

Université de Montréal

**Étude moléculaire de la formation de complexes
protéiques impliqués dans la signalisation des récepteurs
couplés aux protéines G**

par

Billy Breton

Département de Biochimie,

Faculté de Médecine

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

Mai, 2010

© Billy Breton, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude moléculaire de la formation de complexes protéiques impliqués
dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G**

présentée par :
Billy Breton

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Mader, président-rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Marc Servant, membre du jury
Jean-Philippe Pin, examinateur externe
Audrey Claing, représentant du doyen de la FES

Résumé

La communication cellulaire est un phénomène important pour le maintien de l'homéostasie des cellules. Au cours des dernières années, cette sphère de recherche sur la signalisation cellulaire a connue des avancées importantes au niveau de l'identification des acteurs principaux impliqués dans la reconnaissance extracellulaire des signaux, ainsi que la compréhension des voies de signalisation engagées par les cellules pour répondre aux facteurs extracellulaires. Malgré ces nouvelles informations, les diverses interrelations moléculaires entre les acteurs ainsi que les voies de signalisation cellulaire, demeurent mal comprises.

Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) permet la mesure d'interactions protéiques et peut être utilisé dans deux configurations, le BRET_{480-YFP} (connu aussi comme le BRET¹) et le BRET_{400-GFP} (connu aussi en tant que BRET²). Suite à l'oxydation de son substrat, la luciférase de *renilla* peut transférer son énergie à une protéine fluorescente, uniquement si elles sont à proximité l'une de l'autre ($\leq 100\text{\AA}$). La combinaison dans un seul essai des BRET_{480-YFP} et BRET_{400-GFP}, a permis de suivre trois paires d'interactions, sur une même population cellulaire. Par contre, l'utilisation de deux substrats pour la réaction de bioluminescence rend impossible la mesure simultanée des différents signaux de BRET, pour ce trois nouvelles configurations de BRET ont été mises au point en utilisant des nouvelles protéines fluorescentes. Ainsi deux des nouvelles couleurs de BRET ayant des émissions résolues, le BRET_{400-BFP} et le BRET_{400mAmetrine} ont pu être combinées pour mesurer l'engagement par un RCPG d'une protéine G, ainsi que l'accumulation du second messager.

La combinaison de ces BRET a également permis de révéler la formation d'un complexe entre le récepteur α_{2A} adrénergique ($\alpha_{2A}\text{AR}$), Gai1, le dimère G $\beta\gamma$ ainsi que la kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK2), suite à l'activation du récepteur. De plus, seule l'entrée de GRK2 semble être en mesure de causer la désensibilisation du $\alpha_{2A}\text{AR}$, en s'intercalant entre Gai1 et G $\beta\gamma$. Par contre, la stabilisation de l'interaction entre $\alpha_{2A}\text{AR}$ et la β -arrestine2 semble nécessiter l'activité kinase de GRK2.

Une autre étude a révélé l'importance de différentes $G\alpha$ pour la mobilisation du calcium, suite à l'activation du récepteur aux opioïdes de type delta (DOR). Suite à la surexpression de $G\alpha$ de la famille $G\alpha_q$, il a été possible de mesurer une influence de ces $G\alpha$ sur la mobilisation du calcium. Toutefois, cette réponse calcique mesurée en présence des $G\alpha_q$ demeure sensible aux prétraitements à la toxine de *Bordetella pertussis*, qui inhibe sélectivement l'activité des $G\alpha_i$. De plus, la co-expression de $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ permet de potentialiser la mobilisation de calcium, démontrant une interrelation entre ces deux familles de protéine $G\alpha$, pour la signalisation du DOR. Afin de démontrer l'interrelation directe, des expériences de BRET ont été réalisées entre différentes $G\alpha$. En plus de montrer la formation de complexes sélectifs entre les $G\alpha$, les expériences de BRET réalisées en parallèle d'analyses de séquences de $G\alpha$, ont également mis à jour un site de sélectivité d'interaction entre les $G\alpha$, l'hélice α_4 . Suite à la transposition de cette hélice α_4 de $G\alpha_{12}$ sur $G\alpha_{i1}$, qui normalement n'interagissent pas, il a été possible de forcer l'interaction entre $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{i1}$, confirmant ainsi que cette hélice α contient l'information permettant une sélectivité d'interaction.

Au cours de cette thèse, il a été possible de générer de nouvelles méthodes de mesure d'interactions protéiques qui permettent de multiplexer différents signaux, ce qui a permis de mettre à jour de nouvelles interactions entre divers effecteurs de la signalisation de RCGP.

Mots-clés : récepteur couplé aux protéines G (RCPG), protéine G hétérotrimérique, kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), β -arrestin, transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET), obelin, mobilisation du calcium, multiplexage, luciférase, protéine fluorescence (FP), biocapteurs, opioïde, adrénergique, vasopressine.

Abstract

Cellular communication is an important phenomenon for the maintenance of cellular homeostasis. Recently, important progress has been made in the cell signalling research field concerning the identification of the major actors and the cellular pathways engaged in response to these extracellular factors. However, in spite of this new information, the interrelationships at the molecular level between the various cellular actors and the different signalling pathways remain badly understood.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) monitors interactions between proteins and can be used in two configurations, the BRET_{480-YFP} (also known as BRET¹) and the BRET_{400-GFP} (also known as BRET²). Following oxidation of its substrate, *renilla* luciferase transfers its energy to a fluorescent protein, only if they are in close proximity ($\leq 100\text{\AA}$). By combining the BRET_{480-YFP} and BRET_{400-GFP} in one assay, it is possible to follow three pair-wise interactions in the same cellular population. However, using two bioluminescence reaction substrates limits the possibility of measuring the different BRET signals simultaneously. In order to measure multiple BRET signals simultaneously, three new BRET configurations, based on the BRET_{400-GFP}, were developed using fluorescent proteins with different emission wavelengths. Two of the new BRET colors which have resolved emission wavelengths, the BRET_{400-BFP} and BRET_{400mAmetrine}, were combined for measuring the heterotrimeric G protein engagement by the vasopressin V2 receptor, as well as the accumulation of the second messenger.

Combining these new BRET techniques reveals for the first time the formation of a complex between the α_{2A} adrenergic receptor ($\alpha_{2A}\text{AR}$), G α i1, the G $\beta\gamma$ dimer and G protein-receptor kinase (GRK2) following receptor activation. Moreover, only the entry of GRK2 into the receptor complex is required for the $\alpha_{2A}\text{AR}$ desensitization, by inserting between G α i1 and G $\beta\gamma$. On the other hand, the stabilization of the interaction between $\alpha_{2A}\text{AR}$ and β -arrestin2 requires the kinase activity of GRK2.

