in G Protein-Coupled Receptors: Changes at the Transmembrane Homodimer Interface Determine Activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17495-17500.
- Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec J C, Shi L, Filizola M and Javitch J A (2008) Dopamine D2 Receptors Form Higher Order Oligomers at Physiological Expression Levels. *EMBO J* **27**:2293-2304.
- Hague C, Uberti M A, Chen Z, Hall R A and Minneman K P (2004) Cell Surface Expression of Alpha1D-Adrenergic Receptors Is Controlled by Heterodimerization With Alpha1B-Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* **279**:15541-15549.
- Hall RA, Premont R T, Chow C W, Blitzler J T, Pitcher J A, Claing A, Stoffel R H, Barak L S, Shenolikar S, Weinman E J, Grinstein S and Lefkowitz R J (1998) The Beta2-Adrenergic Receptor Interacts With the Na⁺/H⁺-Exchanger Regulatory Factor to Control Na⁺/H⁺ Exchange. *Nature* **392**:626-630.
- Hamdan FF, Rochdi M D, Breton B, Fessart D, Michaud D E, Charest P G, Laporte S A and Bouvier M (2007) Unraveling G Protein-Coupled Receptor Endocytosis Pathways Using Real-Time Monitoring of Agonist-Promoted Interaction Between Beta-Arrestins and AP-2. *J Biol Chem* **282**:29089-29100.

- Han ZQ, Coppock H A, Smith D M, Van N S, Makgoba M W, Nicholl C G and Legon S (1997) The Interaction of CGRP and Adrenomedullin With a Receptor Expressed in the Rat Pulmonary Vascular Endothelium. *J Mol Endocrinol* **18**:267-272.
- Hanson SM, Gurevich E V, Vishnivetskiy S A, Ahmed M R, Song X and Gurevich V V (2007) Each Rhodopsin Molecule Binds Its Own Arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:3125-3128.
- Harikumar KG, Morfis M M, Lisenbee C S, Sexton P M and Miller L J (2006) Constitutive Formation of Oligomeric Complexes Between Family B G Protein-Coupled Vasoactive Intestinal Polypeptide and Secretin Receptors. *Mol Pharmacol* **69**:363-373.
- Hay DL (2007) What Makes a CGRP2 Receptor? *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**:963-971.
- Hay DL, Poyner D R and Sexton P M (2006) GPCR Modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* **109**:173-197.
- Hebert TE, Moffett S, Morello J P, Loisel T P, Bichet D G, Barret C and Bouvier M (1996) A Peptide Derived From a Beta2-Adrenergic Receptor Transmembrane Domain Inhibits Both Receptor Dimerization and Activation. *J Biol Chem* **271**:16384-16392.
- Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse M J and Bunemann M (2005) Dynamics of Receptor/G Protein Coupling in Living Cells. *EMBO J* **24**:4106-4114.
- Hilairret S, Belanger C, Bertrand J, Laperriere A, Foord S M and Bouvier M (2001a) Agonist-Promoted Internalization of a Ternary Complex Between Calcitonin Receptor-Like Receptor, Receptor Activity-Modifying Protein 1 (RAMP1), and Beta-Arrestin. *J Biol Chem* **276**:42182-42190.

- Hilairt S, Foord S M, Marshall F H and Bouvier M (2001b) Protein-Protein Interaction and Not Glycosylation Determines the Binding Selectivity of Heterodimers Between the Calcitonin Receptor-Like Receptor and the Receptor Activity-Modifying Proteins. *J Biol Chem* **276**:29575-29581.
- Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, Trojanova J, Prezeau L, Pin J P and Blahos J (2005) Evidence for a Single Heptahelical Domain Being Turned on Upon Activation of a Dimeric GPCR. *EMBO J* **24**:499-509.
- Holinstat M, Oldham W M and Hamm H E (2006) G-Protein-Coupled Receptors: Evolving Views on Physiological Signalling: Symposium on G-Protein-Coupled Receptors: Evolving Concepts and New Techniques. *EMBO Rep* **7**:866-869.
- Horn F, Weare J, Beukers M W, Horsch S, Bairoch A, Chen W, Edvardsen O, Campagne F and Vriend G (1998) GPCRDB: an Information System for G Protein-Coupled Receptors. *Nucleic Acids Res* **26**:275-279.
- Hu CD, Chinenov Y and Kerppola T K (2002) Visualization of Interactions Among BZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol Cell* **9**:789-798.
- Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M and Marullo S (2002) Constitutive Agonist-Independent CCR5 Oligomerization and Antibody-Mediated Clustering Occurring at Physiological Levels of Receptors. *J Biol Chem* **277**:34666-34673.
- Ittner LM, Koller D, Muff R, Fischer J A and Born W (2005) The N-Terminal Extracellular Domain 23-60 of the Calcitonin Receptor-Like Receptor in Chimeras With the

Parathyroid Hormone Receptor Mediates Association With Receptor Activity-Modifying Protein 1. *Biochemistry* **44**:5749-5754.

Ittner LM, Luessi F, Koller D, Born W, Fischer J A and Muff R (2004) Aspartate(69) of the Calcitonin-Like Receptor Is Required for Its Functional Expression Together With Receptor-Activity-Modifying Proteins 1 and -2. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1203-1209.

Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M and Seuwen K (2006) The 7 TM G-Protein-Coupled Receptor Target Family. *ChemMedChem* **1**:761-782.

James JR, Oliveira M I, Carmo A M, Iaboni A and Davis S J (2006) A Rigorous Experimental Framework for Detecting Protein Oligomerization Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Nat Methods* **3**:1001-1006.

Johnson EC, Shafer O T, Trigg J S, Park J, Schooley D A, Dow J A and Taghert P H (2005) A Novel Diuretic Hormone Receptor in Drosophila: Evidence for Conservation of CGRP Signaling. *J Exp Biol* **208**:1239-1246.

Jones KA, Borowsky B, Tamm J A, Craig D A, Durkin M M, Dai M, Yao W J, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang L Y, Tang C, Shen Q, Salon J A, Morse K, Laz T, Smith K E, Nagarathnam D, Noble S A, Branchek T A and Gerald C (1998) GABA(B) Receptors Function As a Heteromeric Assembly of the Subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**:674-679.

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

- Jorgensen R, Holliday N D, Hansen J L, Vrecl M, Heding A, Schwartz T W and Elling C E (2008) Characterization of G-Protein Coupled Receptor Kinase Interaction With the Neurokinin-1 Receptor Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Mol Pharmacol* **73**:349-358.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A and Bettler B (1998) GABA(B)-Receptor Subtypes Assemble into Functional Heteromeric Complexes. *Nature* **396**:683-687.
- Kaykas A, Yang-Snyder J, Heroux M, Shah K V, Bouvier M and Moon R T (2004) Mutant Frizzled 4 Associated With Vitreoretinopathy Traps Wild-Type Frizzled in the Endoplasmic Reticulum by Oligomerization. *Nat Cell Biol* **6**:52-58.
- Kerppola TK (2006) Visualization of Molecular Interactions by Fluorescence Complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:449-456.
- Kniazeff J, Bessis A S, Maurel D, Ansanay H, Prezeau L and Pin J P (2004) Closed State of Both Binding Domains of Homodimeric MGlu Receptors Is Required for Full Activity. *Nat Struct Mol Biol* **11**:706-713.
- Koller D, Born W, Leuthauser K, Fluhmann B, McKinney R A, Fischer J A and Muff R (2002) The Extreme N-Terminus of the Calcitonin-Like Receptor Contributes to the Selective Interaction With Adrenomedullin or Calcitonin Gene-Related Peptide. *FEBS Lett* **531**:464-468.
- Koller D, Ittner L M, Muff R, Husmann K, Fischer J A and Born W (2004) Selective Inactivation of Adrenomedullin Over Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Function by the Deletion of Amino Acids 14-20 of the Mouse Calcitonin-Like Receptor. *J Biol Chem* **279**:20387-20391.

- Kroeger KM, Hanyaloglu A C, Seeber R M, Miles L E and Eidne K A (2001) Constitutive and Agonist-Dependent Homo-Oligomerization of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor. Detection in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **276**:12736-12743.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H and Morikawa K (2000) Structural Basis of Glutamate Recognition by a Dimeric Metabotropic Glutamate Receptor. *Nature* **407**:971-977.
- Kunz TH, Mueller-Steiner S, Schwerdtfeger K, Kleinert P, Troxler H, Kelm J M, Ittner L M, Fischer J A and Born W (2007) Interaction of Receptor-Activity-Modifying Protein1 With Tubulin. *Biochim Biophys Acta* **1770**:1145-1150.
- Kusano S, Kukimoto-Niino M, Akasaka R, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Shindo T and Yokoyama S (2008) Crystal Structure of the Human Receptor Activity-Modifying Protein 1 Extracellular Domain. *Protein Sci* **17**:1907-1914.
- Kuwasako K, Cao Y N, Chu C P, Iwatsubo S, Eto T and Kitamura K (2006) Functions of the Cytoplasmic Tails of the Human Receptor Activity-Modifying Protein Components of Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Receptors. *J Biol Chem* **281**:7205-7213.
- Kuwasako K, Kitamura K, Ito K, Uemura T, Yanagita Y, Kato J, Sakata T and Eto T (2001) The Seven Amino Acids of Human RAMP2 (86) and RAMP3 (59) Are Critical for Agonist Binding to Human Adrenomedullin Receptors. *J Biol Chem* **276**:49459-49465.

- Kuwasako K, Kitamura K, Nagoshi Y, Cao Y N and Eto T (2003a) Identification of the Human Receptor Activity-Modifying Protein 1 Domains Responsible for Agonist Binding Specificity. *J Biol Chem* **278**:22623-22630.
- Kuwasako K, Kitamura K, Uemura T, Nagoshi Y, Kato J and Eto T (2003b) The Function of Extracellular Cysteines in the Human Adrenomedullin Receptor. *Hypertens Res* **26 Suppl**:S25-S31.
- Kuwasako K, Shimekake Y, Masuda M, Nakahara K, Yoshida T, Kitaura M, Kitamura K, Eto T and Sakata T (2000) Visualization of the Calcitonin Receptor-Like Receptor and Its Receptor Activity-Modifying Proteins During Internalization and Recycling. *J Biol Chem* **275**:29602-29609.
- Lavoie C, Mercier J F, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve L R, Zhu W Z, Xiao R P, Lakatta E G, Bouvier M and Hebert T E (2002) Beta 1/Beta 2-Adrenergic Receptor Heterodimerization Regulates Beta 2-Adrenergic Receptor Internalization and ERK Signaling Efficacy. *J Biol Chem* **277**:35402-35410.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang Y T, Niznik H B, Yu X M and Liu F (2002) Dual Regulation of NMDA Receptor Functions by Direct Protein-Protein Interactions With the Dopamine D1 Receptor. *Cell* **111**:219-230.
- Lefkowitz RJ (2007) Seven Transmembrane Receptors: Something Old, Something New. *Acta Physiol (Oxf)* **190**:9-19.
- Leuthauser K, Gujer R, Aldecoa A, McKinney R A, Muff R, Fischer J A and Born W (2000) Receptor-Activity-Modifying Protein 1 Forms Heterodimers With Two G-Protein-Coupled Receptors to Define Ligand Recognition. *Biochem J* **351 Pt 2**:347-351.

- Levoye A, Dam J, Ayoub M A, Guillaume J L, Couturier C, Delagrangé P and Jockers R (2006a) The Orphan GPR50 Receptor Specifically Inhibits MT1 Melatonin Receptor Function Through Heterodimerization. *EMBO J* **25**:3012-3023.
- Levoye A, Dam J, Ayoub M A, Guillaume J L and Jockers R (2006b) Do Orphan G-Protein-Coupled Receptors Have Ligand-Independent Functions? New Insights From Receptor Heterodimers. *EMBO Rep* **7**:1094-1098.
- Liu F, Wan Q, Pristupa Z B, Yu X M, Wang Y T and Niznik H B (2000) Direct Protein-Protein Coupling Enables Cross-Talk Between Dopamine D5 and Gamma-Aminobutyric Acid A Receptors. *Nature* **403**:274-280.
- Loconto J, Papes F, Chang E, Stowers L, Jones E P, Takada T, Kumanovics A, Fischer L K and Dulac C (2003) Functional Expression of Murine V2R Pheromone Receptors Involves Selective Association With the M10 and M1 Families of MHC Class Ib Molecules. *Cell* **112**:607-618.
- Lopez-Gimenez JF, Canals M, Pediani J D and Milligan G (2007) The Alpha1b-Adrenoceptor Exists As a Higher-Order Oligomer: Effective Oligomerization Is Required for Receptor Maturation, Surface Delivery, and Function. *Mol Pharmacol* **71**:1015-1029.
- Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato J J, Caron M G and Lefkowitz R J (1991) The Receptor Kinase Family: Primary Structure of Rhodopsin Kinase Reveals Similarities to the Beta-Adrenergic Receptor Kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8715-8719.
- Luebke AE, Dahl G P, Roos B A and Dickerson I M (1996) Identification of a Protein That Confers Calcitonin Gene-Related Peptide Responsiveness to Oocytes by Using a

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3455-3460.

Luttrell LM, Ferguson S S, Daaka Y, Miller W E, Maudsley S, la Rocca G J, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell D K, Caron M G and Lefkowitz R J (1999) Beta-Arrestin-Dependent Formation of Beta2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* **283**:655-661.

Ma P and Zimmel R (2002) Value of Novelty? *Nat Rev Drug Discov* **1**:571-572.

Ma W, Chabot J G and Quirion R (2006) A Role for Adrenomedullin As a Pain-Related Peptide in the Rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16027-16032.

Main MJ, Brown J, Brown S, Fraser N J and Foord S M (1998) The CGRP Receptor Can Couple Via Pertussis Toxin Sensitive and Insensitive G Proteins. *FEBS Lett* **441**:6-10.

Mallee JJ, Salvatore C A, LeBourdelle B, Oliver K R, Longmore J, Koblan K S and Kane S A (2002) Receptor Activity-Modifying Protein 1 Determines the Species Selectivity of Non-Peptide CGRP Receptor Antagonists. *J Biol Chem* **277**:14294-14298.

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

Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives M L, Bourrier E, Ayoub M A, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prezeau L, Trinquet E and Pin J P (2008) Cell-Surface Protein-Protein Interaction Analysis With Time-Resolved FRET and Snap-Tag Technologies: Application to GPCR Oligomerization. *Nat Methods* **5**:561-567.

- Maurel D, Kniazeff J, Mathis G, Trinquet E, Pin J P and Ansanay H (2004) Cell Surface Detection of Membrane Protein Interaction With Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology. *Anal Biochem* **329**:253-262.
- McLatchie LM, Fraser N J, Main M J, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee M G and Foord S M (1998) RAMPs Regulate the Transport and Ligand Specificity of the Calcitonin-Receptor-Like Receptor. *Nature* **393**:333-339.
- McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope A J and Milligan G (2001) Monitoring Receptor Oligomerization Using Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer and Bioluminescence Resonance Energy Transfer. The Human Delta -Opioid Receptor Displays Constitutive Oligomerization at the Cell Surface, Which Is Not Regulated by Receptor Occupancy. *J Biol Chem* **276**:14092-14099.
- Mellado M, Rodriguez-Frade J M, Vila-Coro A J, Fernandez S, Martin de A A, Jones D R, Toran J L and Martinez A (2001) Chemokine Receptor Homo- or Heterodimerization Activates Distinct Signaling Pathways. *EMBO J* **20**:2497-2507.
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A and Bouvier M (2002) Quantitative Assessment of Beta 1- and Beta 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **277**:44925-44931.
- Mervine SM, Yost E A, Sabo J L, Hynes T R and Berlot C H (2006) Analysis of G Protein Betagamma Dimer Formation in Live Cells Using Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation Demonstrates Preferences of Beta1 for Particular Gamma Subunits. *Mol Pharmacol* **70**:194-205.

- Metherell LA, Chapple J P, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham M E and Clark A J (2005) Mutations in MRAP, Encoding a New Interacting Partner of the ACTH Receptor, Cause Familial Glucocorticoid Deficiency Type 2. *Nat Genet* **37**:166-170.
- Milano SK, Kim Y M, Stefano F P, Benovic J L and Brenner C (2006) Nonvisual Arrestin Oligomerization and Cellular Localization Are Regulated by Inositol Hexakisphosphate Binding. *J Biol Chem* **281**:9812-9823.
- Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-Proteins: a Short History. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S46-S55.
- Nag K, Kato A, Nakada T, Hoshijima K, Mistry A C, Takei Y and Hirose S (2006) Molecular and Functional Characterization of Adrenomedullin Receptors in Pufferfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**:R467-R478.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon M A, Feng L, Zhao G, Ryba N J and Zuker C S (2002) An Amino-Acid Taste Receptor. *Nature* **416**:199-202.
- Nelson G, Hoon M A, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba N J and Zuker C S (2001) Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* **106**:381-390.
- Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini G U, Cotecchia S and Maggio R (2005) Paired Activation of Two Components Within Muscarinic M3 Receptor Dimers Is Required for Recruitment of Beta-Arrestin-1 to the Plasma Membrane. *J Biol Chem* **280**:19768-19776.
- Oakley RH, Laporte S A, Holt J A, Caron M G and Barak L S (2000) Differential Affinities of Visual Arrestin, Beta Arrestin1, and Beta Arrestin2 for G Protein-Coupled

Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors. *J Biol Chem* **275**:17201-17210.

Oldham WM and Hamm H E (2008) Heterotrimeric G Protein Activation by G-Protein-Coupled Receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:60-71.

Olesen J, Diener H C, Husstedt I W, Goadsby P J, Hall D, Meier U, Pollentier S and Lesko L M (2004) Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine. *N Engl J Med* **350**:1104-1110.

Olson R, Dulac C and Bjorkman P J (2006) MHC Homologs in the Nervous System--They Haven't Lost Their Groove. *Curr Opin Neurobiol* **16**:351-357.

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

Overton MC, Chinault S L and Blumer K J (2003) Oligomerization, Biogenesis, and Signaling Is Promoted by a Glycophorin A-Like Dimerization Motif in Transmembrane Domain 1 of a Yeast G Protein-Coupled Receptor. *J Biol Chem* **278**:49369-49377.

Padilla BE, Cottrell G S, Roosterman D, Pikios S, Muller L, Steinhoff M and Bunnett N W (2007) Endothelin-Converting Enzyme-1 Regulates Endosomal Sorting of Calcitonin Receptor-Like Receptor and Beta-Arrestins. *J Cell Biol* **179**:981-997.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C A, Motoshima H, Fox B A, Le T, I, Teller D C, Okada T, Stenkamp R E, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**:739-745.