Another study revealed the importance of multiple G α subunits for calcium mobilization induced upon activation of the delta opioid receptor (DOR). G α q subfamily

member overexpression altered the DOR-induced calcium mobilization, but this $G\alpha_q$ calcium mobilization remained sensitive to pre-treatment *pertussis* toxin, through selective inhibition of the activity of $G\alpha_i$ members. Moreover, $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$ co-expression potentiated calcium mobilization, suggesting an interrelationship between these two $G\alpha$ families in DOR signaling. This $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$ interrelationship could result from the formation of a complex close to the receptor. In order to test this hypothesis, BRET experiments were performed, with the aim of measuring the presence of complexes between different $G\alpha$. In addition to demonstrating complex formation between $G\alpha$ subunits, the BRET experiments in parallel with sequence analysis, also revealed a selective interaction site between the $G\alpha$, the α_4 helix. By swapping the α_4 helix of $G\alpha_i$ with the α_4 helix of $G\alpha_{12}$, which doesn't normally interact with $G\alpha_{12}$, it was possible to force the interaction between $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_i$ to confirm that this α helix contains information concerning the selectivity of interactions between $G\alpha$ subunits.

During this thesis, new methods were to detect protein interactions and multiplexing these methods allowed the detection of novel interactions between signalling effectors of GPCRs.

Keywords : G protein coupled receptor (GPCR), Heterotrimeric G protein, G protein coupled receptor kinase (GRK), β -arrestin, bioluminescence resonance energy transfer (BRET), fluorescence resonance energy transfer (FRET), obelin, calcium mobilization, multiplexing, luciferase, fluorescent protein (FP), opioid, adrenergic, vasopressin.

Table des matières

Introduction	1
Signalisation cellulaire	1
Famille des récepteurs couplés aux protéines G	2
Généralités	2
Structure	4
Fonctions	6
Dimérisation des RCPG	8
Famille des protéines G hétérotrimériques.....	11
Généralités	11
Sous-unité $G\alpha$	12
Sous-unité $G\beta\gamma$	17
Assemblage du dimère $G\beta\gamma$	20
Modifications lipidiques des protéines G.....	20
Activation et désactivation de la protéine G	22
Interactions entre les RCPG et les protéines G.....	25
Voies de signalisation et interactions croisées (cross-talk)	27
Interactions croisées des voies contrôlant les concentrations cytoplasmiques de calcium	32
Effet de la dimérisation sur les interactions croisées	34
Terminaison de la signalisation et désensibilisation	36
Famille des GRK.....	38
Famille des arrestines.....	40
Récepteurs modèles.....	42
Récepteurs des opioïdes (récepteur delta opioïde).....	42
Récepteurs adrénergiques (récepteur α 2A-adrénergique).....	49
α 2A-adrénergique.....	50
Récepteurs de la vasopressine (récepteur vasopressine de type 2)	51

Transfert d'énergie de résonance non radiative	52
GFP (Green fluorescent protein).....	53
Transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET).....	61
Bioluminescence	63
Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET).....	68
Biocapteurs	71
Biocapteurs BRET de l'AMPC.....	74
Combinaison et Multiplexage des technologies de RET	76
Objectifs de la thèse	81
Résultats	82
Article 1	83
Multiplexing of Multicolour Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays Allows Simultaneous Monitoring of G Protein Engagement and Second Messenger Generation.....	83
Figure 1	109
Figure 2	110
Figure 3	111
Article 2 :.....	112
Combining Resonance Energy Transfer Methods Reveals a Complex Between the α_{2A} - Adrenergic Receptor, $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ and GRK2	112
Figure 1	145
Figure 2	146
Figure 3	147
Figure 4	148
Figure 5	149
Figure 6	150
Résultats supplémentaires	151
Article 3 :.....	161

Interactions Between G α Subunits Regulate G Protein-Coupled Receptor's Signaling Properties,	161
Figure 1	199
Figure 2	200
Figure 3	201
Figure 4	202
Figure 5	203
Résultats supplémentaires	204
Discussion	207
Retour sur les techniques de mesure d'interactions protéiques	207
Développements techniques et implications dans l'élaboration de nouvelles hypothèses de travail.....	210
Améliorations de la Rluc.....	211
Nouvelles générations de BRET	213
Multiplexage des BRET	215
Mesure séquentiel BRET/FRET (SRET).....	220
Biocapteurs et leurs implications dans l'étude des RCPG	222
Nouvelle génération de biocapteurs BRET.....	222
Obelin.....	225
Biocapteurs parfaits??	227
Régulation de l'efficacité de signalisation	229
Dimérisation fonctionnelle des protéines G	233
Dimérisation des protéines G et implication dans la signalisation	242
Structure des interactions entre les GTPases	250
Dimérisation des récepteurs et activation asymétrique.....	261
Conclusions	266
Bibliographie	268
Annexes	I

Liste des articles autres que premier auteur : II

Article 4.....IV
Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2 IV

Article 5.....XVII
Multimerization of Staufen1 in live cells..... XVII

Liste des tableaux

Tableau I : Différents RCPG cristallographiés	6
Tableau II: Exemples clés d'hétérodimères et leurs fonctions	9
Tableau III: Classification des sous-unités α de la protéine G.....	16
Tableau IV: Différents récepteurs opioïdes et leurs ligands	43
Tableau V: Ligands peptiques endogènes des opiacés et leur séquence en acides aminés..	45
Tableau VI: Caractéristiques des différentes GFP dérivées d' <i>Aequorea victoria</i>	57
Tableau VII: Caractéristiques de différentes FP dérivées de la DsRed	60
Tableau VIII: Couples de protéines fluorescentes utilisées pour le FRET	63
Tableau IX: Liste des biocapteurs génétiques FRET	73
Tableau X: Liste des différentes GFP et luciférase utilisées en PCA	76

Liste des figures

Figure 1: Représentation des trois principales sous famille de RCPG.....	4
Figure 2: Structure des RCPG.....	5
Figure 3: Voies de signalisation classiques.....	7
Figure 4: Schéma de dimérisation du récepteur GABA _B	10
Figure 5: Structure des sous-unités G α	12
Figure 6: Structure du dimère G β/γ	17
Figure 7: Structure de G α et G $\beta\gamma$	19
Figure 8: Cycle d'activation / désactivation de G α	23
Figure 9: Fonctions biologiques du calcium.....	30
Figure 10: Structure de GRK2 en interaction avec la protéine G hétérotrimérique.....	39
Figure 11: Structure de β -arrestin1.....	41
Figure 12: DOR et couplage différentiel aux protéines G.....	48
Figure 13: Structure de la GFP native de <i>Aequorea victoria</i>	54
Figure 14: Structure de mCherry.....	59
Figure 15: Réaction d'oxydation de la coelenterazine par la Rluc.....	66
Figure 16: Structure de la Rluc.....	67
Figure 17: Spectres de transfert d'énergie des deux configurations de BRET.....	69
Figure 18: Types de biocapteurs du calcium.....	72
Figure 19: Biocapteur BRET _{400-GFP} de l'AMPc.....	75
Figure 20: Combinaisons de RET et PCA.....	78
Figure 21: Comparaison entre Rluc native et Rluc II.....	212
Figure 22: Spectres des différentes générations de BRET.....	214
Figure 23: Différence entre les deux méthodes de BRET multiplexage.....	217
Figure 24: Spectre de bioluminescence de la YFP vs la GFP10 en présence de coelenterazine-400a.....	218

Figure 25: Séparation des émissions des protéines fluorescentes.....	219
Figure 26: SRET entre RlucII-CFP-YFP	220
Figure 27: Auto-fluorescence des plaques 96	223
Figure 28: Cycle d'activation/inactivation d'ARF6 : rôle possible de GRK2 et β arr-2	232
Figure 29: Modèle d'activation de la PLC- β par DOR.....	238
Figure 30: Effet du domaine RH de GRK2 sur le calcium et l'AMPc produit par DOR ...	240
Figure 31: Interaction entre <i>Gαs</i> et <i>Gα12</i> et effet sur la signalisation d'AMPc	245
Figure 32: Interactions entre des sous-unités <i>Gγ</i>	248
Figure 33: Complexes entre <i>Gαq</i> -p63RhoGEF-RhoA.....	249
Figure 34: Interaction entre <i>Gαs</i> et l'adenylate cyclase	252
Figure 35: Structure des différentes GTPases.....	254
Figure 36: Dimères des <i>Gα</i> et site de sélectivité.....	255
Figure 37: Interaction entre AGS3 et <i>Gαi</i>	257
Figure 38: Structure du complexe ARF6/Jip4	258
Figure 39: Schéma de dimère de RCPG avec la protéine G	260
Figure 40: Asymétrie vs symétrie d'activation d'un dimère de récepteur	264

Liste des abréviations

α_{2A} AR,	alpha2A-adrénergique
ACI,	adénylates cyclases de type I
ACII,	adénylates cyclases de type II
ACTH,	adrénocorticotropine
ACV,	adénylates cyclases de type V
ACVI,	adénylates cyclases de type VI
ACVII,	adénylates cyclases de type VII
ADH,	hormone antidiurétique
ADN,	acide désoxyribonucléique
ADP,	adénosine diphosphate
AGS,	activateur de la signalisation des protéines G hétérotrimériques
AGS1,	activateur de la signalisation des protéines G hétérotrimériques de type 1
AGS2,	activateur de la signalisation des protéines G hétérotrimériques de type 2
AGS3,	activateur de la signalisation des protéines G hétérotrimériques de type 3
AMPc,	adénosine monophosphate cyclique
AP-2,	protéine adaptatrice de type 2
AQP2,	aquaporine de type 2
ARN,	acide ribonucléique
ARNm,	acide ribonucléique messenger
ATP,	adénosine triphosphate
AVP,	arginine vasopressine
β 2AR,	beta2-adrénergique
BFP,	protéine fluorescence bleu
BiFC,	protéines rapporteuses de fluorescence biomoléculaire
BiLC,	protéines rapporteuses de luminescence biomoléculaire
BRET,	transfert d'énergie de résonance de bioluminescence

CAMK1,	kinase dépendante du Calcium/calmoduline de type 1
CCP,	puits tapissés de clathrine
CFP,	protéine fluorescence cyan
Coel-400a,	coelenterazine-400a
Coel-h,	coelenterazine-h
CTX,	toxine du Cholera
DAG,	diacylglycérol
DOR,	récepteurs opioïde delta
DsRed,	protéine fluorescence rouge de <i>Discosoma striata</i>
EPAC,	facteur d'échange de la guanine de Rap de type 3
FP,	protéine fluorescence
FRET,	transfert d'énergie de résonance de fluorescence
GABA,	acide γ -aminobutyrique
GABAB,	récepteur métabotrope de GABA
GAP,	protéine adaptatrice des protéines G
GBR1,	récepteur métabotrope de GABA sous type 1
GBR2,	récepteur métabotrope de GABA sous type 2
GDP,	guanine diphosphate
GEF,	activité échangeur de nucléotide
GFP,	protéine fluorescence verte
GMPc,	guanosine monophosphate cyclique
GnRH,	récepteur du relachement des gonadotropine
GRIK,	canaux potassiques activés par les protéines G
GRK2,	kinase des récepteurs couplés aux protéines G de type 2
GRK3,	kinase des récepteurs couplés aux protéines G de type 3
GRK5,	kinase des récepteurs couplés aux protéines G de type 5
GTP,	guanine triphosphate
GTPase,	enzyme hydrolysant le GTP

IP3,	inositol triphosphate
KOR,	récepteurs opioïde kappa
M3R,	récepteur muscarinique de type 3
MOR,	récepteurs opioïde mu
PCA,	essais de complémentation protéique
PED,	phosphodiesterases
PI3K,	phosphatidyl-inositol 3'-kinase
PKA,	protéine kinase A
PKC,	protéine kinase C
PKD,	protéine kinase D
PLC- β ,	classe beta des phospholipases de type C
PP5,	protéine phosphatase 5
PTX,	toxine de la pertussis
R ₀ ,	rayon de Förster
RCGP,	récepteurs couplés aux protéines G
RET,	transfert d'énergie résonance non radiative
RGS,	régulateurs de la signalisation des protéines G
Rluc,	luciférase de <i>renilla</i>
RMN,	résonance magnétique nucléaire
ROC,	canaux opérés par des récepteurs
SERCA,	pompes de type ATPase réticulum sarcoendoplasmique
shRNA,	petit ARN en épingle à cheveux
SOC,	canaux opérés par les réserves calciques
SRET,	transfert d'énergie de résonance séquentiel BRET/FRET
V2R,	récepteur à la vasopressine V2
VGCC,	canaux calciques voltage dépendant
YFP,	protéine fluorescence jaune

*« Rien ne naît ni ne périt, mais des choses
déjà existantes se combinent, puis se séparent
de nouveau ».*

Anaxagore de Clazomènes, (500 – 428 av. J.-C.)

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Michel Bouvier pour m'avoir permis de me rapprocher un peu plus de mon rêve, qui est de pouvoir faire de la science pour le plaisir de faire de la science. Suite à cinq années de travail comme assistant de recherche dans une compagnie de biotechnologie (Biosignal), j'ai entrepris une formation universitaire qui m'a conduit dans le laboratoire du Dr Bouvier. Le principal et seul critère, qui a incité ce choix, est la passion contagieuse pour la science retrouvé en Michel Bouvier. Merci Michel d'avoir pris le temps nécessaire pour m'aider à canaliser ma créativité dysfonctionnelle en un outil efficace utile pour ma carrière future.

Également sur le plan plus personnel, mon séjour dans le laboratoire de Michel Bouvier, ma permis de rencontrer des gens extraordinaires avec qui j'ai partagé les 8 dernières années de ma vie, mais surtout ce séjour ma permis de rencontrer une personne qui est devenue très important pour moi, Madeleine Héroux. Je voudrais te remercier de partager ma vie et mon amour, avec toi à mes côtés je suis une meilleure personne et un meilleur scientifique. De plus, le fruit de notre amour, Zoé Breton, est toute simplement merveilleuse, à l'image de sa mère. Mais à mes yeux tu es beaucoup plus qu'une simple compagne de vie, tu es une raison de vivre.

Au cours d'une vie, nous rencontrons plusieurs personnes et de ces personnes une infime partie a une réelle influence sur notre destin. J'aimerais remercier Christian Le Guill, qui par les nombreuses discussions a positivement influencer mon jugement scientifique en servant de modèle.

J'aimerais également remercier mes parents André Breton et Jacinthe Breton, ma sœur Véronique Breton, tous les membres de ma famille ainsi que mes amis qui m'ont toujours encouragés à persévérer dans les moments difficiles et qui m'ont toujours écoutés, même s'ils ne comprenaient pas toujours ce que je disais.