- Park PS and Palczewski K (2005) Diversifying the Repertoire of G Protein-Coupled Receptors Through Oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8793-8794.
- Park PS and Wells J W (2004) Oligomeric Potential of the M2 Muscarinic Cholinergic Receptor. *J Neurochem* **90**:537-548.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp H J, Holtt V and Schulz S (2001) Homo- and Heterodimerization of Somatostatin Receptor Subtypes. Inactivation of Sst(3) Receptor Function by Heterodimerization With Sst(2A). *J Biol Chem* **276**:14027-14036.
- Pfleger KD and Eidne K A (2005) Monitoring the Formation of Dynamic G-Protein-Coupled Receptor-Protein Complexes in Living Cells. *Biochem J* **385**:625-637.
- Pierce KL, Premont R T and Lefkowitz R J (2002) Seven-Transmembrane Receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:639-650.
- Prinster SC, Hague C and Hall R A (2005) Heterodimerization of g Protein-Coupled Receptors: Specificity and Functional Significance. *Pharmacol Rev* **57**:289-298.
- Rashid AJ, So C H, Kong M M, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd B F and George S R (2007) D1-D2 Dopamine Receptor Heterooligomers With Unique Pharmacology Are Coupled to Rapid Activation of Gq/11 in the Striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:654-659.
- Rasmussen SG, Choi H J, Rosenbaum D M, Kobilka T S, Thian F S, Edwards P C, Burghammer M, Ratnala V R, Sanishvili R, Fischetti R F, Schertler G F, Weis W I and Kobilka B K (2007) Crystal Structure of the Human Beta2 Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **450**:383-387.

- Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre D J, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M and Hebert T E (2006) Heterotrimeric G Proteins Form Stable Complexes With Adenylyl Cyclase and Kir3.1 Channels in Living Cells. *J Cell Sci* **119**:2807-2818.
- Robas N, O'Reilly M, Katugampola S and Fidock M (2003) Maximizing Serendipity: Strategies for Identifying Ligands for Orphan G-Protein-Coupled Receptors. *Curr Opin Pharmacol* **3**:121-126.
- Rocheville M, Lange D C, Kumar U, Patel S C, Patel R C and Patel Y C (2000a) Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers With Enhanced Functional Activity. *Science* **288**:154-157.
- Rocheville M, Lange D C, Kumar U, Sasi R, Patel R C and Patel Y C (2000b) Subtypes of the Somatostatin Receptor Assemble As Functional Homo- and Heterodimers. *J Biol Chem* **275**:7862-7869.
- Roh J, Chang C L, Bhalla A, Klein C and Hsu S Y (2004) Intermedin Is a Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Family Peptide Acting Through the Calcitonin Receptor-Like Receptor/Receptor Activity-Modifying Protein Receptor Complexes. *J Biol Chem* **279**:7264-7274.
- Romano C, Miller J K, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg M P and O'Malley K L (2001) Covalent and Noncovalent Interactions Mediate Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 Dimerization. *Mol Pharmacol* **59**:46-53.
- Romano C, Yang W L and O'Malley K L (1996) Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-Linked Dimer. *J Biol Chem* **271**:28612-28616.

- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson M A, Rasmussen S G, Thian F S, Kobilka T S, Choi H J, Yao X J, Weis W I, Stevens R C and Kobilka B K (2007) GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into Beta2-Adrenergic Receptor Function. *Science* **318**:1266-1273.
- Saito H, Kubota M, Roberts R W, Chi Q and Matsunami H (2004) RTP Family Members Induce Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors. *Cell* **119**:679-691.
- Salahpour A, Angers S and Bouvier M (2000) Functional Significance of Oligomerization of G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab* **11**:163-168.
- Salahpour A, Angers S, Mercier J F, Lagace M, Marullo S and Bouvier M (2004) Homodimerization of the Beta2-Adrenergic Receptor As a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J Biol Chem* **279**:33390-33397.
- Salahpour A and Masri B (2007) Experimental Challenge to a 'Rigorous' BRET Analysis of GPCR Oligomerization. *Nat Methods* **4**:599-600.
- Salom D, Lodowski D T, Stenkamp R E, Le T, I, Golczak M, Jastrzebska B, Harris T, Ballesteros J A and Palczewski K (2006) Crystal Structure of a Photoactivated Deprotonated Intermediate of Rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16123-16128.
- Schioth HB and Fredriksson R (2005) The GRAFS Classification System of G-Protein Coupled Receptors in Comparative Perspective. *Gen Comp Endocrinol* **142**:94-101.
- Sebag JA and Hinkle P M (2007) Melanocortin-2 Receptor Accessory Protein MRAP Forms Antiparallel Homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:20244-20249.

- Seck T, Baron R and Horne W C (2003) The Alternatively Spliced Deltae13 Transcript of the Rabbit Calcitonin Receptor Dimerizes With the C1a Isoform and Inhibits Its Surface Expression. *J Biol Chem* **278**:23085-23093.
- Semenov MV, Tamai K, Brott B K, Kuhl M, Sokol S and He X (2001) Head Inducer Dickkopf-1 Is a Ligand for Wnt Coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**:951-961.
- Sexton PM, Albiston A, Morfis M and Tilakaratne N (2001) Receptor Activity Modifying Proteins. *Cell Signal* **13**:73-83.
- Shaner NC, Steinbach P A and Tsien R Y (2005) A Guide to Choosing Fluorescent Proteins. *Nat Methods* **2**:905-909.
- Shioda T, Nakayama E E, Tanaka Y, Xin X, Liu H, Kawana-Tachikawa A, Kato A, Sakai Y, Nagai Y and Iwamoto A (2001) Naturally Occurring Deletional Mutation in the C-Terminal Cytoplasmic Tail of CCR5 Affects Surface Trafficking of CCR5. *J Virol* **75**:3462-3468.
- Shyu YJ, Suarez C D and Hu C D (2008) Visualization of AP-1 NF-KappaB Ternary Complexes in Living Cells by Using a BiFC-Based FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:151-156.
- Siaut M, Zaros C, Levivier E, Ferri M L, Court M, Werner M, Callebaut I, Thuriaux P, Sentenac A and Conesa C (2003) An Rpb4/Rpb7-Like Complex in Yeast RNA Polymerase III Contains the Orthologue of Mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol* **23**:195-205.
- Simms J, Hay D L, Wheatley M and Poyner D R (2006) Characterization of the Structure of RAMP1 by Mutagenesis and Molecular Modeling. *Biophys J* **91**:662-669.

- Stamnes MA, Shieh B H, Chuman L, Harris G L and Zuker C S (1991) The Cyclophilin Homolog NinaA Is a Tissue-Specific Integral Membrane Protein Required for the Proper Synthesis of a Subset of *Drosophila* Rhodopsins. *Cell* **65**:219-227.
- Stanasila L, Perez J B, Vogel H and Cotecchia S (2003) Oligomerization of the Alpha 1a- and Alpha 1b-Adrenergic Receptor Subtypes. Potential Implications in Receptor Internalization. *J Biol Chem* **278**:40239-40251.
- Stefan E, Aquin S, Berger N, Landry C R, Nyfeler B, Bouvier M and Michnick S W (2007) Quantification of Dynamic Protein Complexes Using Renilla Luciferase Fragment Complementation Applied to Protein Kinase A Activities in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16916-16921.
- Steiner S, Born W, Fischer J A and Muff R (2003) The Function of Conserved Cysteine Residues in the Extracellular Domain of Human Receptor-Activity-Modifying Protein. *FEBS Lett* **555**:285-290.
- Steiner S, Muff R, Gujer R, Fischer J A and Born W (2002) The Transmembrane Domain of Receptor-Activity-Modifying Protein 1 Is Essential for the Functional Expression of a Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor. *Biochemistry* **41**:11398-11404.
- Storez H, Scott M G, Issafras H, Burtey A, Benmerah A, Muntaner O, Piolot T, Tramier M, Coppey-Moisan M, Bouvier M, Labbe-Jullie C and Marullo S (2005) Homo- and Hetero-Oligomerization of Beta-Arrestins in Living Cells. *J Biol Chem* **280**:40210-40215.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet J P and He X (2000) LDL-Receptor-Related Proteins in Wnt Signal Transduction. *Nature* **407**:530-535.

- Terrillon S, Barberis C and Bouvier M (2004) Heterodimerization of V1a and V2 Vasopressin Receptors Determines the Interaction With Beta-Arrestin and Their Trafficking Patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1548-1553.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Receptor Activity-Independent Recruitment of Betaarrestin2 Reveals Specific Signalling Modes. *EMBO J* **23**:3950-3961.
- Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub M A, Taulan M, Jockers R, Barberis C and Bouvier M (2003) Oxytocin and Vasopressin V1a and V2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers During Biosynthesis. *Mol Endocrinol* **17**:677-691.
- Tilakaratne N, Christopoulos G, Zumpe E T, Foord S M and Sexton P M (2000) Amylin Receptor Phenotypes Derived From Human Calcitonin Receptor/RAMP Coexpression Exhibit Pharmacological Differences Dependent on Receptor Isoform and Host Cell Environment. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:61-72.
- Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, Matsushita H, Yamaguchi T, Shigeno T, Ogitani Y, Hirayama M, Kato T, Fukada S, Takatori S, Kawasaki H, Okamoto H, Ikawa M, Okabe M and Yamamoto H (2007) Hypertension and Dysregulated Proinflammatory Cytokine Production in Receptor Activity-Modifying Protein 1-Deficient Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16702-16707.
- Tu JC, Xiao B, Yuan J P, Lanahan A A, Leoffert K, Li M, Linden D J and Worley P F (1998) Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors With IP3 Receptors. *Neuron* **21**:717-726.

- Udawela M, Christopoulos G, Morfis M, Christopoulos A, Ye S, Tilakaratne N and Sexton P M (2006a) A Critical Role for the Short Intracellular C Terminus in Receptor Activity-Modifying Protein Function. *Mol Pharmacol* **70**:1750-1760.
- Udawela M, Christopoulos G, Tilakaratne N, Christopoulos A, Albiston A and Sexton P M (2006b) Distinct Receptor Activity-Modifying Protein Domains Differentially Modulate Interaction With Calcitonin Receptors. *Mol Pharmacol* **69**:1984-1989.
- Udawela M, Hay D L and Sexton P M (2004) The Receptor Activity Modifying Protein Family of G Protein Coupled Receptor Accessory Proteins. *Semin Cell Dev Biol* **15**:299-308.
- Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G and Costagliola S (2005) Glycoprotein Hormone Receptors: Link Between Receptor Homodimerization and Negative Cooperativity. *EMBO J* **24**:1954-1964.
- Vassilatis DK, Hohmann J G, Zeng H, Li F, Ranchalis J E, Mortrud M T, Brown A, Rodriguez S S, Weller J R, Wright A C, Bergmann J E and Gaitanaris G A (2003) The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4903-4908.
- Vidi PA, Chemel B R, Hu C D and Watts V J (2008) Ligand-Dependant Oligomerization of Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors in Living Neuronal Cells. *Mol Pharmacol*.
- Waldhoer M, Fong J, Jones R M, Lunzer M M, Sharma S K, Kostenis E, Portoghese P S and Whistler J L (2005) A Heterodimer-Selective Agonist Shows in Vivo Relevance of G Protein-Coupled Receptor Dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9050-9055.

- White JF, Grodnitzky J, Louis J M, Trinh L B, Shiloach J, Gutierrez J, Northup J K and Grisshammer R (2007) Dimerization of the Class A G Protein-Coupled Neurotensin Receptor NTS1 Alters G Protein Interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:12199-12204.
- White JH, Wise A, Main M J, Green A, Fraser N J, Disney G H, Barnes A A, Emson P, Foord S M and Marshall F H (1998) Heterodimerization Is Required for the Formation of a Functional GABA(B) Receptor. *Nature* **396**:679-682.
- Whorton MR, Bokoch M P, Rasmussen S G, Huang B, Zare R N, Kobilka B and Sunahara R K (2007) A Monomeric G Protein-Coupled Receptor Isolated in a High-Density Lipoprotein Particle Efficiently Activates Its G Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:7682-7687.
- Wu D, Eberlein W, Rudolf K, Engel W, Hallermayer G and Doods H (2000) Characterisation of Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors in Rat Atrium and Vas Deferens: Evidence for a [Cys(Et)(2, 7)]HCGRP-Preferring Receptor. *Eur J Pharmacol* **400**:313-319.
- Xu J, He J, Castleberry A M, Balasubramanian S, Lau A G and Hall R A (2003) Heterodimerization of Alpha 2A- and Beta 1-Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* **278**:10770-10777.
- Xu TR, Baillie G S, Bhari N, Houslay T M, Pitt A M, Adams D R, Kolch W, Houslay M D and Milligan G (2008) Mutations of Beta-Arrestin 2 That Limit Self-Association Also Interfere With Interactions With the Beta2-Adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: Implications for Beta2-Adrenoceptor Signalling Via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem J* **413**:51-60.

- Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Pante N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Aebi U and . (1995) A Giant Nucleopore Protein That Binds Ran/TC4. *Nature* **376**:184-188.
- Zeng FY and Wess J (1999) Identification and Molecular Characterization of M3 Muscarinic Receptor Dimers. *J Biol Chem* **274**:19487-19497.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J and He X (2005) A Dual-Kinase Mechanism for Wnt Co-Receptor Phosphorylation and Activation. *Nature* **438**:873-877.
- Zhang Z, Sun S, Quinn S J, Brown E M and Bai M (2001) The Extracellular Calcium-Sensing Receptor Dimerizes Through Multiple Types of Intermolecular Interactions. *J Biol Chem* **276**:5316-5322.
- Zhao GQ, Zhang Y, Hoon M A, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba N J and Zuker C S (2003) The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* **115**:255-266.

ANNEXES

Article 3

Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization.

Ajamete Kaykas, Julia Yang-Snyder, **Madeleine Héroux**, Kavita V. Shah, Michel Bouvier et Randall T. Moon. *Nature Cell Biology* 6: 52 (2003).

Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization

Ajamete Kaykas¹, Julia Yang-Snyder¹, Madeleine Héroux², Kavita V. Shah¹, Michel Bouvier² and Randall T. Moon^{1,3}

Wnt signalling pathways regulate cell proliferation, cell fate and morphogenetic movements. Here, we demonstrate that the Frizzled (Fz) family of Wnt receptors^{1–4}, similarly to G-protein-coupled receptors (GPCRs)^{5–7}, form specific homo- and hetero-oligomers. Two lines of evidence suggest that oligomerization occurs in the endoplasmic reticulum: first, a mutant allele of Fz4, encoding a truncated protein that is retained in the endoplasmic reticulum, is linked to the autosomal-dominant retinal degenerative disease, familial exudative vitreoretinopathy (FEVR)⁸. We show that this mutant form of Fz4 oligomerizes with wild-type Fz4, retains it in the endoplasmic reticulum and inhibits its signalling. Second, a derivative of Fz1 targeted to the endoplasmic reticulum traps wild-type Fz1 in the endoplasmic reticulum and blocks its signalling. These data support the hypothesis that oligomerization of mutant and wild-type Fz proteins occurs in the endoplasmic reticulum and may explain the genetic dominance of this FEVR allele.

Western blot analysis of lysates from P19 cells that express endogenous Fz1, and 293 cells overexpressing an haemagglutinin (HA)-tagged version of rat Fz1 (HA-Fz1), demonstrates that both overexpressed Fz1 (Fig. 1a, left) and endogenous Fz1 (Fig. 1a, right) appears as multiple bands that are one, two and three times the predicted molecular mass. This suggests that Fz1 can form oligomers. To confirm that Fzs form homo-oligomers and to test whether they can hetero-oligomerize, rat Fz1 and Fz2 tagged with the Myc epitope were co-immunoprecipitated with HA-Fz1 from lysates of 293T cells. Using an anti-HA antibody to pull down HA-Fz1 resulted in co-immunoprecipitation of Myc-Fz1 and Myc-Fz2, but not an unrelated GPCR, Flag-M2 muscarinic receptor (Flag-M2; Fig. 1b). To determine if co-immunoprecipitation of Fzs result from artefactual aggregates formed during cell lysis and membrane solubilization, cells expressing HA- or Myc-Fz were lysed and mixed before immunoprecipitation. Under these conditions, HA-Fz1 failed to immunoprecipitate Myc-Fz1 and Myc-Fz2 (see Supplementary Information, Fig. S1a–c), indicating that the

receptors need to be co-expressed to form oligomers.

Next we examined whether Fzs exist in a complex at the plasma membrane by repeating the immunoprecipitation in the presence of BS³, a cell-impermeable cross-linker with a 10-Å arm. In the presence of BS³, HA-Fz1 was cross-linked to Myc-Fz1 and Myc-Fz2, but not to Flag-M2 (see Supplementary Information, Fig. S2a–e). These observations are consistent with the existence of Fz oligomers at the plasma membrane.

We then tested the ability of Fzs to function in a β -galactosidase (β -gal) complementation assay used to detect protein–protein interactions^{9,10}. Fz1 and Fz2 were fused to the α and ω mutants of β -gal (Fig. 1c), which are deficient in enzymatic activity unless brought into close proximity^{9,10}. As controls, similar fusions were made with Smoothed (Smo), a closely related protein, and the M1 and M2 muscarinic receptors. To quantify the level of protein expression, ω fusion proteins were fused to renilla luciferase (RL). The triple fusions allowed simultaneous measurement of β -gal complementation versus expression levels, as measured by RL activity. After expression at similar levels (Fig. 1d), lysates from 293T cells expressing Fz1 or Fz2 fused to α and Fz1 or Fz2 fused to ω RL showed an increase in β -gal activity over those transfected with vector alone (Fig. 1e). However, no increase in activity was observed when expressing either Fz1 α or Fz2 α with M1- ω RL, M2- ω RL or Smo- ω RL (Fig. 1e). These results demonstrate that Fz1 and Fz2 specifically homo- and hetero-oligomerize, but do not interact with Smo, M1 or M2. We then established that Fzs interact in live cells using a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay¹¹ (Fig. 1f).

To determine if homo- and hetero-oligomerization is a general property of Fz proteins, several vertebrate Fzs were tested for their interactions. All of the Fzs tested (Fz1, 2, 4, 7 and 9) strongly homo-oligomerized (see Supplementary Information, Fig. S3b). Interestingly, Fzs that are more similar in amino-acid sequence interacted to a greater extent, except for Fz7, which strongly interacted with all of the other Fzs tested (see Supplementary Information, Fig. S3a,b). These observations indicate that although homo-oligomerization is probably a general property of Fzs, there is some selectivity in the

¹Howard Hughes Medical Institute, Department of Pharmacology, and Center for Developmental Biology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA 98195, USA. ²Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

³Correspondence should be addressed to R.T.M. (rtmoon@u.washington.edu).