Finalement, j'aimerais remercier les organismes qui ont financé mes recherches via des bourses d'excellences; le Fond de recherche en santé du Québec FRSQ ainsi que la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (FES).

Introduction

Signalisation cellulaire

La communication cellulaire est un aspect primordial de la cohésion et du maintien de l'homéostasie des organismes pluricellulaires. Ce processus touche à toutes les étapes de la vie d'une cellule allant des fonctions cellulaires de base, du contrôle de la survie cellulaire, du développement et de la différenciation des tissus jusqu'à l'adaptation de l'organisme à son environnement. Pour ce faire, l'organisme produit un cocktail de molécules chimiques (molécules messagères) qui provoquent une modulation de l'activité cellulaire de façon autocrine (même tissu) ou paracrine (sur un tissu différent) (Lodish *et al.*, 1995). Afin de permettre la reconnaissance de ces molécules messagères, une grande variété de protéines à activité réceptrielle, dites récepteurs, est produite par chacune des cellules. Il existe une grande panoplie de récepteurs moléculaires répartis du noyau jusqu'à la membrane plasmique, qui possèdent tous des fonctions distinctes. Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve plusieurs grandes familles de récepteurs : comme par exemple les récepteurs-canaux pour lesquels la liaison des molécules messagères contrôle l'ouverture de pores, permettent le passage de certains ions à travers la membrane plasmique qui leur est normalement imperméable. Une deuxième famille de récepteurs membranaires est composée par les récepteurs à activité kinase (PDGFR, EGFR, TGFR, ...) qui ont la particularité de s'auto-phosphoryler ou couplé à des protéines kinases (TNFR, CD40R, TLR, IFNR, ...) qui engendre différentes cascades de signalisation impliquant d'autres protéines de phosphorylations/déphosphorylations qui abouti à la migration, prolifération ainsi qu'à la différenciation cellulaire. Finalement, une autre grande famille de récepteurs est composée des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui ont la particularité d'engendrer une réponse cellulaire via l'activation de protéines à activité GTPasique. L'une des principales caractéristiques de ce type de signalisation est la complexité ainsi que la grande variété de voies cellulaires utilisées par ces récepteurs afin d'engendrer les réponses appropriées. Afin d'optimiser ces processus, les RCPG vont s'assembler en unité de signalisation permettant ainsi cette multitude de réponses cellulaires. De plus, ces unités de signalisation vont moduler la nature, l'amplification ainsi que la durée de la réponse cellulaire.

Famille des récepteurs couplés aux protéines G

Généralités

Avec plus de 800 gènes codant pour des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans le génome humain, les RCPG représentent l'une des plus grandes familles impliquées dans la transduction des signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. De plus, cette famille de récepteurs, avec environ 1 à 5 % des protéines membranaires totales selon le type cellulaire et plus de 3% (environ 800 gènes sur 25 000 gènes connus) des gènes du génome des mammifères, représente un champ d'étude important dans la compréhension du fonctionnement cellulaire (Hermans, 2003). Au niveau pharmaceutique, environ 50% des médicaments actuels ont pour cible un RCPG, ce qui fait de l'étude des mécanismes de régulation de l'activité de ces récepteurs, une sphère importante dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. À un niveau plus fondamental, les RCPG ont été retrouvés dans plusieurs génomes d'êtres vivants éloignés dans l'évolution, tels les plantes, les levures, les nématodes, les insectes et les vertébrés, en plus d'être également présents chez certains agents pathogènes tels les virus (Perez, 2005; Smit *et al.*, 2003). De par leur fonction de récepteurs moléculaires, les RCPG peuvent engendrer une signalisation cellulaire complexe suite à leur activation par une large variété de ligands différents, allant du simple photon, aux ions, aux petites molécules, aux peptides ainsi qu'aux protéines de poids moléculaire plus élevé.

Les RCPG se divisent en plusieurs grandes sous familles de récepteurs, dont trois principales qui regroupent la majorité des récepteurs; la famille 1 regroupe la rhodopsine, les récepteurs olfactifs et les récepteurs des amines biogènes (Hermans, 2003). Cette classe est caractérisée par la présence de plusieurs acides aminés conservés représentés en rouge sur la Figure 1. La majorité des membres de cette famille possèdent un résidu cystéine palmytoylé dans la queue C-terminale (Ellis, 2004). De plus, la présence d'un pont disulfure entre les boucles extérieures 1 et 2 est généralement observée. Une autre

particularité des récepteurs de la famille 1 est la présence d'un motif E/DRY dans la seconde boucle intracellulaire. Basé sur la structure de la Rhodopsine à l'état inactif, le motif E/DRY a été proposé comme étant important pour le maintien du récepteur dans sa conformation inactive. Par ailleurs, des mutations réalisées dans ce motif E/DRY rendent les récepteurs de la famille 1 constitutivement actifs (Rovati *et al.*, 2007). La famille 2 regroupe des récepteurs de peptides tels le glucagon, la sécrétine et le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). Les membres de cette classe possèdent un long domaine N-terminal qui contient une série de résidus cystéines impliquées dans un réseau de ponts disulfures. La morphologie de ces récepteurs est similaire à celle de la famille 1 sans toutefois avoir de résidus conservés caractéristique de la famille dans la portion transmembranaire ni de cystéines palmitoylées (Ellis, 2004). Finalement, la famille 3 est principalement composée des récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA, des neurotransmetteurs activateurs et inhibiteurs respectivement du système nerveux, ainsi que des récepteurs responsables du goût. Les récepteurs de cette famille sont caractérisés par un long domaine N-terminal ainsi qu'un long domaine C-terminal. Ces membres possèdent également une boucle i3 courte et hautement conservée (Ellis, 2004). Des données récentes montrent que les récepteurs de la famille 3 fonctionnent sous forme de dimères (Wess, 1998).

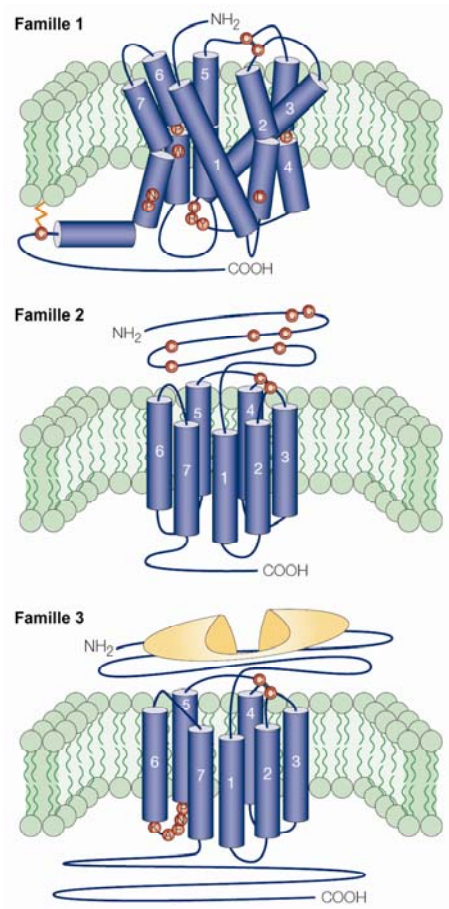


Figure 1: Représentation des trois principales sous famille de RCPG

Les acides aminés en rouge représentent les résidus conservés dans les différentes familles. (Image tirée de (Ellis, 2004))