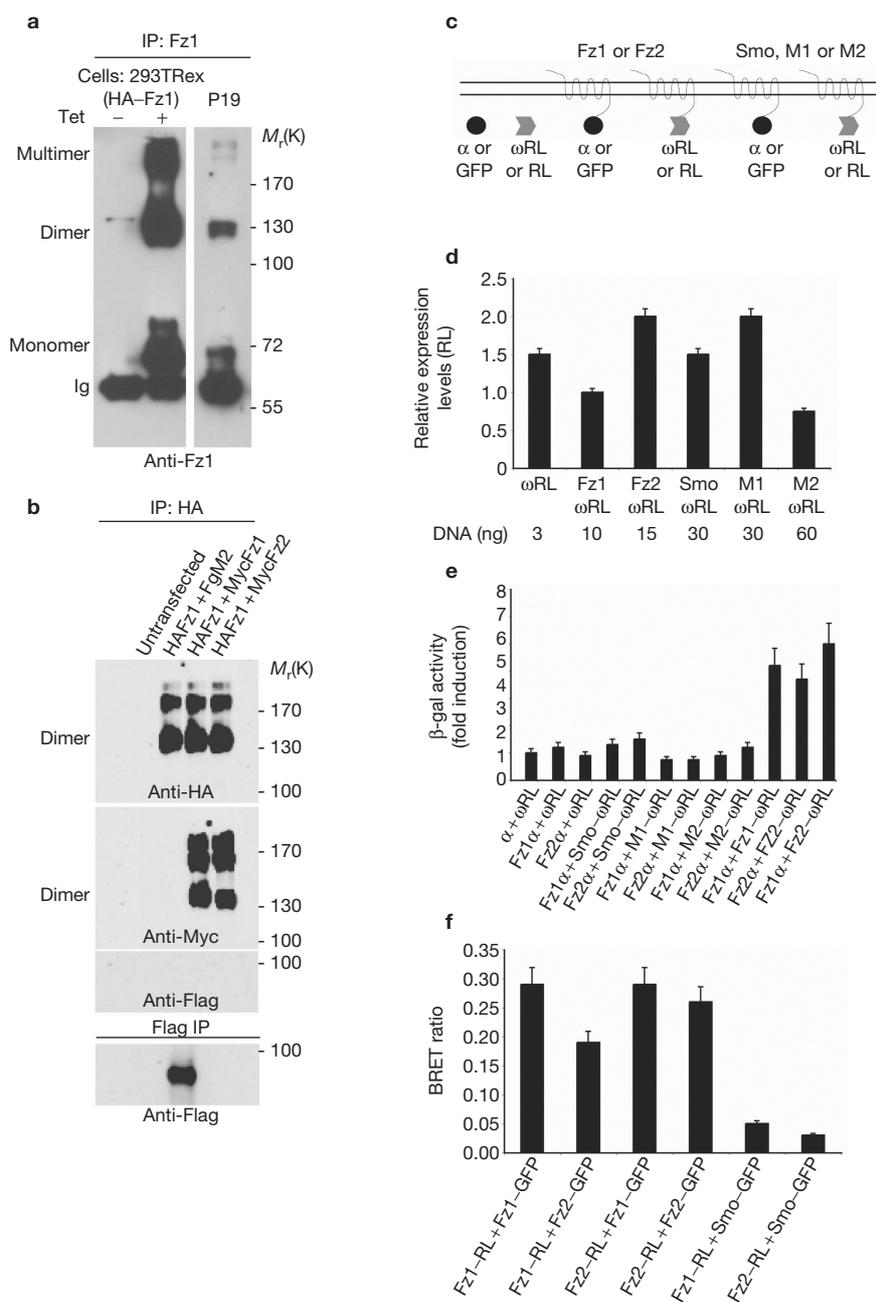


Figure 1 Fzs homo- and hetero-oligomerize. (a) Lysates from 293Trex cells expressing tetracycline-inducible HA-Fz1 were treated with (+) or without (-) $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline for 24 h to induce HA-Fz1 (left). Lysates from P19 cells (right). Lysates in both panels were immunoprecipitated with an anti-Fz1 antibody then subjected to western blotting with the same antibody. (b) Co-immunoprecipitation of Fz1 with itself and with Fz2. Lysates from untransfected 293T cell extracts or those expressing HA-Fz1 with Flag-M2, Myc-Fz1 or Myc-Fz2 were immunoprecipitated with HA or Flag antibodies before western blotting with HA, Myc and Flag antibodies as indicated. (c) Fz derivatives used to test Fz oligomerization in β -gal complementation and BRET assays. Full length Fz1, Fz2, Smo, M1 and M2 were fused to the α mutant of β -gal, a fusion of RL to the ω mutant of β -gal (ω -RL), GFP and RL, as indicated. (d) RL activity assay to measure levels of ω RL fusion

protein expression used in the β -gal complementation assay. The amount of transfected DNA is indicated (e) β -gal complementation assay demonstrates that Fz forms homo- and hetero-oligomers. 293T cell lysates expressing combinations of α and ω RL fusion proteins at the expression levels shown in Fig. 1d were assayed for β -gal activity. The fold β -gal activation and standard deviation over vector are shown and are an average of three experiments. (f) A BRET assay, demonstrating that Fz1 and Fz2 homo- and hetero-oligomerize in live cells. 293T cells were transfected with the GFP and RL fusion constructs shown in Fig. 1c and live cells were assayed for their RL and GFP emission spectra after addition of a membrane-permeable RL substrate. The average BRET ratio (reflecting the amount of energy transferred from RL to GFP) and standard deviation from four experiments are shown.

extent of hetero-oligomerization between distinct Fzs.

The oligomeric status of many receptors is regulated by their respective ligands^{6,7,12}. To determine if Wnts affect the ability of Fz1 and Fz2

to homo- or hetero-oligomerize, Fz1 and Fz2 were co-expressed with the prototypical members of the canonical and non-canonical Wnt-families, Wnt-1 and Wnt-5a, and tested for an effect on homo- and

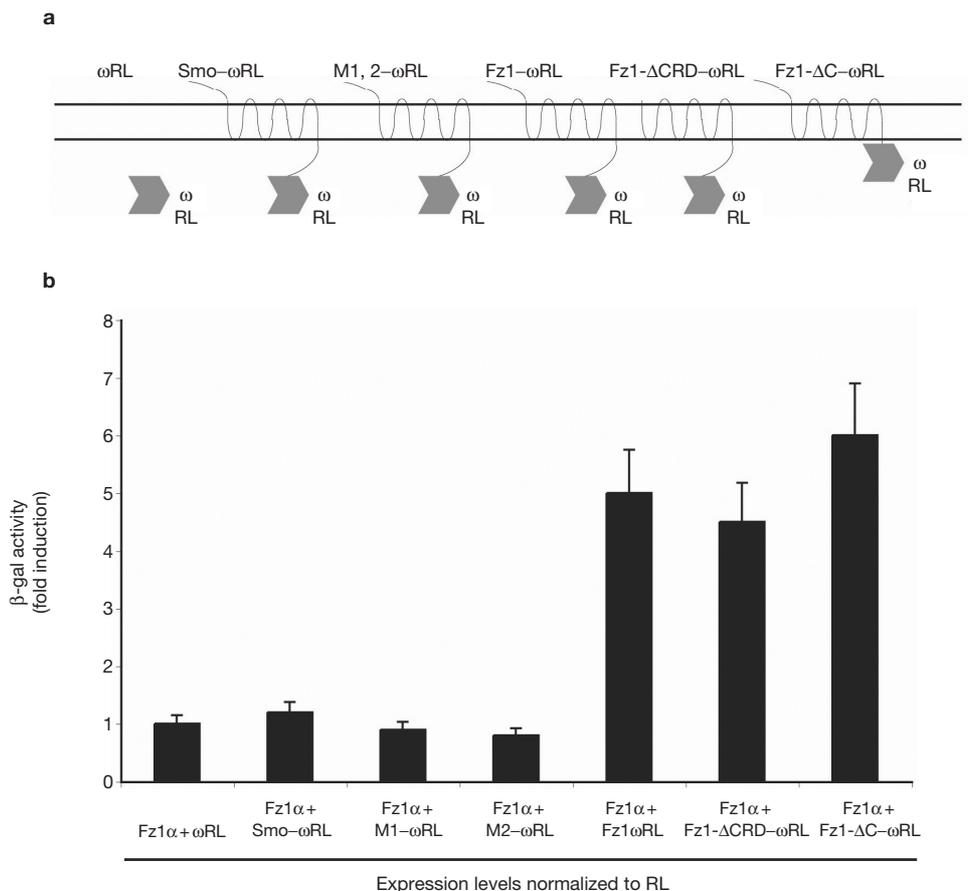


Figure 2 The heptahelical domain of Fz is sufficient for oligomerization. **(a)** Fz1 derivatives used to map the domains of Fz1 required for oligomerization. The β-gal ω mutant was fused to full-length RL and then to either full-length Fz1, Fz1-Δ1–220 amino acids (ΔCRD) or Fz1-Δ360–381 (ΔC). **(b)** Fz1-ΔCRD and Fz1-ΔC oligomerize with Fz1. 293T cells were

transfected with the α and ωRL derivatives shown in **a** at levels of DNA that gave equal RL activity. Each of the combinations were assayed for β-gal activity. All β-gal activities are relative to the Fz1α- and ωRL-transfected cells, which were set to 1. The experiment was conducted three times, and averages and standard deviations are shown.

hetero-oligomerization of Fz1 and Fz2 as measured by β-gal complementation. Neither Wnt-1 nor Wnt-5a had an effect on the ability of Fz1/Fz2 α or Fz1/Fz2 ω to complement each other (see Supplementary Information, Fig. S4a). This is consistent with Fz1 and Fz2 constitutively forming homo- and hetero-oligomers independently of binding ligand, although we cannot exclude the possibility that oligomerization is occurring in response to expression of one or more of the 19 mammalian Wnts in the 293T cells.

Wnts bind the cysteine-rich domain (CRD) of Fz and multiple studies have shown that this CRD can form dimers. Specifically, the CRD of Fz8 has been shown to crystallize as a dimer¹³. Co-immunoprecipitation studies have also shown that other CRD-containing Fzs and Fz-related proteins can dimerize^{14,15}. Taken as a whole, these studies raise the question of whether the CRD is required for Fz oligomerization.

To test directly whether the CRD of Fz is required for its oligomerization, a mutant of Fz1 lacking its CRD was generated. This mutant also allowed us to assess if Wnt binding is required for Fz oligomerization, as the CRD is known to bind Wnts. In addition, we also generated a mutant in which the C-terminal tail of Fz1 was deleted, as it contains a PDZ-binding motif that is bound by a plethora of proteins involved in protein clustering. We generated ωRL fusion proteins of the two deletion mutants (Fig. 2a) and measured β-gal complementation with Fz1α. When compared with similar RL levels, both Fz1-ωRL mutants

complemented Fz1α, whereas the control ωRL fusions (M1-ωRL, M2-ωRL or Smo-ωRL) did not complement Fz1α (Fig. 2b). In agreement with our observations, multiple GPCRs dimerize through their heptahelical transmembrane domains^{7,16}. Interestingly, in some cases both the extracellular domain and the heptahelical domains contribute to dimerization¹⁶. Although the CRD may contribute to oligomerization of Fz, our data suggest that the heptahelical membrane-spanning domain is sufficient for Fz1 oligomerization and is consistent with Fzs forming oligomers independently of its CRD and the Wnt ligand. Our data also indicate that the C-terminal tail and its associated scaffolding proteins are not required for oligomerization of Fz.

To determine if Fzs oligomerize in the endoplasmic reticulum before transport to the plasma membrane, we generated a derivative of Fz1 that is conditionally retained in the endoplasmic reticulum (Fz1-ER). This Fz1 mutant might trap wild-type Fz1 in the endoplasmic reticulum if Fz1 oligomerizes in this compartment. Fz1-ER was generated by replacing the signal sequence of Fz with a conditional activation domain (CAD)¹⁷. CAD contains the human growth hormone signal sequence, four tandem repeats of a mutant form of the FK506-binding protein that aggregate and are retained in the endoplasmic reticulum, and a furin cleavage site¹⁷. The rationale for this design is that the mutant FK-binding domain fusion can be induced to disaggregate through addition of a small-molecule derivative of FK506, AP21998

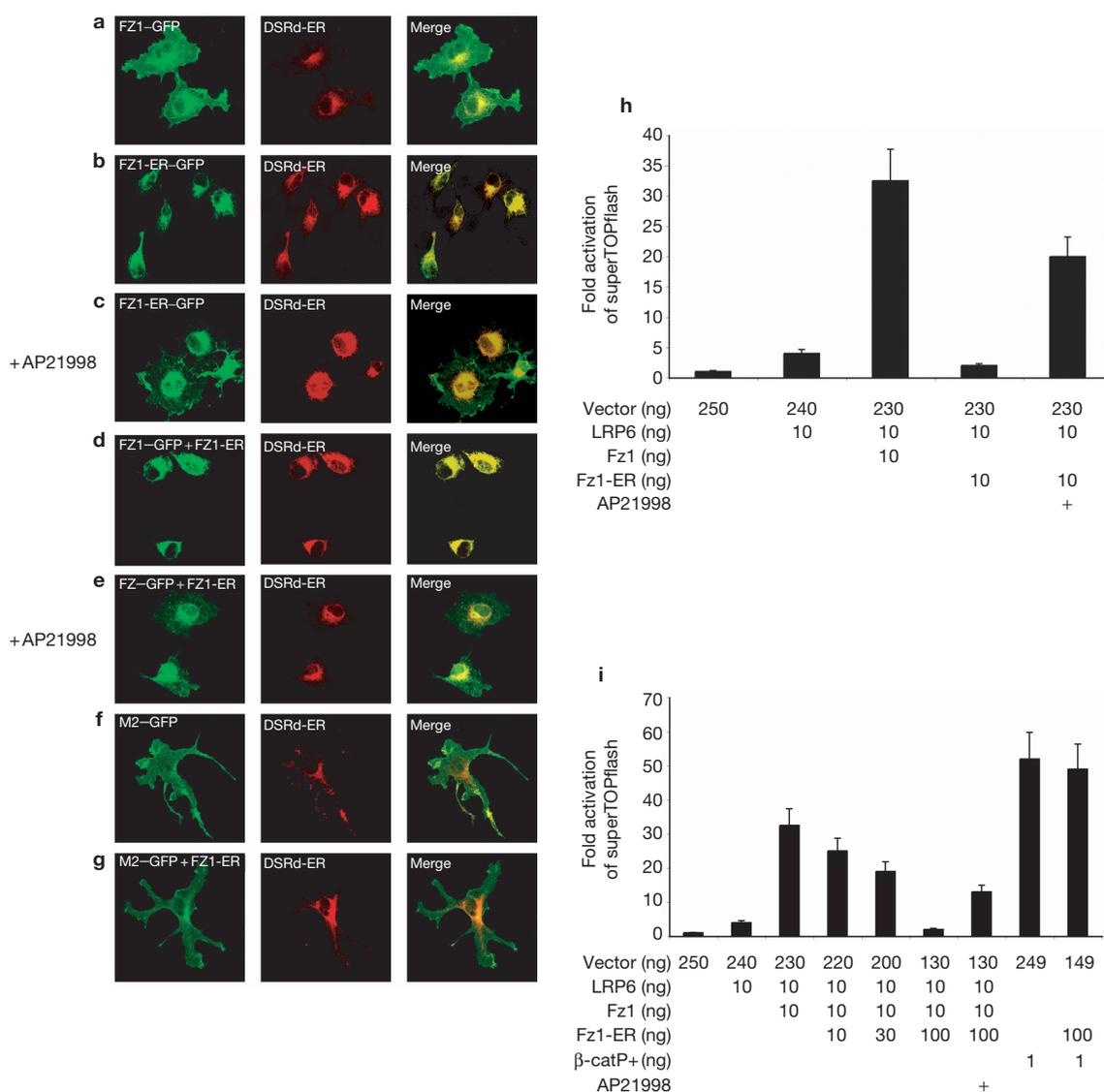


Figure 3 Fz1 oligomerizes in the endoplasmic reticulum. (a–g) Confocal microscopy of Cos7 cells expressing an endoplasmic-reticulum-retained version of DsRed2 (DsRd-ER; red) and Fz1–GFP (green; a) or Fz1–ER–GFP (green; b). In c, the experiment was performed as in b but treated with 2 μ M AP21998, which releases Fz1–ER–GFP (green) from the endoplasmic reticulum. In d, Fz1–GFP was cotransfected with a fivefold excess of Fz1–ER. In e, the experiment was performed as in d, but treated with AP21998. In f, cells were transfected with M2–GFP (green). In g, M2–GFP was cotransfected with a fivefold excess of Fz1–ER. The middle column shows expression of cotransfected DsRd-ER (red). The right-hand column shows merged images of the GFP and DsRd-ER signals. (h) SuperTOPflash reporter assays to measure the ability of Fz1–ER to signal. 293T cells were

transfected in 24-well plates with 1 ng pRLTK (as a normalization control), 10 ng of superTOPflash and the indicated amount of expression plasmid. Samples were left untreated or treated with 2 μ M AP21998. Cells transfected with vector only were given an arbitrary value of 1 and the fold activation of luciferase is shown. The experiment was performed three times, and averages and standard deviations are shown. (i) SuperTOPflash assays to measure the ability of Fz1–ER to inhibit signalling by Fz1. The experiment was performed as in h, except that cells were transfected with increasing amounts of the Fz1–ER expression plasmid (as indicated). To test for specificity, 1 ng of the β -catP+ expression plasmid was used, which activated the SuperTOPflash reporter downstream of Fz. The experiment was performed three times, and averages and standard deviations are shown.

(ref. 17). The disaggregated protein then moves into the Golgi apparatus and is processed by furin to produce a mature native Fz1 that is transported to plasma membrane.

Before examining the effects of Fz1–ER on the localization of wild-type Fz1, we showed that a fusion of wild-type Fz1 with a C-terminal green fluorescent protein (GFP) tag (Fz1–GFP) is found throughout the secretory pathway and at the plasma membrane of Cos7 cells (Fig. 3a). In contrast, the Fz1–GFP derivative fused to the CAD domain

(Fz1–ER–GFP) is retained in the endoplasmic reticulum, where it colocalizes with an endoplasmic-reticulum-retained derivative of red fluorescent protein (DsRd-ER)¹⁸ (Fig. 3b). Fz1–ER–GFP is released from the endoplasmic reticulum through addition of AP21998, resulting in its appearance throughout the secretory pathway and at the plasma membrane (Fig. 3c). To determine if endoplasmic-reticulum-targeted Fz1 has the capacity to trap wild-type Fz1, Fz1–GFP was cotransfected with DsRd-ER and a fivefold excess of untagged Fz1–ER. Expression of

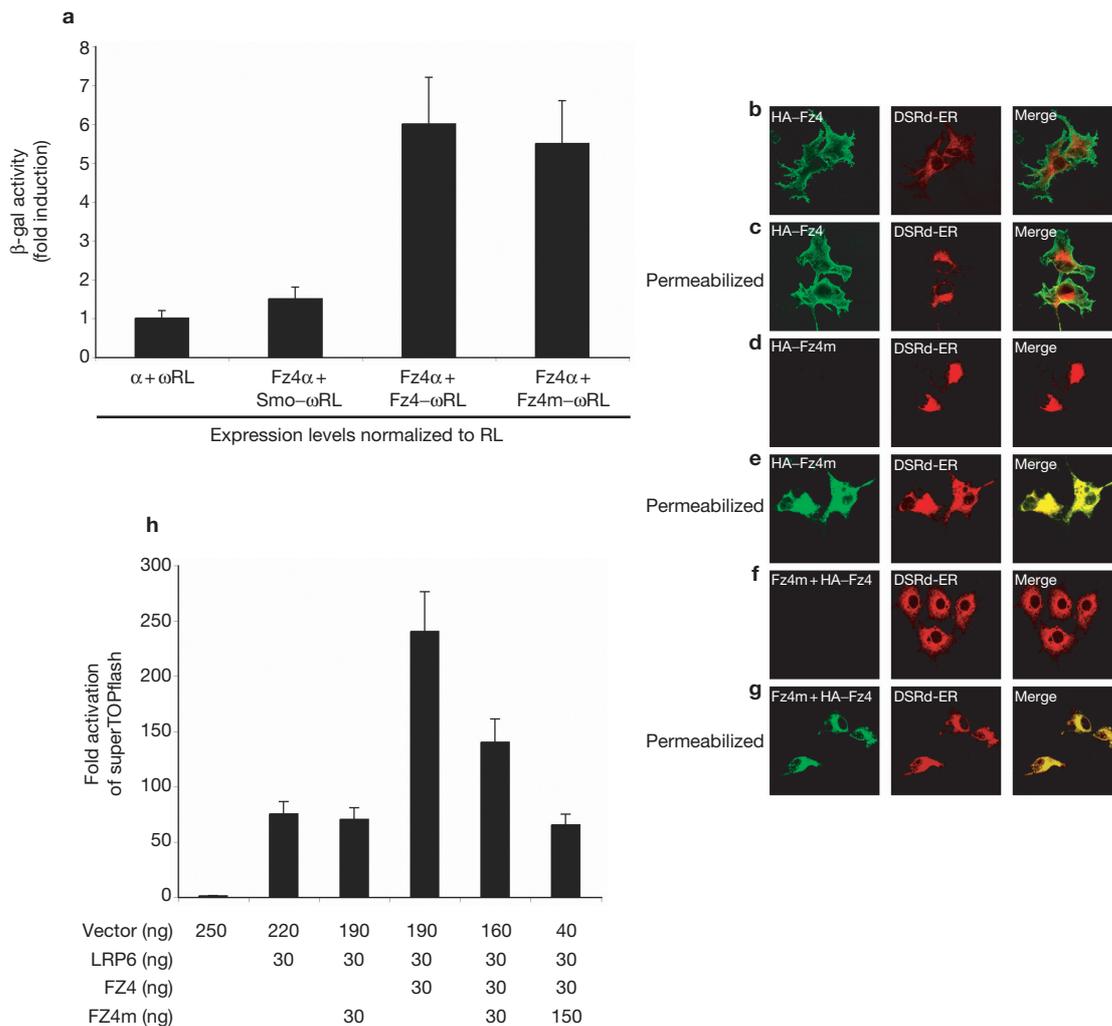


Figure 4 Mutant Fz4 inhibits wild-type Fz4. **(a)** β -gal complementation assay to test for oligomerization of Fz4 with itself and with Fz4m. 293T cells were transfected with the indicated α and ω RL derivatives and their expression levels were normalized to RL activity. β -gal activity is shown as fold activation over α - and FZ4- ω RL-transfected cells. Data represents the average of three experiments with the standard deviation. **(b–g)** Confocal microscopy of Cos7 cells transfected with HA-Fz4 and stained for HA (green, **b**). In **c**, the experiment was performed as in **b**, except that the cells were permeabilized to detect intracellular protein before staining for HA (green). In **d**, cells were transfected with HA-Fz4m and stained for HA (green). In **e**, the experiment was performed as in **d**, except that cells were permeabilized. In **f**, HA-Fz4 was cotransfected with a fivefold excess of

untagged Fz4m and stained for HA (green). In **g**, the experiment was performed as in **f**, except that cells were permeabilized to detect intracellular protein and stained for HA (green). Middle column shows expression of cotransfected DsRd-ER (red). Right-hand column shows merged images of the HA and DsRd-ER signals. **(h)** SuperTOPflash reporter assays to measure the ability of Fz4m to inhibit Fz4 signalling were performed as described in Fig. 3i. The amount of each expression plasmid is shown in the legend. The experiment was performed three times, and the fold activation of the reporter over vector only and the standard deviation are shown.

Fz1-ER completely blocked transport of Fz1-GFP to the plasma membrane and retained it in the endoplasmic reticulum, where it colocalized with DsRd-ER (Fig. 3d). Importantly, Fz1-GFP that had been retained in the endoplasmic reticulum could be released by AP21998 treatment (Fig. 3e). As a control, we showed that a M2 muscarinic receptor GFP fusion protein, M2-GFP, was not retained in the endoplasmic reticulum after transfection of a fivefold excess of Fz1-ER (compare Fig. 3f to 3g). To quantify the ability of Fz1-ER to retain wild-type Fz1 in the endoplasmic reticulum, we counted 20 transfected cells (DsRd-ER-positive) in multiple fields of the experiments conducted in Fig. 3a–g. In 80% of cells transfected with Fz1-GFP, some GFP could be observed at the periphery of cells. However, in cells

transfected with Fz1-ER-GFP, or Fz1-GFP and a fivefold excess of Fz1-ER, less than 10% of the transfected cells had detectable peripheral GFP fluorescence (see Supplementary Information, Fig. S4b). There was a slight reduction (10–20%) in Fz1-GFP peripheral staining when cells were cotransfected with an equal amount of Fz1-ER (data not shown). However, the actual reduction may be greater than that observed, because in transient transfections conducted with a 1:1 ratio of DNAs every cell may not be transfected with both Fz1-GFP and Fz1-ER. These observations argue that Fz1-ER directly and specifically retains Fz1-GFP in the endoplasmic reticulum and are consistent with the formation of Fz oligomers in the endoplasmic reticulum during or after translation.

We then investigated the correlation between the subcellular distribution of Fz1 and its ability to signal. First, we demonstrated that cotransfection of Fz1 and its co-receptor, LRP6, synergize to activate a Wnt/ β -catenin reporter, superTOPflash (Fig. 3h). To determine if Fz1-ER signals conditionally, it was cotransfected with LRP6 and superTOPflash. Fz1-ER did not synergize with LRP6 to activate superTOPflash unless Fz1-ER was released from the endoplasmic reticulum by treatment with AP21998 (Fig. 3h). The inability of Fz1-ER to activate the reporter, and its ability to trap wild-type Fz1 in the endoplasmic reticulum, raised the possibility that ER-retained Fzs may function in a dominant-negative manner. In support of this hypothesis, Fz1-ER blocked the ability of wild-type Fz1 to synergize with LRP6, and this block was released after treatment with AP21998 (Fig. 3i). Importantly, the Fz1-ER-mediated block of superTOPflash did not occur after transfection of an activated form of β -catenin (β -catP+; Fig. 3i), which activates the Wnt pathway downstream of Frizzled. These observations are consistent with a model in which Fzs oligomerize within the endoplasmic reticulum, and demonstrate that Fz1-ER functions as a specific and reversible dominant inhibitor of Fz1 signalling.

Next, we examined whether Fz oligomerization may be informative in understanding the genetic dominance of the one identified disease linked to a Frizzled, FEVR⁸. As we have shown that targeting Fz1 to the endoplasmic reticulum allows it to function in a dominant-negative manner, and as that a mutant form of Fz4 found in FEVR patients is not transported to the plasma membrane⁸, one testable hypothesis is that dominant alleles of FEVR mutations also dimerize and function in a dominant negative manner. To determine directly if wild-type Fz4 can form oligomers with itself or with the Fz4-FEVR mutant (Fz4m), both were fused to t α and ω RL, as shown for Fz1 and Fz2 (Fig. 1c). When expressed at equal levels, both combinations of Fz4 α and Fz4 ω RL or Fz4m ω RL gave a significant increase in β -gal activity when compared with cells transfected with Fz4 α and the control proteins ω RL and Smo- ω RL (Fig. 4a). These data demonstrate that Fz4 forms a complex with itself and with Fz4m.

We then examined the subcellular localization of Fz4m and asked whether it could trap wild-type Fz4 in the endoplasmic reticulum, similarly to the ability of Fz1-ER to trap Fz1. Cos7 cells were transfected with HA-tagged Fz4 (HA-Fz4), Fz4m (HA-Fz4m) and DsRd-ER, and either left untreated or permeabilized to detect intracellular proteins. HA-Fz4 localized to the plasma membrane and secretory pathway in both untreated and permeabilized cells (Fig. 4 b, c). However, HA-Fz4m was only detected in the endoplasmic reticulum of permeabilized cells, where it colocalized with DsRd-ER (Fig. 4d, e). As Fz4m is retained in the endoplasmic reticulum and can interact with wild-type Fz4 in the β -gal complementation assay, we tested if Fz4m can trap Fz4 in the endoplasmic reticulum. Expression of Fz4m reduced membrane staining of HA-Fz4, consistent with mutant Fz4 trapping wild-type Fz4 (compare Fig. 4b to 4f). When these cells were permeabilized, HA-Fz4 was found in the endoplasmic reticulum, where it colocalizes with DsRd-ER (Fig. 4g).

To quantify the ability of Fz4m to inhibit targeting of Fz4 to the plasma membrane, 20 transfected and DsRd-ER-positive cells in each of the experiments conducted in Fig. 4b–g were also scored for HA staining. All of the DsRd-ER-positive cells that were transfected with HA-Fz4 also stained positive for HA, whether or not the cells were permeabilized (see Supplementary Information, Fig. S4c). In contrast, after transfection with HA-Fz4m, none of the non-permeabilized DsRd-ER-positive cells and all of the detergent-permeabilized DsRd-ER-positive cells also stained positive for the HA epitope. In support of the model in which mutant Fz4 traps wild-type Fz4 in the endoplasmic

reticulum, only 10% of the non-permeabilized DsRd-ER-positive cells, and all of the permeabilized cells, also stained positive for HA when a fivefold excess of untagged Fz4m was transfected with HA-Fz4 (see Supplementary Information, Fig. S4c). When the same experiment was conducted at an equimolar DNA ratio, there was a slight reduction (5–10%) in HA-Fz4 peripheral staining (data not shown). Again, this is probably an underestimate, because not every cell receives both DNAs at a 1:1 ratio of DNA.

To determine if Fz4m can inhibit Fz4 signalling, Fz4 was transfected with LRP6 into 293T cells and their ability to synergize to activate superTOPflash was determined. Fz4, but not Fz4m, synergized with LRP6 to activate superTOPflash. The synergy of Fz4 with LRP6 was significantly inhibited by transfecting equal amounts of Fz4m and completely inhibited by transfecting a fivefold excess of Fz4m (Fig. 4h). These observations suggest that the ability of Fz4m to oligomerize with wild-type Fz4, retain it in the endoplasmic reticulum and inhibit its signalling may explain the genetic dominance of this FEVR allele.

Our results demonstrate that the Fz family of Wnt receptors homo- and hetero-oligomerize similarly to other heptahelical receptors. Fz1 has been shown to be involved in Wnt/ β -catenin signalling, whereas Fz2 has been shown to participate in Wnt/calcium signalling^{1,4,19,20}. It is possible that Fz oligomerization modulates Wnt signalling and that different combinations of Fz hetero-oligomers signal differently to Fz homo-oligomers, as noted for other heptahelical receptors^{6,21}. In any event, our data strongly suggest that Fz oligomerization contributes to the phenotype of some patients with FEVR, a disease associated with a defect in angiogenesis of the retina⁸. Perturbation of Wnt signalling might explain this defect in angiogenesis that occurs during FEVR, because Wnt signalling has been shown to be involved in angiogenesis and vasculature formation²². Further analysis of Fz oligomerization will probably shed light on the trafficking and function of Fzs in Wnt signalling and possibly aid the development of therapies for FEVR. □

METHODS

Cell culture and transfection. 293, 293T, P19 and Cos7 cells were grown in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% Pen/Strep under standard conditions. 293TREx cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% Pen/Strep and 5 μ g ml⁻¹ blasticidin under standard conditions. 293 cells expressing HA-Fz1 under the control of tetracycline (tet) were generated by transfecting 293TREx cells with an expression vector pCDNA5TO (Invitrogen) containing HA-Fz1 under the control of a tet-responsive promoter and a hygromycin resistance cassette. Stable cell lines were selected with 200 μ g ml⁻¹ hygromycin and tested for tet responsiveness with 1 μ g ml⁻¹ tet, followed by western blotting with an anti-HA. All transfections were performed in 12- or 24-well plates with Lipofectamine Plus or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications.

Immunoprecipitation and cross-linking. Cell lysates were generated from 5.0 \times 10⁶ 293T cells in lysis buffer containing 0.5% digitonin. Co-immunoprecipitations were performed as described⁸. Cell cross-linking with the BS³ cross-linker (Pierce, Rockford, IL) was performed according to the manufacturer's specifications. For immunoprecipitation of Fz1 with anti-Fz1 antibody (R&D systems, Minneapolis, MN), 5.0 \times 10⁶ 293TREx cells expressing HA-Fz1 or 5.0 \times 10⁷ P19 cells were immunoprecipitated with 2 μ g of anti-Fz1 antibody and 30 μ l of a 50% protein G slurry (Sigma).

Confocal microscopy. 1.0 \times 10⁵ Cos7 cells were seeded on cover-slips in 12-well plates, fixed, stained and permeabilized with 0.5% digitonin as described⁸. In cases when cells were permeabilized, 0.5% digitonin was added to the cells for 15 min. In all experiments, cells were transfected with 5 ng DsRd-ER and 50 ng Fz1-GFP, Fz1-ER, Fz1-ER-GFP, M2-GFP, HA-Fz4 or HA-Fz4m. The total amount of DNA was made up to a total of 1 μ g with CS2+. When a fivefold

excess of Fz1-ER or Fz4m were used, 250 ng of DNA was transfected instead of 50 ng.

BRET assay. 293T cells were transfected with the GFP and RL constructs in 6-well plates and BRET was performed as described¹¹. The BRET ratio was determined by calculating the ratio of the light emitted by receptor-GFP (500–530 nm) over the light emitted by receptor-RL (370–450 nm). Values were corrected by subtracting the BRET background signal detected when the receptor-RL constructs were expressed alone.

β -galactosidase assay. 293T cells were transfected with the α and ω β -gal fusion constructs and the assay was performed as described¹⁰. All measurements were performed with a Wallac 96V luminometer using the Dual-Light system (Applied Biosystems, Foster, CA) according to the manufacturer's specifications.

Recombinant DNA constructs. All constructs were made using standard recombinant DNA techniques. Detailed descriptions of constructs, maps and sequences will be provided on request and are posted on the Moon lab web site (<http://faculty.washington.edu/rmoon>). Rat Fz1 and Fz2, human Fz4 and Fz9, and *Xenopus* Fz7, were used in all experiments conducted with Fzs. Mouse Wnt-1 and *Xenopus* Wnt-5a were used in all experiments conducted with Wnts.

Reporter assay. 293T cells seeded in 24-well plates were transfected with 10 ng superTOPflash⁸, 1 ng pRLTK (Promega), and the indicated amount of effector plasmids. The final amount of DNA in all transfections was increased to a total of 250 ng with the CS2+ vector DNA. Assays were performed as described²³ and in accordance with the Dual luciferase assay specifications (Promega, Madison, WI).

Western blot analysis. All samples were lysed in 2 \times SDS sample buffer containing 8% β -mercaptoethanol, heated to 65 °C for 10 min, separated by SDS-PAGE using standard techniques, transferred to nitrocellulose and probed with antibodies for Fz1 at 1:500, HA at 1:2,000, Myc at 1:40, Flag at 1:500 and β -gal at 1:5,000. Blots were probed with the anti-species-specific HRP conjugated antibody at 1:10,000 and developed by ECL (Pierce) according to the manufacturer's specification.

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. MacDonald and P. Goldberg of Xenon Genetics for the Fz4 constructs, H. Blau of Stanford for the β -Gal complementation constructs and S. Angers for helpful comments. A.K. was supported in part by a National Institutes of Health reproductive biology training grant. R.T.M. is an Investigator, and A.K. and J.Y.S. are associates, of the Howard Hughes Medical Institute. M.B. and M.H. were supported in part by the Canadian Institute for Health Research, and M.H. holds a studentship from the Fonds de la recherche en Santé du Québec.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 22 October 2003; accepted 25 November 2003
Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology>.

- Slusarski, D. C., Corces, V. G. & Moon, R. T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410–413 (1997).
- Sumanas, S. & Ekker, S. C. *Xenopus* frizzled-7 morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation. *Genesis* **30**, 119–122 (2001).
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R. K. & Steinbeisser, H. Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **413**, 856–860 (2001).
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. & Moon, R. T. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279–283 (2000).
- Salahpour, A., Angers, S. & Bouvier, M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 163–168 (2000).
- Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 409–435 (2002).
- Rios, C. D., Jordan, B. A., Gomes, I. & Devi, L. A. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* **92**, 71–87 (2001).
- Robitaille, J. *et al.* Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nature Genet.* **32**, 326–330 (2002).
- Rossi, F. M., Blakely, B. T., Charlton, C. A. & Blau, H. M. Monitoring protein-protein interactions in live mammalian cells by beta-galactosidase complementation. *Methods Enzymol.* **328**, 231–251 (2000).
- Rossi, F., Charlton, C. A. & Blau, H. M. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 8405–8410 (1997).
- Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931 (2002).
- Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669–672 (2002).
- Dann, C. E. *et al.* Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86–90 (2001).
- Bafico, A. *et al.* Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 16180–16187 (1999).
- Carron, C. *et al.* Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ β -catenin pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2541–2550 (2003).
- Zhang, Z., Sun, S., Quinn, S. J., Brown, E. M. & Bai, M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* **276**, 5316–5322 (2001).
- Rivera, V. M. *et al.* Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science* **287**, 826–830 (2000).
- Ou, W. & Silver, J. Role of a conserved amino-terminal sequence in the ecotropic MLV receptor mCAT1. *Virology* **308**, 101–113 (2003).
- Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.* **9**, 695–698 (1999).
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12701–12711 (2000).
- Gomes, I. *et al.* G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J. Mol. Med.* **79**, 226–242 (2001).
- Goodwin, A. M. & D'Amore, P. A. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* **5**, 1–9 (2002).
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. & Moon, R. T. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr. Biol.* **13**, 680–685 (2003).