Structure

Les RCPG sont des protéines caractérisées par une seule chaîne polypeptidique à sept passages transmembranaires (aussi appelée heptahélice) ce qui génère la présence de trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Les sept passages transmembranaires sont composés principalement d'acides aminés hydrophobes qui adoptent une structure secondaire en hélice alpha. De par sa topologie, les RCPG présentent leurs domaines N-terminaux du côté extracellulaire qui est généralement glycosylé. Ce domaine N-terminal ainsi que les boucles extracellulaires sont importants pour la fixation

des différents ligands. Par opposition, son exposition au milieu cytoplasmique fait du domaine C-terminal une cible idéale pour plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la palmitoylation et autres modifications servant à la régulation étroite de l'activité des RCPG (Lefkowitz, 2004). La phosphorylation des récepteurs par certaines kinases est responsable de la terminaison de la signalisation, cette modification post-traductionnelle sera traitée plus spécifiquement dans la section « Terminaison de la signalisation et désensibilisation ».

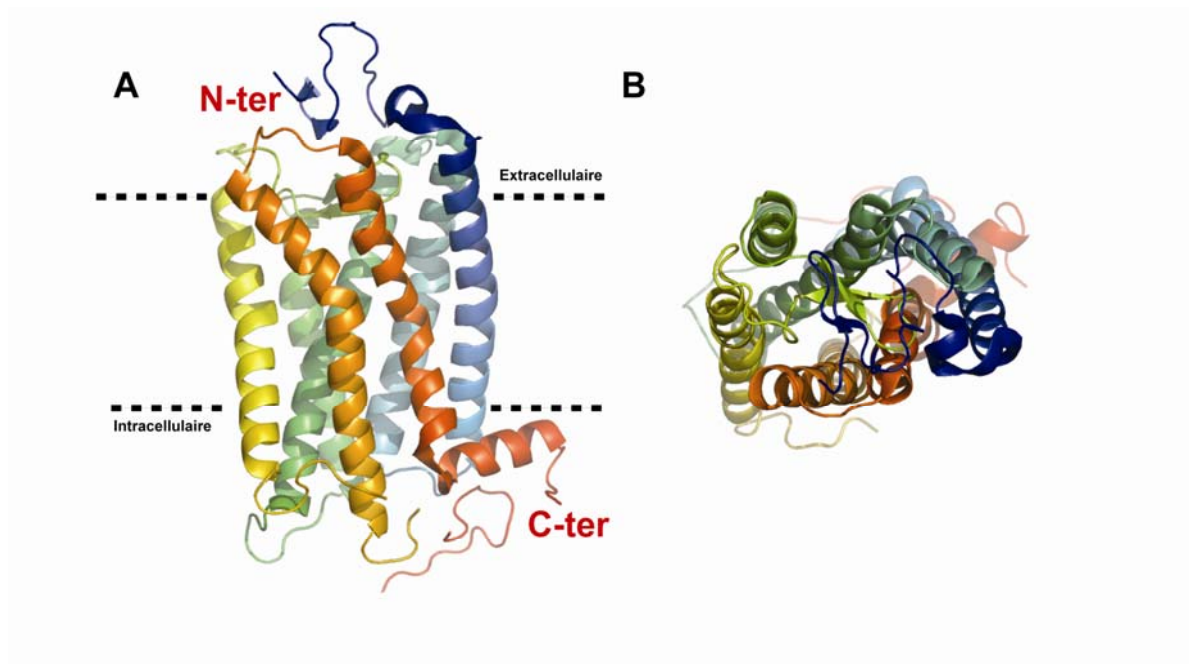


Figure 2: Structure des RCPG

Vue dans le plan de la membrane (A) et du dessus (B) du récepteur Rhodopsine (PDB 1F88). Un dégradé de couleur est appliqué pour faire ressortir les sept hélices alpha des RCPG, passant du bleu pour l'hélice alpha 1 (TM1), au rouge pour le TM7.

En 2000, le groupe du Dr. Palczewski a mis à jour la structure tridimensionnelle d'un RCPG suite à la cristallisation du récepteur Rhodopsine et confirme la structure en forme de baril, prédite préalablement par des études sur la bactériorhodopsine (voir Figure 2, page 5) (Henderson et Unwin, 1975; Palczewski *et al.*, 2000). En plus de celle de la Rhodopsine,

les structures des récepteurs β 1-, β 2- adrénergiques, adénosine 2A ainsi que celle du récepteur de l'opsine ont également été résolues. Pour des raisons techniques, il a fallu attendre plusieurs années avant que ces autres RCPG soient à leur tour cristallisés et puissent confirmer les observations réalisées sur la Rhodopsine (voir Tableau I, page 6). Malgré les modifications permettant de stabiliser la structure imposées aux derniers récepteurs cristallographiés, les structures obtenues sont remarquablement similaires et certains résidus clés dans la fonction sont retrouvés aux mêmes positions (Mustafi et Palczewski, 2009). D'autre part, le récepteur de l'opsine a également été cristallographié en présence des cinq derniers acides aminés de la sous-unité $G\alpha_t$, responsables de la sélectivité d'activation des RCPG (Scheerer *et al.*, 2008).

Tableau I : Différents RCPG cristallographiés

Protéines	Code PDB	Espèce	année
Rhodopsine	1F88	Bos taurus	2000
β -2 adrénergique	2RH1	Homo sapiens	2007
Rhodopsine	2Z73	Todarodes pacificus	2007
Opsine	3CAP	Bos taurus	2008
opsine + C-ter $G\alpha_t$	3DQB	Bos taurus	2008
Adenosine-2A	3EML	Homo sapiens	2008
β -1 adrénergique	2VT4	Meleagris gallopavo	2008

Fonctions

Les RCPG sont des protéines importantes impliquées dans plusieurs processus physiologiques, notamment la réponse aux hormones et aux neurotransmetteurs, qui sont responsables de la transmission de l'information d'un tissu à l'autre au sein des organismes supérieurs. De plus, certains RCPG sont directement impliqués dans l'analyse de l'environnement et permettent l'adaptation de l'organisme face à certains stimuli en étant responsables de la vision, de l'odorat ainsi que du goût (Rosenbaum et al., 2009). Sur une

base plus moléculaire, les ARNm des RCPG sont traduits en protéines, qui sont par la suite menées au réticulum endoplasmique pour subir une série de modifications post-traductionnelles (glycosylation et palmitoylation) permettant leur maturation et l'acheminement final vers la membrane plasmique (Qanbar et Bouvier, 2003).

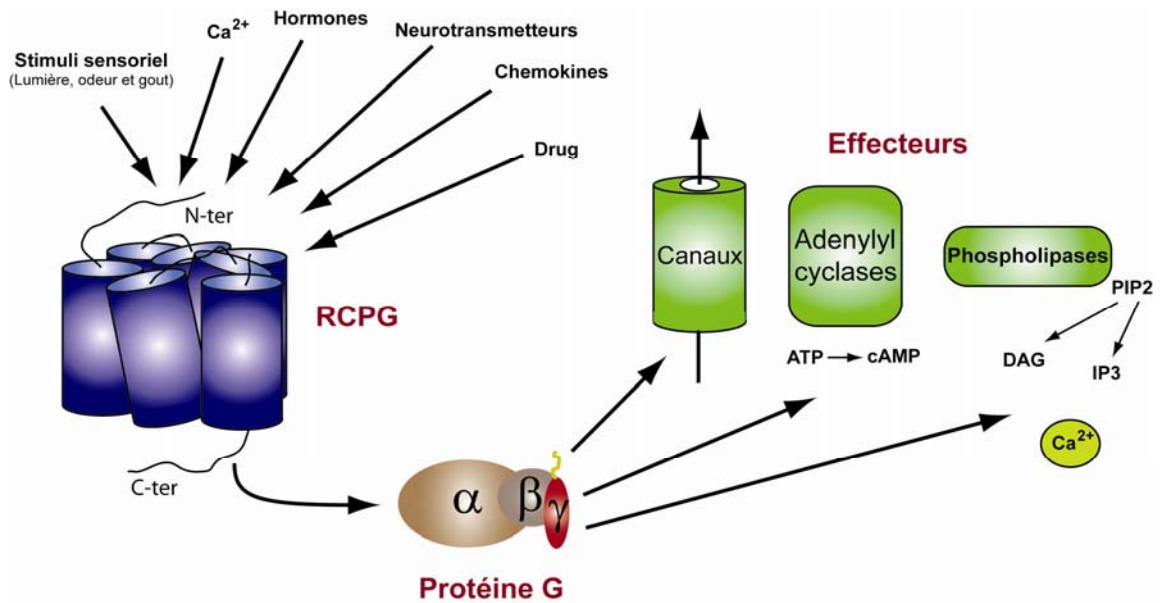


Figure 3: Voies de signalisation classiques

L'activation des RCPG (en bleu) par différents types de ligands, induit l'activation d'une protéine G hétérotrimérique (G α en brun, G β en gris et G γ en rouge). Une fois activée, la protéine G (via G α ou le dimère G $\beta\gamma$) va stimuler différents types d'effecteurs (en vert), qui vont produire des seconds messagers intracellulaires responsables de la réponse globale des cellules.

En plus d'être les capteurs des molécules messagères extracellulaires, les RCPG jouent également un rôle important dans la nature ainsi que dans l'amplification de la réponse cellulaire aux différents stimuli. Suite à la fixation du ligand du côté extracellulaire, le récepteur va subir un changement de conformation qui engagera un cycle d'échange d'une guanine diphosphate (GDP) pour une guanine triphosphate (GTP) au sein d'un complexe hétérotrimérique, la protéine G, qui sera détaillée plus loin (Hepler et Gilman, 1992).

Une fois fixée par du GTP, la protéine G va à son tour pouvoir activer différents effecteurs et cette stimulation va prendre fin suite à l'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPasique que possède la protéine G. L'amplification du signal par les RCPG se fait en deux temps, soit en activant différentes protéines G ou en activant plusieurs fois la même protéine G. Suite au retour sous forme inactive liée au GDP, la protéine G peut être de nouveau activée par un récepteur. En plus du nombre de cycles d'activation/désactivation, le récepteur peut influencer la vitesse de l'activité GTPasique de la protéine G, ainsi que l'arrêt de la réponse. L'arrêt de cette signalisation fera le sujet d'une section ultérieure. Afin de permettre l'activation des différentes voies de signalisation, il est démontré que les RCPG peuvent activer plusieurs effecteurs différents, et selon le couplage aux protéines G hétérotrimériques, les récepteurs vont engendrer différentes voies de signalisation (voir Figure 3, page 7). La sélectivité des récepteurs sera discutée dans la partie « Interactions entre les RCPG et les protéines G ».

Dimérisation des RCPG

Suite à la découverte des RCPG, le paradigme de signalisation était de 1 :1 :1 :1, soit un ligand /récepteur qui active une protéine G, qui active un effecteur (Bourne et al., 1990). Avec les données expérimentales de l'époque, ce modèle permettait d'expliquer les observations faites sur les récepteurs connus, par contre aujourd'hui ce modèle ne peut pas expliquer la complexité de la signalisation engendrée par un seul récepteur.

La présence d'interactions entre plusieurs récepteurs a été proposée pour la première fois dans le début des années 1980 par le groupe du Dr. McNeil, afin d'expliquer leurs résultats de micro-agrégation du récepteur du relâchement des gonadotropines (GnRH) suite à l'utilisation d'un anticorps bivalent en présence d'un agoniste dimérique. Ils ont observé que la présence de l'anticorps confère la capacité à l'agoniste dimérique de lier plusieurs récepteurs, ce qui serait suffisant pour activer la réponse (Conn et al., 1982). Quelques

années plus tard, de nouvelles preuves de la formation de dimères entre les RCPG sont apparues dans la littérature. Le groupe du Dr. Wess a démontré la présence d'interactions intermoléculaires entre les RCPG, via l'utilisation de différentes chimères entre les récepteurs adrénergique et muscarinique capables de former des complexes fonctionnels (Maggio et al., 1993). En parallèle, le groupe du Dr. Bouvier a démontré que la dissociation de dimère de récepteur β 2-adrénergique détectée sur gel d'immunobuvardage suite à un traitement avec un peptide du domaine transmembranaire VI (Hebert et al., 1996) inhibait la capacité du récepteur à transmettre le signal. En 2003, une étude utilisant la microscopie à force atomique a clairement confirmé la possibilité d'interactions entre deux récepteurs, du moins pour le récepteur rhodopsine (Fotiadis et al., 2003). En parallèle, une multitude d'observation sur la présence d'interactions entre des récepteurs de même nature (homodimère) et de nature différente (hétérodimère) ont été publiées, utilisant différentes techniques basées sur le transfert d'énergie (FRET et BRET) (Angers *et al.*, 2000; Overton et Blumer, 2000), ainsi que l'utilisation de ligands multivalents et de chimères de récepteurs. Voir le Tableau II pour des exemples typiques d'hétérodimères pour lesquels un rôle physiologique clair a été identifié.

Tableau II: Exemples clés d'hétérodimères et leurs fonctions

Hétérodimère	Fonction	Référence
GBR1 + GRB2	Acheminement du récepteur GABA _B à la surface	(Kaupmann et al., 1998)
β 2AR+ M71 OR	Acheminement du M71 OR à la surface	(Hague et al., 2004)
T1R2+T1R3	Perception du goût aigre	(Nelson et al., 2001)
T1R1+T1R3	Perception du goût des acides aminés L-glutamate et L-aspartate	(Nelson et al., 2002)
AT1aR+B2R	Hypertension/préclampsie	(AbdAlla et al., 2000)
MOP+DOP	Augmente l'effet de la morphine	(Gomes et al., 2000)
KOP+DOP	Analgésie spécifique à certains tissus	(Waldhoer et al., 2005)

Encore à ce jour, le rôle fonctionnel et physiologique de la formation de dimères de récepteurs demeure controversé. Par contre, certains modèles nécessitant la formation d'hétérodimères sont incontestables pour leurs fonctions, c'est le cas du récepteur métabotrope GABA ($GABA_B$). Afin d'avoir un récepteur fonctionnel du GABA à la surface des cellules, l'association de deux protomères GBR1 et GBR2 est essentielle. GBR1 qui lie le ligand, est retenu dans le réticulum endoplasmique lorsqu'il est exprimé seul, alors que de son côté GBR2 est libre de transiter à la membrane plasmique (Kaupmann et al., 1998). De plus, il a été démontré que l'activation de la protéine G passe par GBR2 malgré le fait qu'il ne lie pas le GABA (Kuner et al., 1999). L'interaction de GBR1 et de GBR2 dans le réticulum endoplasmique favorise l'acheminement du dimère GBR1/GBR2 à la membrane plasmique, permettant ainsi la signalisation du récepteur du GABA par la transactivation entre GBR1 et GBR2.