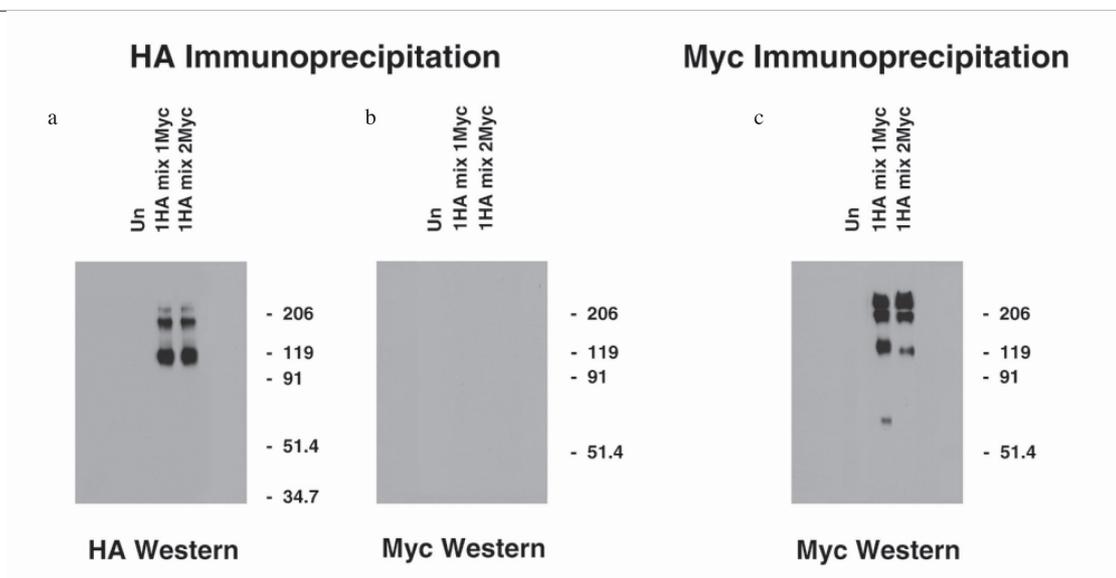


Figure S1. **Frizzleds do not co-immunoprecipitate if lysates from cells transfected with individual Frizzleds are mixed after lysis.** 293T cells were transfected with HAFz1 (1HA) and either MycFz1 (1Myc) or MycFz2, (2Myc) lysed, and mixed. Mixed lysates were immunoprecipitated with anti-HA

antibody or anti-Myc antibody as shown **a**, HA-immunoprecipitated lysates were probed with an anti-HA antibody or **b**, an anti-Myc antibody, or **c**, Myc-immunoprecipitated lysates were probed with an anti-Myc antibody.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

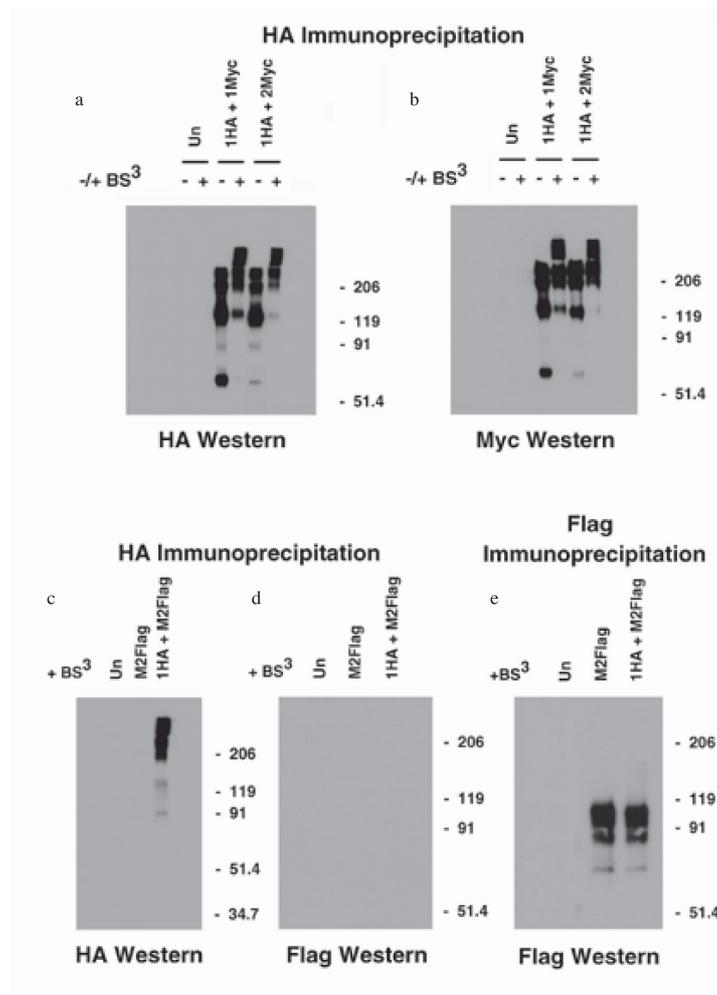


Figure S2. **Frizzleds can be cross-linked at the plasma membrane by BS3.** 293T cells were transfected with HAFz1 (1HA) and either MycFz1(1Myc), MycFz2(2Myc), or M2Flag and treated with BS³ cross-linker and immunoprecipitated with an anti-HA antibody or a Flag antibody as shown.

a, HA-immunoprecipitated lysates were probed with an anti-HA antibody or **b**, with an anti-Myc antibody or **c**, with an anti-HA antibody or **d**, with an anti-Flag antibody or **e**, Flag-immunoprecipitated lysates were probed with an anti-Flag antibody.

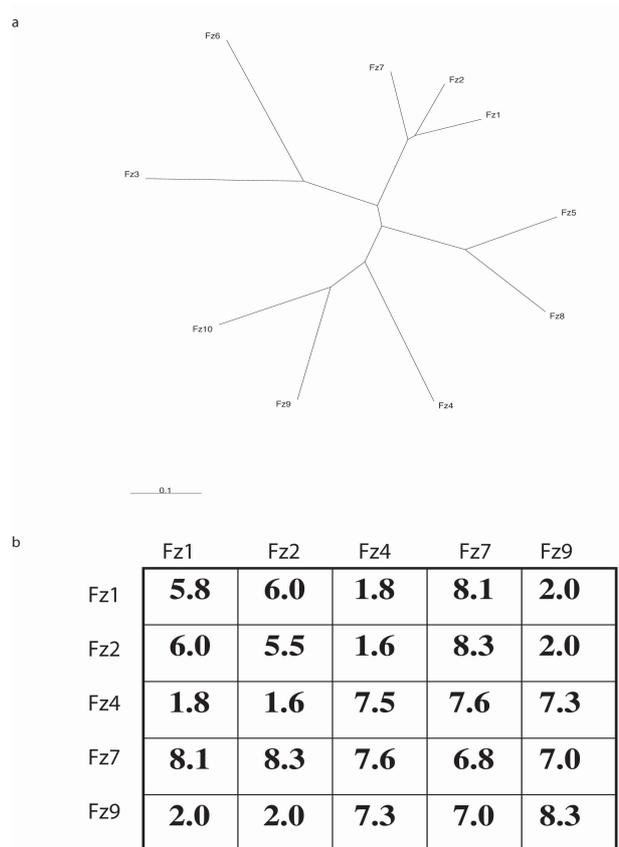


Figure S3. **Frizzled homo- and hetero-oligomerization make up a network of Frizzled/Frizzled interaction.** **a**, A phylogenetic tree of human frizzled made with clustal X and treeview software packages. More related Frizzleds are shown as closer together in the tree. 0.1 represents the number of changes per residue per unit length. **b**, Frizzled 1, 2, 4, 7, and 9, were tested for

their ability to homo- and hetero-oligomerize using the β -gal complementation assay as described in the legends to Fig. 1d and e. The fold complementation of each pair is shown as compared to Frizzled 1 and Smoothed complementation, which was set to 1. One representative experiment of 3 is shown.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

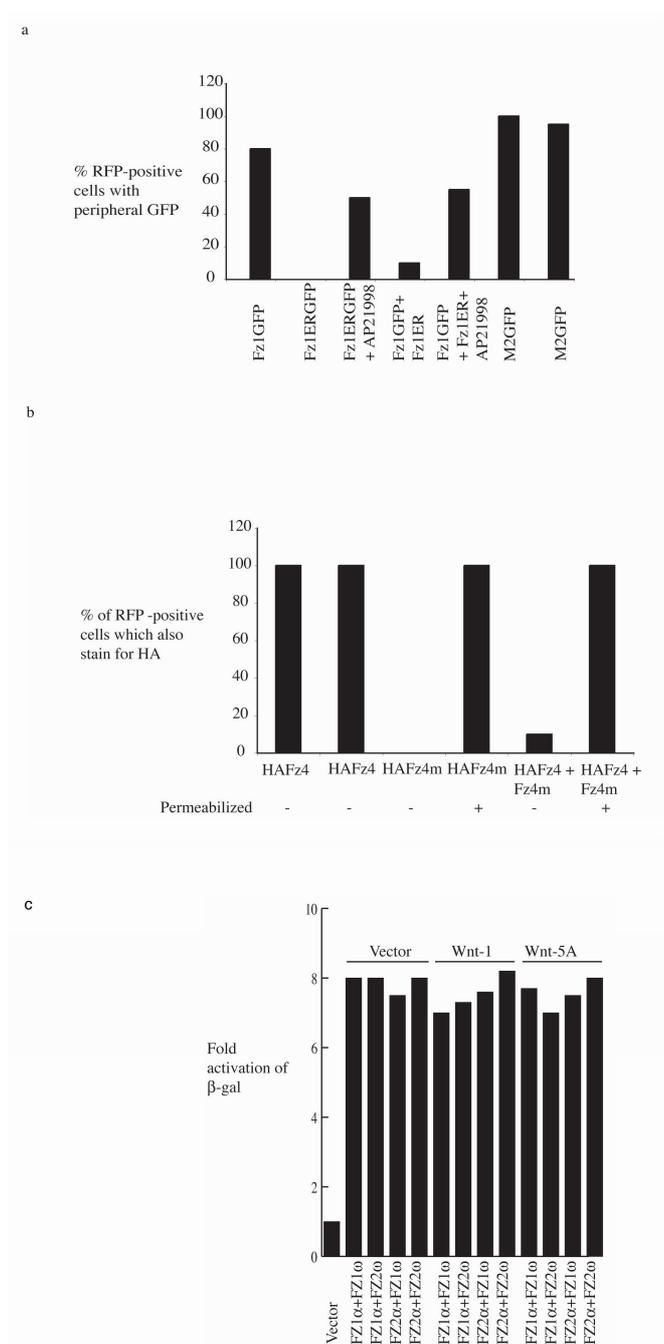


Figure S4. Quantification of the modulation of Fz1 and Fz2 homo- or hetero-oligomerization by Wnt-1 and Wnt-5a, and Fz1ER and Fz4m inhibition of Fz1 and Fz4 targeting to the plasma membrane. **a**, β -gal complementation assay to determine if ectopic Mouse Wnt-1 and Xenopus Wnt-5a modulate Frizzleds homo- and hetero-oligomerization. Lysates of 293T cells co-transfected with combinations of Fz1 or Fz2 fused to α , and Fz1 and Fz2 fused to ω , and Wnt-1 or Wnt-5a were assayed for β -gal activity. Fold β -gal activation over vector is shown for one representative experiment of three. **b**, To quantify the ability of Fz1ER to reversibly retain Fz1GFP in the ER; 20 cells which stained positive for DsRdER from each of the transfections performed in Figure 3a-g were scored for peripheral “membrane” staining of GFP. The percentage of DsRdER-positive cells that also have peripheral GFP staining is shown. **c**, To quantify the ability of Fz4m to retain HAFz4 in the ER; 20 cells which stained positive for DsRdER from each of the transfections performed in Figure 4b-g were scored for HA staining. The percentage of DsRdER-positive cells that stained positive for HA is shown.

Article 4

Calcitonin gene-related peptide analogues with aza and indolizidinone amino acid residues reveal conformational requirements for antagonist activity at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor.

Damien Boeglin, Fadi F. Hamdan, Rosa E. Melendez, Jérôme Cluzeau, André Laperrière, **Madeleine Héroux**, Michel Bouvier et William D. Lubell. *Journal of Medicinal Chemistry* 50: 1401 (2007).

Calcitonin Gene-Related Peptide Analogues with Aza and Indolizidinone Amino Acid Residues Reveal Conformational Requirements for Antagonist Activity at the Human Calcitonin Gene-Related Peptide 1 Receptor

Damien Boeglin,[†] Fadi F. Hamdan,[‡] Rosa E. Melendez,[†] Jérôme Cluzeau,[†] Andre Laperriere,[‡] Madeleine Héroux,[‡] Michel Bouvier,^{*,‡} and William D. Lubell^{*,†}

Départements de Chimie et de Biochimie, Université de Montréal, C. P. 6128, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Received November 20, 2006

Calcitonin gene-related peptide antagonists have potential for the treatment and prevention of disease states such as non-insulin-dependent diabetes mellitus, migraine headache, pain, and inflammation. To gain insight into the spatial requirements for CGRP antagonism, three strategies were employed to restrict the conformation of the potent undecapeptide antagonist, [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37}. First, aza-amino acid scanning was performed, and ten aza-peptide analogues were synthesized and examined for biological activity. Second, (3*S*,6*S*,9*S*)-2-oxo-3-amino-indolizidin-2-one amino acid (I^{2aa}) and (2*S*,6*S*,8*S*)-9-oxo-8-amino-indolizidin-9-one amino acid (I^{9aa}) both were introduced at positions 31–32, 32–33, 33–34, and 34–35, regions of the backbone expected to adopt turns. Finally, the conformation of the backbone and side-chain of the C-terminal residue, Phe³⁵-Ala³⁶-Phe³⁷-NH₂, was explored employing (2*S*,4*R*,6*R*,8*S*)-9-oxo-8-amino-4-phenyl-indolizidin-9-one amino acid (4-Ph-I^{9aa}) as a constrained phenylalanine mimic. The structure–activity relationships exhibited by our 26 analogues illustrate conformational requirements important for designing CGRP antagonists and highlight the importance of β -turns centered at Gly³³-Pro³⁴ for potency.

Introduction

Calcitonin gene-related peptide (CGRP,^a Figure 1) is a 37 amino acid peptide produced in two forms (α and β) by an alternative splicing of calcitonin mRNA.¹ Both α and β human CGRP are present in the central and peripheral nervous systems, and although they differ by three amino acids, they produce similar biological activity.^{1–3} CGRP controls many distinct physiological responses including actions on the cardiovascular system and the central nervous system, reproductive organs, skeletal muscles, calcium metabolism, insulin regulation, and gastric secretion.⁴

Two pharmacologically distinct receptors have been proposed to mediate CGRP actions.^{5–7} The best characterized CGRP₁ receptor is composed of the calcitonin receptor-like receptor (CRLR), a seven transmembrane domain protein, and the receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) that determine the pharmacological selectivity of the receptor. Indeed, whereas the CRLR/RAMP₁ complex leads to the CGRP₁ receptor, association of CRLR with either RAMP₂ or RAMP₃ leads to adrenomedullin (AM) receptors.^{8–10} Although less well characterized, a third protein, the receptor component protein (RCP), has been proposed to act as a chaperone protein required for receptor CGRP function.^{11,12} A second pharmacologically distinct CGRP receptor, CGRP₂, has been reported to occur in reproductive organs^{13–17} and to be less sensitive to CGRP_{8–37} antagonism. To this date, the molecular composition of this receptor remains unknown and its existence as a tractable distinct entity remains controversial.

The very potent vasodilatory effects of CGRP originally suggested that CGRP receptors agonists could represent clinically valuable compounds for the treatment of severe hypertension, cerebrovascular vasospasm, and Raynaud's syndrome; however, drawbacks including lack of efficacy and tachycardia have limited their development.^{18–20} CGRP antagonists, however, remain attractive candidates for treating a variety of indications, including, non-insulin-dependent diabetes mellitus, migraine headache, pain, inflammation, and morphine-induced analgesia. For example, a dipeptide analogue (Figure 1) has recently entered into clinical trials for the treatment of migraine.^{21,22}

The conformation of CGRP has been shown by NMR and CD spectroscopy to comprise an amino-terminal disulfide-bonded loop containing residues 2–7 that nucleates an α -helical region between residues 8 and 18 which unfolds, *via* a turn about residues 19–21, into a less ordered sequence that may adopt turn conformations.^{23–28} Initial examination of CGRP by NMR spectroscopy in 1:1 trifluoroethanol:water identified the presence of a turn-like conformation about residues 19–21.²⁵ Examination of CGRP in DMSO by NMR spectroscopy and computational analysis provided further evidence to suggest a γ -turn between the amide carbonyl of Ser¹⁹ and the amide NH of Gly²¹.²⁷ Spectroscopic analysis of the C-terminal [But-Cys¹⁸]h- β -CGRP_{19–37} fragment in DMSO also revealed a turn conformation in the Ser¹⁹-Gly²¹ region as well as indicated a second type I β -turn in the region of Asn³¹-Val³²-Gly³³.²⁸ Although this second turn was not observed in spectroscopic studies of the parent CGRP peptide, a comparison with a C-terminal fragment of CGRP and two different agonists, both constrained by a disulfide ring, one comprised at the C- and the other at the N-terminal fragment, indicated that the Val³²-Gly³³-Ser³⁴ sequence may adopt an inverse γ -turn.^{29,30}

The analysis of abridged CGRP analogues has shown that N-terminal fragments usually activate the receptor³¹ and that the C-terminal fragments act as antagonists of CGRP action.^{32–38}

* Corresponding authors. E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca. lubell@chimie.umontreal.ca.

[†] Département de Chimie.

[‡] Département de Biochimie.