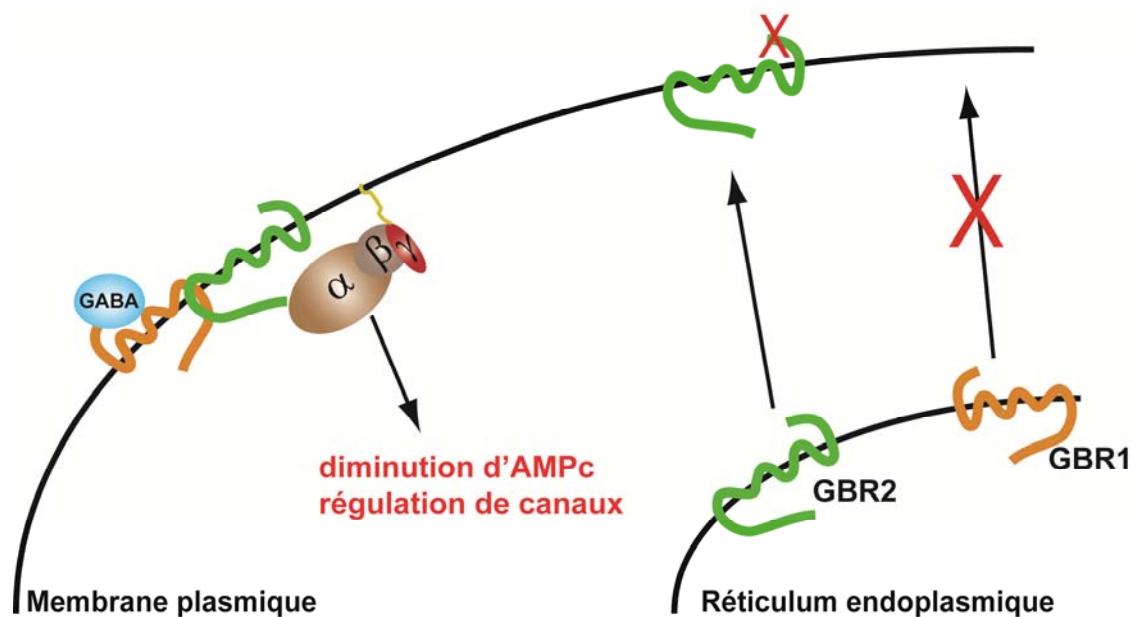


Figure 4: Schéma de dimérisation du récepteur $GABA_B$

Suite à leurs synthèses, les récepteurs GBR1 (orange) et GBR2 (vert) vont s'associer dans le réticulum endoplasmique puis être acheminé vers la membrane plasmique où GBR1 pourra fixer le GABA (bleu) et transactiver GBR2 pour activer la protéine G hétérotrimérique, qui diminuera la concentration d'AMPc en inhibant les adénylates cyclases. Seul GBR1 ne peut aller à la membrane plasmique, en revanche GBR2 peut se rendre sans GBR1 à la surface cellulaire, par contre il est incapable de lier le GABA pour signaler.

Avec l'accumulation de preuves de la formation de dimères pour certains récepteurs, la question de la stœchiométrie d'interaction récepteur/protéine G, c'est-à-dire du nombre de sous-unités de protéines G en interaction et activées par un dimère de récepteur, demeure sans réponse. De plus, il n'est pas exclu d'avoir des cas de récepteurs monomériques fonctionnels à la membrane plasmique, en plus des récepteurs dimériques, pouvant donner des stœchiométries de couplage à la protéine G hétérotrimérique différentes.

Famille des protéines G hétérotrimériques

Généralités

Les protéines G hétérotrimériques sont membres de la superfamille des GTPases, qui sont fondamentalement conservées des bactéries aux mammifères, et qui jouent divers rôles dans la régulation cellulaire (Hepler et Gilman, 1992). Plus spécifiquement, la protéine G hétérotrimérique permet la transmission de l'information des récepteurs vers les effecteurs intracellulaires. Comme son nom l'indique, la protéine G hétérotrimérique est composée de trois sous-unités différentes : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Sous sa forme inactive, la sous-unité $G\alpha$ est liée à un GDP. Suite à la liaison d'un agoniste, l'activité de facteur d'échange du guanosine (GEF) du récepteur est stimulée, ce qui lui permet de favoriser l'échange du GDP pour le GTP au niveau de la sous-unité $G\alpha$ et ainsi la protéine G est alors activée (Hepler et Gilman, 1992). C'est uniquement lorsque liée au GTP que la protéine G peut inhiber/activer certains canaux ioniques ou activer différents effecteurs de la signalisation tels que l'adénylate cyclase, la phospholipase C et autres. Selon le modèle classique de l'activation de la protéine G hétérotrimérique par les RCPG, la dissociation entre la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ permet l'activation des différents effecteurs $G\alpha$ - ou $G\beta\gamma$ -dépendants.

Sous-unité $G\alpha$

Les sous-unités $G\alpha$, qui varient entre 45-52 kDa, possèdent un domaine hélice alpha et un domaine GTPasique similaire à la structure de $p21^{ras}$ (Gilman, 1987). Plus précisément, le domaine GTPasique est composé de cinq hélices alpha entourant six feuillets bêta standards, dont cinq parallèles et un antiparallèle (voir Figure 5, page 12). Le domaine hélice alpha possède une longue hélice alpha entourée par cinq hélices plus courtes et est lié au domaine GTPasique par deux segments, le premier composé des résidus 54 à 58 et le deuxième des résidus 173 à 179 (Raw et al., 1997). Ces deux segments lient une structure en fourche responsable de la liaison des nucléotides (GDP/GTP). Les changements conformationnels de cette structure en fourche favorisent le contact avec le dimère β/γ .