^a Abbreviations: CGRP, calcitonin gene-related peptide; CRLR, calcitonin receptor like receptor; RAMP, receptor activity modifying proteins; AM, adrenomedullin receptor; BTD, bicyclic turn dipeptide; BTC, bis(trichloromethyl)carbonate; TIS, triisopropylsilane; HBTU, *O*-benzotriazole-*N,N,N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; Iaa, indolizidinone amino acid.

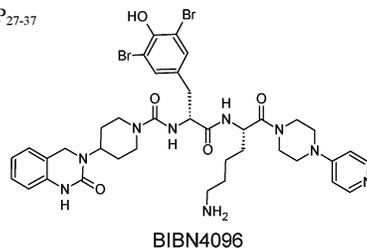
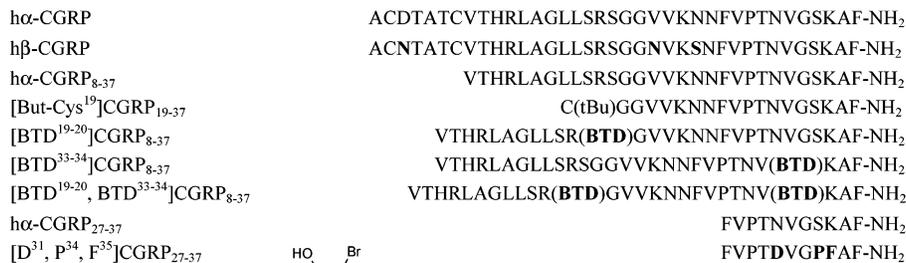


Figure 1. Structures of h α , β -CGRP, peptidic and nonpeptidic CGRP antagonists.

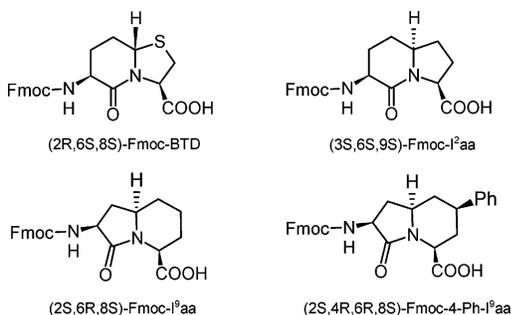


Figure 2. Representative indolizidinone amino acids.

In particular, CGRP₂₇₋₃₇ has been shown to be the shortest C-terminal peptide with a natural sequence having significant antagonist activity. Extensive structure-activity relationship studies of this peptide led to the discovery of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇, an antagonist with nanomolar affinity at the hCGRP₁ receptor, representing a 100-fold increased affinity compared to the unmodified CGRP segment.³⁹⁻⁴¹ Additionally, removal of its first two N-terminal residues associated with the substitution of three residues at position 31, 34, and 35 did not dramatically alter receptor binding and has furnished [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₉₋₃₇, an antagonist displaying only a 5-fold decrease of binding affinity compared with CGRP₂₇₋₃₇.⁴² Examination of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇ and related analogues by CD spectroscopy revealed that increases in ordered structure correlated with high binding affinity and suggested that replacement of the original Ser³⁴ by proline reinforced a turn already present in the unmodified segment.⁴² Studies of analogues of CGRP₂₇₋₃₇ indicated that Thr³⁰, Val³², and Phe³⁷ also play critical roles for antagonist potency on hCGRP₁, and computational and NMR spectroscopic studies suggested the participation of Thr³⁰ in a turn conformation.⁴² Two alternative turn conformations have also been proposed to be important for antagonist activity of C-terminus fragments: a possible γ -turn around Pro³⁴ in [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇ and a left-handed helical turn from V³² to A³⁶ in [D³¹,A³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇. More recently, the introduction of the turn inducing thiaindolizidinone amino acid (BTD, Figure 2) at positions 19, 20 and 33, 34 of the antagonist h α -CGRP₈₋₃₇ produced constrained analogues that exhibited similar antagonist activity ($pA_2 = 6.0$ to 6.2) as the parent peptide (pA_2 (CGRP₂₇₋₃₇) = 6.0).^{17,43} This observation has led to a suggestion that the active conformer possesses two β -bends at positions 18-21 and 32-35.

Exploring further the conformational requirements for the activity of peptide based CGRP antagonists, we have employed three strategies for restraining the geometry of the potent undecapeptide [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇. Initially, aza-amino acid scanning of the C-terminal peptide, i.e., sequential replacement of amino acid residues in the peptide sequence by their aza-amino acid counterparts, was performed by the synthesis of five aza-analogues of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇ (antagonist **1**) and five aza-analogues of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₉₋₃₇ (antagonist **2**). This approach was taken to probe the existence, location, and importance of turn structures in antagonists **1** and **2**, because aza-peptides, peptide analogues in which the α -carbon of one or more of the amino acid residues is replaced with a nitrogen atom, retain normal side-chain functions and exhibit propensity for adopting the central positions of a β -turn conformation.⁴⁴⁻⁴⁷ Moreover, aza-peptides of peptides **1** and **2** were examined because of their potential to increase resistance to proteases and provide mimics with longer duration of action relative to the natural peptide.⁴⁸⁻⁵³

In the second phase of our study, indolizidin-2- and -9-one *N*-(Fmoc)amino acids (Fmoc-I²aa and Fmoc-I⁹aa) were employed to induce restricted turn conformations in the backbone at positions 31-32, 32-33, 33-34, and 34-35, to characterize the geometry responsible for activity. X-ray structural analyses of *N*-(Boc)amino indolizidin-2- and -9-one methyl esters (Boc-I²aa-OMe and Boc-I⁹aa-OMe)⁵⁴ have indicated that the central dihedral angles constrained within the heterocycle were similar to the ideal values for the $i + 1$ and $i + 2$ residues of a type II' β -turn. By NMR spectroscopy and computational analysis of model peptides, I²aa has been shown to adopt the $i/i + 1$ positions as well as the $i + 1/i + 2$ positions of a β -turn and the $i/i + 1$ positions of a γ -turn.^{55,56} Similar preferences for both the $i/i + 1$ positions and the $i + 1/i + 2$ positions of β -turn conformations have been previously observed when the thiaindolizidinone amino acid (BTD, Figure 3) was introduced respectively into cyclic hexapeptide mimics of tendamistat⁵⁷ and into the antibiotic cyclic peptide gramicidin S.⁵⁸ The synthesis of peptides respectively possessing I²aa and I⁹aa residues was intended to identify the region and backbone dihedral angle geometry of an active turn.

In the final strategy for constraining peptides **1** and **2**, the importance of the backbone and side-chain geometry of the aromatic residues in the C-terminal peptide was explored by the use of (2S,4R,6R,8S)-4-phenyl-indolizidin-9-one *N*-(Fmoc)-amino acid (Fmoc-4-Ph-I⁹aa) as a constrained Phe derivative.

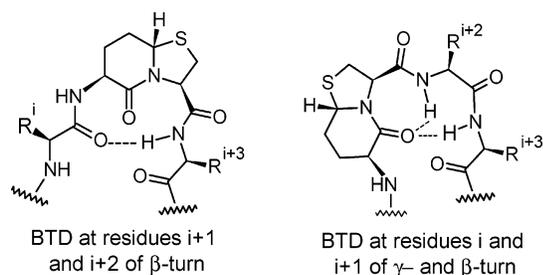


Figure 3. Positioning of BTD in peptide turns.

Introduction of 4-Ph- I^9 aa at positions 34–35 and 36–37 was used to explore the possibility of a turn region with a specifically oriented aromatic ring for the Pro-Phe and Ala-Phe regions. In summary, this application of aza-peptides and peptides constrained with different indolizidinone amino acids was focused on defining the significance of turn geometry for peptide activity and furnishing leads for the design of more effective mimics.

Results

Chemistry. Aza-peptides. Aza-Phe²⁷ (**8**), aza-Pro³⁴ (**5**), and aza-Phe³⁵ (**6** and **11**) peptide analogues were prepared as previously reported by using *N*-(Boc)-aza¹-dipeptide building blocks. The respective *N*-Boc-aza¹-dipeptides were first synthesized in solution and subsequently incorporated into aza-peptides **26**–**29** by using a Boc protection strategy on oxime resin.^{59,60} After cleavage of the peptide from the resin with saturated NH_3 in MeOH:DCM and removal of the side chain protecting groups [Thr(OBn) and Asp(OBn)] by hydrogenolysis, the Boc group of the final peptide was removed using 25% TFA in DCM, and aza-peptides **5**, **6**, **8**, and **11** were purified by RP-HPLC to furnish product suitable for biological analysis in 10–20% yields based on initial loading.

Aza-Asp³¹ (**3** and **9**) and aza-Ala³⁶ (**7** and **12**) analogues were synthesized on acid-labile Rink resin⁶¹ as previously reported by using Fmoc-aza-amino acid chloride building blocks;⁶² aza-Gly³³ (**4** and **10**) was introduced by way of its 1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-one.⁶³ Standard Fmoc/*t*Bu protocols with Fmoc amino acids and HBTU as coupling agent were used to elongate the resin-bound peptide.⁶⁴ After acylation with the aza-amino acid residue, the subsequent Fmoc amino acid was coupled by using BTC as coupling agent,⁶⁵ and peptide synthesis was continued. Attempts failed to acylate the aza-Asp(OtBu) residue on the resin-bound peptide using Fmoc-Thr(OtBu)-OH and a number of activation methods, such that it was introduced as its oxazolidine carboxylate analogue. After simultaneous cleavage of the aza-peptide from the support and deprotection of side chain protecting groups with a TFA/TIS/ H_2O (95/2.5/2.5, v/v/v) solution, the aza-peptides were isolated by precipitation with Et_2O , dissolved in a 1:1 acetonitrile/ H_2O solution, and lyophilized to white foams that were directly analyzed by RP-HPLC to assess purity. Samples requiring additional purification were isolated by preparative RP-HPLC.

Chemistry. Indolizidinone Peptides. The rigid dipeptide surrogates I^2 aa, I^9 aa, and 4-Ph- I^9 aa were synthesized according to literature procedures that delivered the Boc-protected analogues.^{54,66,67} Subsequent *N*-deprotection and conversion to the Fmoc-amino acid was achieved as described for I^2 aa in the Experimental Section. Standard peptide chemistry using an Fmoc-protection strategy and the respective indolizidinone *N*-(Fmoc)amino acid (Fmoc- I^2 aa, Fmoc- I^9 aa, and Fmoc-4-Ph- I^9 aa) was performed on BHA resin modified with a Rink linker by way of an amino caproic acid spacer. After treatment with piperidine to remove the terminal Fmoc protection, the final

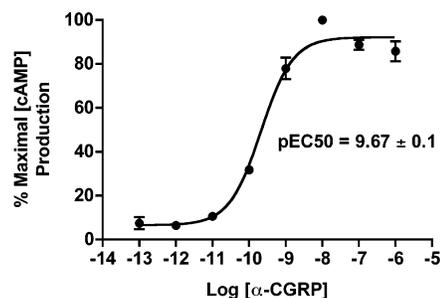


Figure 4. Dose–response curve of α -CGRP-promoted cAMP production. HEK293 stably expressing CRLR were challenged with increasing concentrations of α -CGRP, and cAMP levels were measured as described in the Experimental Section. Data are means \pm SEM of three independent experiments. $p\text{EC}_{50}$ is calculated from nonlinear regression fitting using GraphPad Prism 4.

peptides were treated with neat TFA for 45 min to cleave the resin and to deprotect amino acid side chains. The resin was washed twice with TFA, and the TFA layers were combined and treated with excess Et_2O to precipitate peptides. The peptides were removed by centrifugation, and the solution was evaporated to an oil, that was precipitated again with ether. The combined white solids were dried under vacuum, dissolved in 50% water/50% acetonitrile, and purified on semipreparative HPLC/MSQ using an Alltech C18 column (25 cm \times 22 mm), a 20 mL/min flow rate, and a gradient of water:acetonitrile containing 0.1% of TFA. Purification furnished peptides in 23% average overall yields.

Biological Examinations. Inhibition of Agonist-Promoted cAMP Production by CGRP(27–37) Analogues. To assess the ability of various CGRP_{27–37} peptide analogues to inhibit agonist-promoted cAMP production by the CGRP₁ receptor, we used a HEK293 cell line that stably expresses human CRLR.⁷⁰ As shown in Figure 4, treatment of these cells with α -CGRP resulted in a dose-dependent accumulation of cAMP with an EC_{50} of ~ 0.2 nM, which is similar to what was previously reported for the CGRP₁ receptor.⁶⁹ This indicated that the CRLR-HEK293 cells used herein contain sufficient endogenous RAMP-1 and RCP proteins for the generation of a functional CGRP₁ receptor. Therefore, this cell line was further used to test the effect of peptide analogues based on the CGRP₁ receptor antagonist $[\text{D}^{31}, \text{P}^{34}, \text{F}^{35}]\text{CGRP}_{27–37}$ on α -CGRP-promoted cAMP production by CGRP₁. The inhibition potency and efficacy of individual peptide analogues are summarized in Table 2. The potency is expressed as $p\text{IC}_{50}$ whereas the efficacy is presented as % inhibition of the cAMP production promoted by 0.5 nM α -CGRP.

Deletion of amino acids 27 and 28 of $[\text{D}^{31}, \text{P}^{34}, \text{F}^{35}]\text{CGRP}_{27–37}$ did not affect its potency or efficacy for inhibiting cAMP production, indicating that amino acids 27 and 28 may not be essential for the antagonistic activity of the peptide. On the other hand, aza-amino acid scanning of the shorter CGRP_{29–37} peptide resulted in total loss of cAMP inhibition when the respective residues (Asp³¹, Gly³³, Phe³⁵, and Ala³⁶) were replaced by an aza-amino acid, and a ~ 6 fold reduction in potency in the case of Pro.³⁴ Aza-peptide analogues exhibited better potency in the longer peptides. For example, replacement of Phe³⁵ and Ala³⁶ of $[\text{D}^{31}, \text{P}^{34}, \text{F}^{35}]\text{CGRP}_{27–37}$ resulted in only a 5–8-fold reduction in potency instead of promoting complete loss of activity in $[\text{D}^{31}, \text{P}^{34}, \text{F}^{35}]\text{CGRP}_{29–37}$. Aza-residues at Phe²⁷ and Asp³¹ did not significantly alter the potency nor efficacy relative to the parent peptide. Moreover, replacement of Gly³³ by its aza-amino acid counterpart resulted in an approximately 10-fold increase in potency.

Table 1. Analytical Data for the Peptide, Aza-peptide, and Azabicycloalkane-Containing Peptide Analogues Tested in This Study

no.	peptide	structure	HPLC $t_{R,1}$, min (system 1)	HPLC $t_{R,2}$, min (system 2)	M + 1 (calcd)	mass spectral analysis (M + 1)	purity (%) at 214 nm
1 ^a	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	18.4	22.7	1195.6	1196.0	>98
2 ^a	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	15.1	21.5	949.5	949.5	>99
3 ^b	[azaD ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTazaDVGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	14.2	26.2	950.5	950.5	86
4 ^b	[D ³¹ ,azaG ³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVazaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	15.8	24.9	950.5	950.4	90
5 ^c	[D ³¹ ,azaP ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGazaPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	—	—	950.5	950.5	88
6 ^c	[D ³¹ ,P ³⁴ ,azaF ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGazaF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	—	—	950.5	950.5	91
7 ^b	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,azaA ³⁶]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ azaAF-NH ₂	16.3	25.2	950.5	950.4	96
8 ^c	[azaF ²⁷ ,D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	azaFVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	—	—	1196.6	1196.3	>99
9 ^b	[azaD ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTazaDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	16.3	27.8	1196.6	1196.6	86
10 ^b	[D ³¹ ,azaG ³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVazaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	16.1	26.8	1196.6	1196.6	95
11 ^c	[D ³¹ ,P ³⁴ ,azaF ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGazaF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	—	—	1196.6	1196.6	92
12 ^b	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,azaA]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ azaAF-NH ₂	17.5	27.4	1196.6	1196.5	95
13 ^a	[I ² aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTI ² aaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	14.5	20.6	915.5	915.7	>99
14 ^a	[I ⁹ aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTI ⁹ aaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	15.0	20.8	915.5	915.7	>98
15 ^a	[D ³¹ ,I ² aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGI ² aaAF-NH ₂	8.2	17.7	885.4	885.3	91
16 ^a	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGI ⁹ aaAF-NH ₂	9.4	17.8/18.1	885.4	885.3	60/30
17 ^a	[I ² aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTI ² aaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	17.8	22.4	1161.7	1161.2	86
18 ^a	[I ⁹ aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTI ⁹ aaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	18.6	22.5	1161.7	1162.0	87
19 ^b	[D ³¹ ,I ² aa ³²⁻³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDI ² aaPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	16.3	26.3	1219.6	1219.6	>99
20 ^b	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³²⁻³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDI ⁹ aaPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	16.9	26.8	1219.6	1219.6	>99
21 ^b	[D ³¹ ,I ² aa ³³⁻³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVI ² aaAF-NH ₂	18.2	28.6	1221.6	1221.7	>99
22 ^b	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³³⁻³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVI ⁹ aaAF-NH ₂	17.4	28.3	1221.6	1221.7	>99
23 ^a	[D ³¹ ,I ² aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGI ² aaAF-NH ₂	12.6	19.9	1131.6	1131.8	91
24 ^a	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGI ⁹ aaAF-NH ₂	13.6	20.1	1131.6	1131.8	86
25 ^{a,d}	[D ³¹ ,Xaa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGXaaAF-NH ₂	16.6	21.7	961.5	961.7	>99
26 ^{a,d}	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,Xaa ³⁶⁻³⁷]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ Xaa-NH ₂	17.0	22.5	987.5	987.7	>99
27 ^{a,d}	[D ³¹ ,Xaa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGXaaAF-NH ₂	20.1	23.1	1207.6	1207.4	>99
28 ^{a,d}	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,Xaa ³⁶⁻³⁷]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ Xaa-NH ₂	21.0	23.8	1233.6	1233.7	92

Analytical HPLC analyses were performed on an TARGA column from Higgins Analytical, Inc (4.6 × 250 mm, 5 μm, C₁₈) with a flow rate of 1.5 mL/min using water (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA) (system 1) eluents from 80/20 to 50/50 in 30 min and 50/50 to 10/90 in 5 min and water (0.1% TFA)/MeOH (0.1% TFA) (system 2) from 80/20 to 20/80 in 20 min, 20/80 to 10/90 in 5 min, using a 40 min linear gradient from water (0.1% TFA) to CH₃CN (0.1% TFA) (system 1) or MeOH (0.1% TFA) (system 2). ^a See ref 59 for analytical datas. ^d Xaa = 4-Ph-I⁹aa. ^e Two signals (2:1 ratio) corresponding to the same mass were observed, which may correspond to either a conformational or a configurational mixture.

Table 2. Antagonist Activities of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇ (**1**) and [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₉₋₃₉ (**2**) and Their Constrained Analogues on hαCGRP-Induced cAMP Accumulation in HEK293 Cells

no.	peptides	structure	pIC ₅₀ ^b	% inhibition ^b	n ^c
1	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	6.15 ± 0.18	68 ± 4	4
2	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	6.11 ± 0.18	81 ± 7	4
3	[azaD ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTazaDVGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	N.A. ^a	N.A.	3
4	[D ³¹ ,azaG ³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVazaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
5	[D ³¹ ,azaP ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGazaPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	5.35 ± 0.16	68 ± 8	3
6	[D ³¹ ,P ³⁴ ,azaF ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGazaF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
7	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,azaA ³⁶]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ azaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
8	[azaF ²⁷ ,D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	azaFVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	6.23 ± 0.34	69 ± 25	3
9	[azaD ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTazaDVGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	6.42 ± 0.30	59 ± 3	3
10	[D ³¹ ,azaG ³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVazaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	7.17 ± 0.17	70 ± 6	3
11	[D ³¹ ,P ³⁴ ,azaF ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGazaF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	5.24 ± 0.26	69 ± 5	3
12	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,azaA ³⁶]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ azaAF-NH ₂	5.45 ± 0.38	51 ± 5	3
13	[I ² aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTI ² aaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
14	[I ⁹ aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTI ⁹ aaGPF ₂₉₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
15	[D ³¹ ,I ² aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGI ² aaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
16	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGI ⁹ aaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
17	[I ² aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTI ² aaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
18	[I ⁹ aa ³¹⁻³² ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTI ⁹ aaGPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
19	[D ³¹ ,I ² aa ³²⁻³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDI ² aaPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
20	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³²⁻³³ ,P ³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDI ⁹ aaPF ₂₇₋₃₇ -NH ₂	N.A.	N.A.	3
21	[D ³¹ ,I ² aa ³³⁻³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVI ² aaAF-NH ₂	6.97 ± 0.17	70 ± 6	5
22	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³³⁻³⁴ ,F ³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVI ⁹ aaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
23	[D ³¹ ,I ² aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGI ² aaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
24	[D ³¹ ,I ⁹ aa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGI ⁹ aaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
25	[D ³¹ ,Xaa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGXaaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	3
26	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,Xaa ³⁶⁻³⁷]CGRP ₂₉₋₃₇	PTDVGPF ₂₉₋₃₇ Xaa-NH ₂	N.A.	N.A.	3
27	[D ³¹ ,Xaa ³⁴⁻³⁵]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGXaaAF-NH ₂	N.A.	N.A.	2
28	[D ³¹ ,P ³⁴ ,F ³⁵ ,Xaa ³⁶⁻³⁷]CGRP ₂₇₋₃₇	FVPTDVGPF ₂₇₋₃₇ Xaa-NH ₂	N.A.	N.A.	3

^a N.A., not applicable: no inhibition was detected with peptide concentrations up to 100 μM. ^b Data are represented as mean ± SEM from at least three independent experiments. ^c Number of experiments.

The difference between the short and long CGRP analogue was particularly spectacular when considering the replacement of Gly³³ that led to a complete loss of potency in [D³¹,P³⁴,F³⁵]-

CGRP₂₉₋₃₇ (**4**) but promoted a 10-fold increase in potency when introduced into [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP₂₇₋₃₇ (**10**). This indicates that the short and long analogues do not share identical binding

Table 3. Backbone Torsion Angles Observed in Various Ideal β -Turn and γ -Turn Types, in Dipeptide Surrogates I²aa and I⁹aa, and in Aza-amino Acid-Induced Turns

amino acid or dipeptide surrogate		φ_{i+1}	ψ_{i+1}	φ_{i+2}	ψ_{i+2}
—	ideal β I turn	-60	-30	-90	0
—	ideal β I turn	60	30	90	0
—	ideal β II turn	-60	120	80	0
—	ideal β II turn	60	-120	-80	0
—	ideal β III turn	-60	-30	-60	-30
—	ideal β III turn	60	30	60	30
—	ideal β IV turn	-61	10	-53	17
—	ideal β V turn	-80	80	-80	80
—	ideal β V turn	80	-80	80	-80
—	ideal β VIa turn	-60	120	-90	0
—	ideal β VIb turn	-120	120	-60	0
—	ideal β VIII turn	-60	-30	-120	120
—	classic γ turn	75	-64	—	—
—	inverse γ turn	-79	69	—	—
I ² aa ($i + 1/i + 2$)	β II type turn ^a	—	-176	-78	—
I ⁹ aa ($I + 1/i + 2$)	β II type turn ^a	—	-141	-34	—
Aza-aa ($i + 1$)	β I type turn ^b	-74	-23	-102	12
	β II type turn ^b	59	-153	-90	12
Aza-aa ($i + 2$)	β II type turn ^b	-60	130	71	21

^a Data obtained from X-ray analysis of Boc-I²aa-OMe and Boc-I⁹aa-OMe, see ref 51. ^b Data obtained from computational analysis of Ac-AzaGly/Ala-L-Ala-NHMe and Ac-L-Ala-AzaGly/Ala-NHMe, see ref 74.

modes with the receptor and suggests that the two peptides need to be considered independently for the rational design of more potent/efficacious ligands.

In the second part of this study, the effects of substituting indolizidin-2- and -9-one *N*-(Fmoc)-amino acids (Fmoc-I²aa and Fmoc-I⁹aa) at positions 31–32, 32–33, 33–34, and 34–35 of CGRP_{27–37} and CGRP_{29–37} were investigated. For both CGRP_{27–37} and CGRP_{29–37}, the introduction of I⁹aa at positions 31–32, 32–33, 33–34, and 34–35 resulted in a failure to inhibit α -CGRP-promoted cAMP production. Similarly, most of the I²aa analogues were inactive, such as those with I²aa at positions 31–32, 32–33, and 34–35 of both CGRP_{27–37} and CGRP_{29–37} peptides. Only in the case of substitution of I²aa at positions 33–34 of CGRP_{27–37} was activity found, and a \sim 7 fold increase in potency was observed for inhibition of α -CGRP-promoted cAMP production.

Finally, substitutions of 4-Ph-I⁹aa at positions 34–35 and 36–37 of CGRP_{27–37} and CGRP_{29–37} resulted in peptide analogues that failed to inhibit cAMP production by the CGRP₁ receptor. Treatment of the CRLR-HEK293 cells with CGRP_{27–37} analogues (up to 1 μ M) in absence of α -CGRP did not result in significant production of cAMP (data not shown), indicating that none showed partial agonistic activity toward CGRP₁.

Discussion

The introduction of aza-amino acids into a peptide may restrict peptide geometry by inducing turn conformations as a result of electronic interactions including dipole–dipole repulsion and resonance stabilization.^{72,73} Indolizidinone dipeptides, for their part, create structural constraints by annulation and steric interactions that also favor turn geometry. Considering their different modes of action, the aza-scan and indolizidinone-scan were expected to serve as complementary methods for identifying the bioactive turn geometry of the active peptides. Biological activity exhibited by aza-Gly³³ (**10**) and I²aa^{33–34} (**21**) analogues of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} (**1**) showing respectively 10- and 7-fold increased antagonism potency, both with similar efficacy compared to their parent peptide (**1**), confirmed the importance of a turn conformation for antagonist activity at this position. In light of crystallographic and computational data of

aza- and indolizidinone amino acids (Table 3), we can speculate that a type II' beta-turn with Gly³³-Pro³⁴ at the $i + 1$ and $i + 2$ positions may likely be the active antagonist conformation in the parent peptide.

In contrast to the enhanced activity observed in I²aa-analogue **21**, use of I⁹aa amino acid as a Gly³³-Pro³⁴ surrogate in [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} (**1**) did not produce a compound with significant activity. Although such sensitivity to the change in heterocycle may suggest that a precise set of backbone torsion angles in the turn is a prerequisite for the biologically active conformer of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} (**1**), different steric effects of the two ring systems may also have differentially affected binding. Similarly, although the introduction of I²aa at positions other than 33–34 and the use of other indolizidinone amino acids (I⁹aa and 4-Ph-I⁹aa) were not well tolerated by the CGRP₁ receptor, these results do not necessarily refute the presence of turns at these positions in the receptor-bound conformation of the parent peptide, because the steric bulk of the Iaa residues as well as the removal of key side chains may have interfered with binding in such cases. Interestingly, the aza-amino acid scan did produce other active compounds (aza-peptides **5**, **8**, **9**, **11**, and **12**) that displayed either equal or moderately lower potency than the parent peptide. This indicates that the introduced constraints did not prevent the analogues from adopting active conformers that may result from the presence and orientation of the amino acid side chains. Finally, the striking difference of the activities of the aza-Gly³³ analogues of the longer and shorter peptide antagonists **1** and **2** may indicate that the two peptides bind the receptor in a different manner and as a consequence information gained from the scanning of the shorter peptide cannot be extrapolated to obtain information on the binding modalities of the longer peptides.

As mentioned, spectroscopic analyses of related C-terminal analogues have suggested a turn geometry about the residues from positions 31 to 36, including a type I β -turn in the region of Asn³¹-Val³²-Gly³³,²⁸ a possible γ -turn around Pro³⁴ and a left-handed helical turn from V³² to A³⁶.^{42,71} Consistent with this notion, insertion of the thiaindolizidinone BTD at positions 33, 34 of the antagonist h α -CGRP_{8–37} did not affect antagonist activity, indicative of the presence of a type II' turn centered at this position.^{17,43} Recently, computational analysis, NMR spectroscopy, and the insertion of turn-inducing amino acid surrogates into [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} have suggested that Pro²⁹ and Thr³⁰ exist in a type I β -turn conformation and that a hydrophobic residue at position 29 enhances receptor affinity.^{42,71} The presence of multiple turn conformations has, furthermore, led to the hypothesis of a polyproline-like structure for [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37}.⁷¹ The presence of another turn located lower in the sequence and the possibility of a polyproline conformation are not, however, supported by our study involving the systematic use of aza- and indolizidinone amino acids. Support for a turn conformation was obtained for only the type II' beta-turn with Gly³³-Pro³⁴ at the $i + 1$ and $i + 2$ positions, as the active antagonist conformation in the parent peptide.

Conclusion

A better insight into the structural requirements for antagonist activity at the CGRP₁ receptor of the potent antagonist undecapeptide [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} has been obtained by the use of aza-amino acid and indolizidinone dipeptide surrogates for identifying turn secondary structures responsible for peptide activity. The importance of a type II' beta-turn centered at Gly³³-Pro³⁴ has been illustrated by the respective 10- and 7-fold increase antagonism potency of the aza-Gly³³ (**10**) and I²aa^{33–34}

(21) analogues of [D³¹,P³⁴,F³⁵]CGRP_{27–37} (**1**). In addition, a difference of receptor binding modes has been indicated by the contrast in potency of aza-Gly³³ analogues of **1** and **2**. The application of complimentary organic chemistry tools for conformational constraint such as aza-amino acids and indolizidinone dipeptide surrogates has provided two new leads for the development of calcitonin gene-related peptide antagonists as well as insight into their active receptor bound conformation. Moreover, the improved metabolic stability and longer duration of action observed previously with aza- and indolizidinone amino acid analogues suggest that the aza-Gly³³ and I^{2aa}^{33,34} analogues **10** and **21** offer interesting potential for developing more active antagonist peptide mimics with improved pharmacological profiles.

Experimental Section

According to our reported method, (3*S*,6*S*,9*S*)-indolizidin-2-one *N*-(Boc)amino acid (Boc-I^{2aa}) was prepared from L-glutamic acid in 23% overall yield, and (2*S*,6*R*,8*S*)-indolizidin-9-one *N*-(Boc)-amino acid (Boc-I^{9aa}) and (2*S*,4*R*,6*R*,8*S*)-4-phenyl-indolizidin-9-one *N*-(Boc)amino acid (Boc-4-Ph-I^{9aa}) were prepared from L-aspartic acid in 28% and 8% respective overall yield.^{66,67} Subsequent conversion to their *N*-Fmoc amino acid counterparts was performed as described below. Solvents (DMF, CH₂Cl₂, and Et₂O) were dried using a GlassContour solvent dispensing system. *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) was successively distilled from ninhydrin, and CaH₂ and was kept under argon atmosphere. Solid-phase synthesis was performed in SPE tubes (3 or 6 mL) using vortex agitation.

(3*S*,6*S*,9*S*)-2-Oxo-3-(*N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*,6*S*,9*S*)-Fmoc-I^{2aa}). A solution of (3*S*,6*S*,9*S*)-*N*-Boc-I^{2aa} (2 g, 6.7 mmol, prepared according to ref 54) in 50 mL of EtOAc was treated with dry HCl gas bubbles at room temperature until TLC analysis (eluent 5% AcOH in EtOAc) showed complete disappearance of the starting material (*R*_f = 0.36). The volatiles were removed *in vacuo*, and the remaining salt was collected and used without further purification. A solution of (3*S*,6*S*,9*S*)-I^{2aa} hydrochloride (120 mg, 0.51 mmol) in 10 mL of water was next treated with 84 mg (1 mmol) of NaHCO₃, followed by a solution of succinimidyl 9-fluorenylmethyl carbonate (171 mg, 0.51 mmol) in 10 mL of acetone. The reaction was monitored by TLC (eluent 5% AcOH in EtOAc) until complete consumption of the starting amine was observed. Citric acid was added to the reaction mixture, which was subsequently extracted with EtOAc (2 × 25 mL). The organic layers were combined, washed with saturated NaCl, and evaporated to a residue that was purified by column chromatography using 2% AcOH in EtOAc as eluent. The fractions containing the reaction product were combined and evaporated to give 175 mg (82%) of Fmoc-I^{2aa}: [α]_D²⁰ -26.2° (*c* 1.16, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.58–1.69 (m, 3 H), 2.00–2.24 (m, 4 H), 2.41 (m, 1 H), 3.63 (br s, 1 H), 4.16 (q, 2 H, *J* = 7.1), 4.27 (m, 2 H), 4.48 (d, 1 H, *J* = 8), 5.99 (d, 1 H, *J* = 6.2), 7.04 (br s, 1 H), 7.23 (t, 2 H, *J* = 7), 7.31 (t, 2 H, *J* = 7), 7.54 (t, 2 H, *J* = 6.5), 7.68 (d, 2 H, *J* = 7); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 26.5, 26.9, 28.6, 32.0, 47.1, 50.3, 57.1, 58.8, 60.4, 67.1, 119.9, 125.1, 127.0, 127.6, 141.2, 143.7, 143.9, 156.2, 170.3, 173.4; HRMS calcd for C₂₄H₂₄N₂O₅Na (MNa⁺): 443.1583, found: 443.1581.

(2*S*,4*R*,6*R*,8*S*)-4-Phenyl-indolizidin-9-one *N*-(Fmoc)amino Acid (Fmoc-4-Ph-I^{9aa}). (2*S*,4*R*,6*R*,8*S*)-9-Oxo-8-(*N*-(Boc)-amino)-4-phenyl-indolizidin-9-one amino acid (400 mg, 1.07 mmol prepared according to ref 67) was dissolved in a 1:1 solution of TFA/DCM and stirred for 2 h. The volatiles were evaporated, and the residue was dissolved in and evaporated from toluene twice. The amino acid was treated with DIEA (0.74 mL, 400 mol %) and Fmoc-OSu (720 mg, 200 mol %) in dioxane (10 mL) for 16 h. The solution was evaporated to a residue that was partitioned between CHCl₃ (50 mL) and 10% citric acid solution (50 mL). The phases were separated, and brine (25 mL) was added to the aqueous phase, which was extracted with CHCl₃ (4 × 25 mL). The combined organic layer

was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by flash chromatography using CHCl₃/MeOH/AcOH (94/5/1) as eluent to provided (2*S*,4*R*,6*R*,8*S*)-9-oxo-8-(*N*-(Fmoc)-amino)-4-phenyl-indolizidin-9-one amino acid (330 mg, 63%). ¹H NMR (CHCl₃) δ 7.67 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.24–7.18 (m, 4H), 7.13 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.06 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 5.61 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 4.91 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 4.30 (m, 2H), 4.14 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz), 3.77 (s, 1H), 2.70 (m, 2H), 2.40 (d, 1H, *J* = 13.3 Hz), 2.02 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz), 1.81 (m, 1H), 1.58 (q, 1H, *J* = 10.7 Hz), 1.58 (q, 1H, *J* = 12.4 Hz); ¹³C NMR (CHCl₃) δ 173.2, 172.5, 156.4, 143.7, 141.3, 128.7, 127.7, 127.0, 126.8, 126.6, 125.1, 119.9, 67.0, 52.7, 52.0, 51.4, 47.0, 39.4, 38.1, 35.1, 33.1; [α]_D²⁰ -14.3° (*c* 0.006, CHCl₃/MeOH: 1/1); MS (ESI) *m/z* 497.3 (M + H⁺).

Peptide Synthesis. Aza-peptides were synthesized according to references 59 and 62. Indolizidinone peptides were synthesized on a 0.16 mmol scale on Rink linker with an amino caproic acid spacer attached to BHA (0.4 mmol/g) resin to obtain C-terminal amides after resin cleavage and deprotection. Side chains of threonine and aspartic acid were respectively protected as *tert*-butyl ether and ester. At the ninth amino acid residue (Pro), the resin was split in two parts. One part (0.08 mmol) was deprotected with piperidine/DMF solution (1/1, v/v) and cleaved from the resin using TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5 v/v/v). The second part (0.08 mmol) was elongated by two more amino acids and cleaved. Peptides were assembled by stepwise addition of *N*-Fmoc amino acids following a typical Fmoc strategy⁶⁴ monitored by colorimetric Kaiser's test.⁶⁸ Natural amino acids (300 mol %) were coupled using HBTU (300 mol %) and DIEA (600 mol %) in DMF for 1 h. Indolizidinone amino acids were subjected twice to the coupling condition (100 mol % and 50 mol %) using HBTU (100 mol % and 50 mol %) and DIEA (200 mol % and 100 mol %). Final Fmoc deprotection was followed by treatment with TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5 v/v/v) for 60 min to cleave the resin and deprotect amino acid side chains. The resin was washed twice with TFA, and the TFA layers were combined, concentrated to 1 mL, treated with excess Et₂O to precipitate peptides that were dissolved in a 1:1 acetonitrile/H₂O solution, and lyophilized to white foams that were purified on semipreparative HPLC/MSQ using an Alltech C18 column (25 cm × 22 mm) with a 20 mL/min flow rate and a gradient of water:acetonitrile containing 0.1% of TFA. Purification was made using semipreparative LC/MS and furnished peptides in 23% average overall yields.

cAMP Measurements. HEK293 cells stably expressing the human CRLR (Hilaret et al., 2001) were detached using PBS containing 5 mM EDTA and then resuspended in PBS containing 0.01% D-glucose and 0.75 mM IBMX (Sigma). The cells were then seeded into cAMP CatchPoint 384 black and clear bottom plates (Molecular Devices) at a density of 5000 cells/well. To determine the EC₅₀ of α-cGRP, the cells were challenged with increasing concentrations of α-cGRP for 15 min at 37 °C. In competition experiments, the cells were first preincubated with the CGRP (27–37) peptide analogues for 15 min at 37 °C and then were stimulated with 0.5 nM of α-cGRP for 15 min at 37 °C. cAMP levels were measured using the CatchPoint fluorescence-based cAMP kit and according to the manufacturer's recommendation (Molecular Devices). At least three independent experiments in triplicate were done for each peptide, and data was analyzed by nonlinear curve-fitting using the software PRISM 4 from GraphPad.

Acknowledgment. This work has been supported by grants from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and Valorisation Recherche Québec (VRQ). The authors thank Dalbir S. Sehkon and Alexandra Furtos for MS analysis. F.H. is a recipient of a postdoctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

References

- (1) Amara, S. G.; Jonas, V.; Rosenfeld, M. G.; Ong, E. S.; Evans, R. M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptides products. *Nature* **1982**, *298*, 240–244.
- (2) Steenberg, P. H.; Hoppener, J. W. M.; Zandberg, J.; Van de Ven, W. J. M.; Jansz, H. S.; Lips, C. J. M. A second calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett.* **1985**, *183*, 403–407.
- (3) Van Rossum, D.; Hanisch, U. K.; Quirion, R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, released peptides and their precursors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, *21*, 649–678.
- (4) Di Angelantonio, S.; Giniatullin, R.; Costa, V.; Sokolova, E.; Nistri, A. Modulation of neuronal nicotinic receptor function by the neuropeptides CGRP and substance P on autonomic nerve cells. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 1061–1073.
- (5) Dennis, T.; Fournier, A.; St Pierre, S.; Quirion, R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence of receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *251*, 718–725.
- (6) Mimeault, M.; Fournier, A.; Dumont, Y.; St Pierre, S.; Quirion, R. Comparative affinities and antagonistic potencies of various human CGRP fragments on CGRP receptors in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *258*, 1084–1090.
- (7) Poyner, D. R.; Sexton, P. M.; Marshall, I.; Smith, D. M.; Quirion, R.; Born, W.; Muff, R.; Fischer, J. A.; Foord, S. M. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 233–246.
- (8) Husmann, K.; Born, W.; Fischer, J. A.; Muff, R. Three receptor-activity-modifying proteins define calcitonin gene-related peptide or adrenomedullin selectivity of the mouse calcitonin-like receptor in COS-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2107–2115.
- (9) Foord, S. M.; Marshall, F. H. RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 184–187.
- (10) Mc Latchie, L. M.; Fraser, N. J.; Main, M. J.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N.; Solari, R.; Lee, M. G.; Foord, S. M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **1998**, *393*, 333–339.
- (11) Evans, B. N.; Rosenblatt, M. I.; Mnayer, L. O.; Oliver, K. R.; Dickerson, I. M. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31438–31443.
- (12) Ma, W.; Chabot, J. G.; Powell, K. J.; Jhamandas, K.; Dickerson, I. M.; Quirion, R. Localization and modulation of calcitonin gene-related peptide-receptor component protein-immunoreactive cells in the rat central and peripheral nervous systems. *Neuroscience* **2003**, *120*, 677–694.
- (13) Yallampalli, C.; Chauhan, M.; Thota, C. S.; Kondapaka, S.; Wimalawansa, S. J. Calcitonin gene-related peptide in pregnancy and its emerging receptor heterogeneity. *Trends Endocr. Metabol.* **2002**, *13*, 263–269.
- (14) Yallampalli, C.; Gangula, P. R. R.; Kondapaka, S.; Fang, L.; Wimalawansa, S. Regulation of calcitonin gene-related peptide receptors in rat uterus during pregnancy, labor and by progesterone. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 1023–1030.
- (15) Dong, Y. L.; Fang, L.; Kondapaka, S.; Gangula, P. R. R.; Wimalawansa, S.; Yallampalli, C. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the modulation of the human myometrial contraction during pregnancy. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 559–565.
- (16) Wisskirchen, F. M.; Burt, R. P.; Marshall, I. Pharmacological characterization of CGRP receptors mediating relaxation of the rat pulmonary artery and inhibition of twitch responses of the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1673–1683.
- (17) Wisskirchen, F. M.; Doyle, P. M.; Gough, S. L.; Harris, C. J.; Marshall, I. Conformational restraints revealing bioactive β -bend structure of h α -CGRP_{8–37} at the CGRP₂ receptor of the rat prostatic vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1163–1170.
- (18) Grewal, M.; Cuevas, J.; Chaudhuri, G.; Nathan, L. Effects of CGRP on vascular resistance in rats: role of sex steroids. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **1999**, *45*, H2063–H2068.
- (19) Moore, M. C.; Lin, D. W.; Colburn, C. A.; Goldstein, R. E.; Neal, D. W.; Cherrington, A. D. Insulin and glucagon-independent effects of CGRP in the conscious dog. *Metab.: Clin. Exp.* **1999**, *48*, 603–610.
- (20) Shen, Y. T.; Mallee, J. J.; Handt, L. K.; Gilbert, D. B.; Lynch, J. J., Jr.; Hargreaves, R. J.; Koblan, K. S.; Gould, R. J.; Kane, S. A. Effect of inhibition of α -CGRP receptors on cardiac and peripheral vascular dynamics in conscious dogs with chronic heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2003**, *42*, 656–661.
- (21) Olesen, J.; Diener, H. C.; Husstedt, I. W.; Goadsby, P. J.; Hall, D.; Meier, U.; Pollentier, S.; Lesko, L. M. BIBN 4096 BS Clinical Proof of concept Study group. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1104–1110.
- (22) Doods, H.; Hallermayer, G.; Dongmei, W.; Entzeroth, M.; Rudolf, K.; Engel, W.; Eberlein, W. Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 420–423.
- (23) Lynch, B.; Kaiser, E. T. Biological properties of two models of calcitonin gene-related peptide with idealized amphiphilic α -helices of different lengths. *Biochemistry* **1988**, *27*, 7600–7607.
- (24) Manning, M. C. Conformation of the alpha form of the CGRP in aqueous solution as determined by circular dichroism spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 388–392.
- (25) Breeze, A. L.; Harvey, T. S.; Bazzo, R.; Campbell, L. D. Solution structure of human calcitonin gene-related peptide by ¹H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Biochemistry* **1991**, *30*, 575–582.
- (26) Hubbard, J. A. M.; Martin, S. B.; Chaplin, L. C.; Bose, C.; Kelly, S. M.; Price, N. C. Solution structures of calcitonin gene-related peptide analogues of CGRP and amylin. *Biochem. J.* **1991**, *275*, 785–788.
- (27) Boulanger, Y.; Khiat, A.; Chen, Y.; Senécal, L.; Tu, Y.; St Pierre, S.; Fournier, A. Structure of human calcitonin gene-related peptide (hCGRP) and of its antagonist hCGRP 8–37 as determined by NMR and molecular modeling. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 206–213.
- (28) Sagoo, J. K.; Bose, C.; Beeley, N. R. A.; Tendler, S. J. B. Structural studies on the [But-Cys18](19–37) fragment of human calcitonin gene-related peptide. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 147–150.
- (29) Hakala, J. M. L.; Vihinen, M. Modelling the structure of calcitonin gene-related peptide. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 1069–1075.
- (30) Hakala, J. M. L.; Lindvall, M.; Koskinen, A. M. Modelling constrained calcitonin gene-related peptide analogues. *Protein Eng.* **1996**, *9*, 143–148.
- (31) Maggi, C.; Rovero, P.; Giuliani, S.; Evangelista, S.; Regoli, D.; Meli, A. Biological activity of N-terminal fragments of calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharm.* **1990**, *179*, 217–219.
- (32) Rovero, P.; Giuliani, S.; Maggi, C. A. CGRP antagonist activity of short C-terminal fragments of human α -CGRP, CGRP(23–37) and CGRP(19–37). *Peptides* **1992**, *13*, 1025–1027.
- (33) Chakder, S.; Rattan, S. [Tyr0]-Calcitonin gene related-peptide 28–37 as a putative antagonist of calcitonin gene related-peptide response on opossum internal anal sphincter smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253*, 200–206.
- (34) Chiba, T.; Yamaguchi, A.; Yamatani, T.; Nakamura, A.; Morishita, T.; Inui, T.; Fukase, M.; Noda, T.; Fujita, T. CGRP receptor antagonist hCGRP (8–37). *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, E331–E335.
- (35) Dennis, T.; Fournier, A.; Cadieux, A.; Pomerleu, F.; Jolicoeur, F. B.; St-Pierre, S.; Quirion, R. hCGRP 8–37 a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing CGRP receptor heterogeneity in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *254*, 123–128.
- (36) Maggi, C. A.; Chiba, T.; Giuliani, S. Human α -calcitonin gene related peptide (8–37) as an antagonist of exogenous and endogenous calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *192*, 85–88.
- (37) Mimeault, M.; Fournier, A.; Dumont, Y.; St Pierre, S.; Quirion, R. Comparative affinities and antagonistic potencies of various human CGRP fragments on CGRP receptors in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *258*, 1084–1090.
- (38) Chakder, S.; Rattan, S. (Y⁰)-CGRP_{28–37} (rat) as a putative antagonist of CGRP responses on opossum internal and sphincter smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253*, 200–206.
- (39) Rist, B.; Entzeroth, M.; Beck-Sickinger, A. G. From micromolar to nanomolar affinity: a systematic approach to identify the binding site of CGRP at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 117–123.
- (40) Maton, P. N.; Prandhan, T.; Zhou, Z. C.; Gradner, K. D.; Jensen, R. T. Activities of CGRP and related peptides at the CGRP receptor. *Peptides* **1990**, *11*, 485–489.
- (41) Rist, B.; Lacroix, J. S.; Entzeroth, M.; Doods, H. N.; Beck-Sickinger, A. G. CGRP_{27–37} analogues with high affinity to the CGRP1 receptor show antagonistic properties in a rat blood flow assay. *Regul. Pept.* **1999**, *79*, 153–158.
- (42) Carpenter, K. A.; Schmidt, R.; Von Mentzer, B.; Haglund, U.; Roberts, E.; Walpole, C. Turn structures in CGRP C-terminal analogues promote stable arrangements of key residue side chains. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8317–8325.
- (43) Wisskirchen, F. M.; Doyle, P. M.; Gough, S. L.; Harris, C. J.; Marshall, I. Bioactive beta-bend structures for the antagonist h α CGRP(8–37) at the CGRP(1) receptor of the rat pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1049–1055.

- (44) Lee, H. J.; Ahn, I. A.; Ro, S.; Choi, K.-H.; Choi, Y. S.; Lee, K. B. Role of azaamino acid residue in beta-turn formation and stability in designed peptide. *J. Pept. Res.* **2000**, *56*, 35–46.
- (45) Lee, H. J.; Choi, K. H.; Ahn, I. A.; Ro, S.; Jang, H. G.; Choi, Y. S.; Lee, K. B. The β -turn preferential solution conformation of a tetrapeptide containing an azaamino acid residue. *J. Mol. Struct.* **2001**, *569*, 43–54.
- (46) Thormann, M.; Hofmann, H. J. Conformational properties of aza-peptides. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, *469*, 63–76.
- (47) Lee, H. J.; Song, J. W.; Choi, Y. S.; Park, H. M.; Lee, K. B. A Theoretical Study of Conformational Properties of N-Methyl Aza-peptide Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11881–11893.
- (48) Hess, H.-J.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. N-[2-Isopropyl-3-(L-aspartyl-L-arginyl)-carbazoyl]-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanine,¹ an Isostere of Bovine Angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 4040–4041.
- (49) Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1972**, *314*, 749.
- (50) (a) Niedrich, H.; Oehme, C. J. *J. Prakt. Chem.* **1972**, *314*, 759. (b) Oehme, P.; Bergmann, J.; Falk, M.; Reich, J. G.; Voigt, W. E.; Niedrich, H.; Pirrwitz, J.; Bersek, C.; Jung, F. *Acta Biol. Med. Ger.* **1972**, *28*, 109. (c) Oehme, P.; Bergmann, J.; Niedrich, H.; Jung, F.; Menzel, G.; Eichstädt, M. Pharmacology of hydrazine-carbonic acids, hydrazine peptides and other hydrazine derivatives. VII. Pharmacologic studies on heterologous eldoisine sequences. *Acta Biol. Med. Ger.* **1970**, *25*, 613–625.
- (51) (a) Han, H.; Yoon, J.; Janda, K. D. Investigations of azapeptides as mimetics of Leu-enkephalin. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 117–120. (b) Dutta, A. S.; Gormley, J. J.; Hayward, C. F.; Morley, J. S.; Shaw, J. S.; Stacey, G. J.; Turnbull, M. T. Enkephalin analogues eliciting analgesia after intravenous injection. *Life Sci.* **1977**, *21*, 559–562. (c) Dutta, A. S.; Gormley, J. J.; Hayward, C. F.; Morley, J. S.; Shaw, J. S.; Stacey, G. J.; Turnbull, M. T. Analgesia following intravenous administration of enkephalin analogues [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.* **1977**, *61*, 481–482.
- (52) (a) Ho, T. L.; Nestor, J. J.; Mc Crae, G. I.; Vickery, B. H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *24*, 79. (b) Dutta, A. S.; Furr, B. J. A.; Giles, M. B.; Valcaccia, B.; Walpole, A. L. Potent agonist and antagonist analogues of luliberin containing an azaglycine residue in position 10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 382–390. (c) Furr, B. J. A. *Aktuel. Onkol.* **1983**, *8*, 243. (d) Dutta, A. S.; Furr, B. J. A.; Giles, M. B.; Valcaccia, B. E. Synthesis and biological activity of highly active alpha-aza analogues of luliberin. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1018–1024. (e) Dutta, A. S.; Furr, B. J. A. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1985**, *20*, 203.
- (53) Zhang, W. J.; Berglund, A.; Kao, J. L. F.; Couty, J. P.; Gershengorn, M. C.; Marshall, J. R. Impact of Azaproline on Amide Cis-Trans Isomerism: Conformational Analyses and NMR Studies of Model Peptides Including TRH Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1221–1235.
- (54) Lombart, H. G.; Lubell, W. D. Rigid Dipeptide Mimetics. Efficient Synthesis of Enantiopure Indolizidinone Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437–9446.
- (55) Lombart, H. G.; Lubell, W. D. Use of azabicycloalkane amino acids to stabilized β -turn conformations in model peptides and gramicidin S. In *Peptides chemistry, structure and biology*; Kaumaya, P. T. P.; Hodges, R. S., Eds.; Escom: Leiden, The Netherlands, 1996; p 695.
- (56) Thouin, E.; Lubell, W. D. Nouveau mimétisme du site actif des protéases aspartiques: Conception, synthèse et caractérisation du cyclo[Asp-P^{aa}-Asp-P^{aa}]. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 1997.
- (57) Etkorn, F. A.; Guo, T.; Lipton, M. A.; Goldberg, S. D.; Bartlett, P. A. Cyclic Hexapeptides and Chimeric Peptides as Mimics of Tendamistat. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412–10425.
- (58) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. Bicyclic turned dipeptide (BTD) as a β -turn mimetic; its design, synthesis and incorporation into bioactive peptides. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577–3592.
- (59) Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Aza-amino acid scan for rapid identification of secondary structure based on the application of N-Boc-Aza¹-dipeptides in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6759–6764.
- (60) DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. The preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295–1300.
- (61) Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787–3790.
- (62) Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-amino acid scanning of secondary structure suited for solid-phase peptide synthesis with Fmoc chemistry and aza-amino acids with heteroatomic side chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 864–878.
- (63) Gilbson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Hölzemann, G.; Kessler, H. Novel Solid-Phase Synthesis of Azapeptides and Azapeptoides via Fmoc-Strategy and Its Application in the Synthesis of RGD-Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388–7394.
- (64) Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. D.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35–42.
- (65) Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C. In situ generation of Fmoc-amino acid chlorides using bis-(trichloromethyl) carbonate and its utilization for difficult couplings in solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 507–517.
- (66) Gosselin, F.; Lubell, W. D. An Olefination Entry for the Synthesis of Enantiopure α,ω -Diamino-dicarboxylates and Azabicyclo[X.Y.0]-alkane Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7463–7471.
- (67) Cluzeau, J.; Lubell, W. D. Conformationally Constrained Dipeptide Surrogates with Aromatic Side-Chains: Synthesis of 4-Aryl Indolizidin-9-one Amino Acids by Conjugate Addition to a Common α,ω -Diaminoazetate Enone Intermediate. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1504–1512.
- (68) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. L. Color test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- (69) Kuwasako, K.; Caoe, Y. N.; Chu, C.-P.; Iwatsubo, S.; Eto, T.; Kitamura, K. Functions of the Cytoplasmic Tails of the Human Receptor Activity-modifying Protein Components of Calcitonin Gene-related Peptide and Adrenomedullin Receptors. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 7205–7213.
- (70) Hilairt, S.; Belanger, C.; Bertrand, J.; Laperriere, A.; Foord, S. M.; Bouvier, M. Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42182–90.
- (71) Lang, M.; De Pol, S.; Baldauf, C.; Hofmann, H.-J.; Reiser, O.; Beck-Sickingler, A. G. Identification of the key residue of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) 27–37 to obtain antagonists with picomolar affinity at the CGRP receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 616–624.
- (72) Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. Theoretical Study of the Structure and Rotational Flexibility of Diacylhydrazines: Implications for the Structure of Nonsteroidal Ecdysone Agonists and Azapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9395–9401.
- (73) Lee, H. J.; Lee, M. H.; Choi, Y. S.; Park, H. M.; Lee, K. B. NBO approach to evaluate origin of rotational barrier of diformylhydrazine. *J. Mol. Struct.* **2003**, *631*, 101.
- (74) Thormann, M.; Hofmann, H. J. Conformational properties of aza-peptides. *J. Mol. Struct.* **1999**, *469*, 63–76.
- (75) André, F.; Boussard, G.; Bayeul, C.; Didierjean, A.; Aubry, M.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 556.

JM061343W