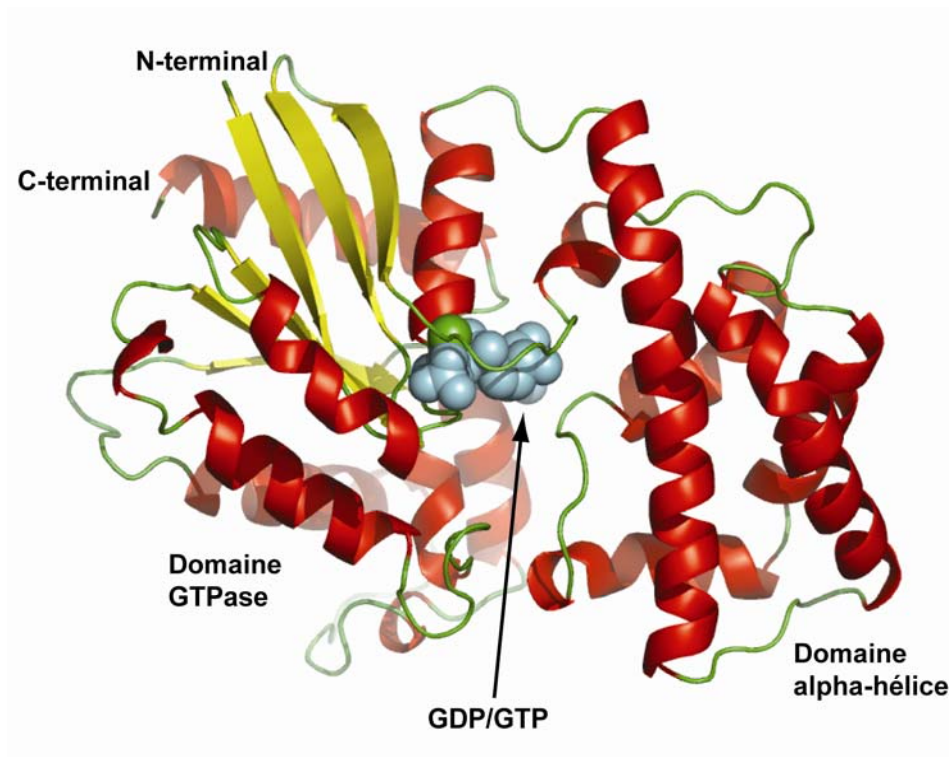


Figure 5: Structure des sous-unités $G\alpha$

Structure de la sous-unité $G\alpha_i$, où les hélices alpha sont colorées en rouge, les feuillets bêta sont colorés en jaune et les jonctions non structurées sont colorées en vert. Le site de liaison du GDP/GTP est représenté en bleu. Image produite avec PyMOL avec le PDB : 1CIP.

En dehors de certaines régions communes, les protéines $G\alpha$ sont très divergentes et il est possible de les classer en quatre sous-types; $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$ (voir Tableau III, page 16). La classe $G\alpha_s$ est composée de $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$, identiques à près de 88% (Neves et al., 2002). La sous-unité $G\alpha_s$ est exprimée dans la majorité des cellules, par contre l'expression de $G\alpha_{olf}$ est limitée à certains neurones. Toutes deux possèdent la capacité d'activer l'adénylate cyclase. L'activation de cette enzyme permet la conversion de l'ATP en AMPc, qui est un second messenger important dans l'activation de la kinase PKA ainsi que dans l'activation de la protéine EPAC. Également, $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$ sont des substrats pour une ADP-ribosylation catalysée par une toxine de *Vibrio cholera* (CTX). Cette modification post-traductionnelle inhibe l'activité GTPasique de la protéine G, résultant en une protéine constitutivement active (Neves et al., 2002). En plus d'induire la production d'AMPc, $G\alpha_s$ interagit avec les kinases c-Src et Hck, protéines régulatrices importantes dans plusieurs voies de signalisation, dont la transactivation des récepteurs tyrosine kinase par les RCPG (Ma et al., 2000). La fixation de $G\alpha_s$ (sous format active chargée de GTP) à c-Src entraîne un changement structural au sein de cette kinase, favorisant ainsi son autophosphorylation et son activation. De plus, cette stimulation de c-Src est indépendante de l'action de $G\alpha_s$ sur l'adénylate cyclase (Ma et al., 2000). En plus d'interagir avec c-Src, $G\alpha_s$ peut également se fixer aux tubulines et promouvoir leurs activités GTPasiques (Sarma et al., 2003). La tubuline est une GTPase importante pour l'assemblage dynamique des microtubules, l'une des composante du cytosquelette des cellules (Roychowdhury et Rasenick, 2008). Sous l'action des RCPG, les $G\alpha_s$ sont les seules sous-unités $G\alpha$ capables d'internaliser et de permettre l'activation des tubulines dans le cytosol (Dave et al., 2009).

La classe $G\alpha_i$ est composée de $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, des deux isoformes rétiniennes $G\alpha_{t1}$ et $G\alpha_{t2}$, des isoformes du système nerveux central $G\alpha_{o-A}$ et $G\alpha_{o-B}$, ainsi que $G\alpha_z$ principalement exprimé dans les plaquettes sanguine (Ho et Wong, 1998). Tous les membres de cette famille contiennent un résidu cystéine en C-terminal, sauf $G\alpha_z$, sensible à l'ADP-ribosylation par la toxine de *Bordetella pertussis* (PTX) (Hsia et al., 1984). Cette

modification covalente irréversible rend impossible la libération du GDP suite à la fixation d'un ligand sur un récepteur couplé à Gi. Le blocage des réponses cellulaires par la PTX a été un outil important pour l'étude de l'implication des protéines Gi dans les processus de signalisation cellulaire. Ainsi, il a été déterminé que la sous-unité $G\alpha t$ active la GMPc phosphodiesterase de la rétine, un effecteur majeur dans la vision chez les vertébrés (Roof *et al.*, 1985). Les membres de la sous-famille $G\alpha i$ et $G\alpha o$ sont impliqués dans l'inhibition de l'adénylate cyclase, dans la régulation de certains canaux ioniques et dans la régulation de la phospholipase C. Tout comme *Gas*, *Gai1* (contrairement à *Gai2*) est capable d'interagir avec la tubuline (Dave *et al.*, 2009).

Pour ce qui est de la sous-unité $G\alpha z$, comparativement aux autres membres de la famille *Gai*, son expression est limitée à certains neurones et aux plaquettes et cette $G\alpha$ n'est pas inhibée par la PTX. Par contre, $G\alpha z$ semble avoir des actions identiques aux autres *Gai* sur les différents effecteurs et être activée par les mêmes RCPG (Fields et Casey, 1997).

La classe Gq contient cinq membres: $G\alpha 11$, $G\alpha 14$, $G\alpha 15/16$ et $G\alpha q$. Les membres de cette classe ne sont pas des substrats pour la réaction d'ADP-ribosylation catalysée par la PTX et la CTX. $G\alpha q$ est responsable de la régulation de la classe β des phospholipases de type C (PLC- β), qui est impliquée dans l'accumulation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3) qui entraînent la libération des réserves de Ca^{2+} . $G\alpha q$ et $G\alpha 11$ sont largement exprimés dans tous les tissus, contrairement aux autres membres de cette famille dont l'expression est plutôt restreinte à certains types cellulaires (Neves et al., 2002). De plus, $G\alpha q$ semble être impliqué dans la régulation de certaines GTPases de type Rho, en activant par exemple p63RhoGEF (Lutz *et al.*, 2005).

Finalement, la dernière classe de sous-unités $G\alpha$ est composée de $G\alpha 12$ et $G\alpha 13$. Malgré le fait qu'elles soient exprimées dans la majorité des tissus, les fonctions de ces deux $G\alpha$ ne

sont pas clairement définies. L'expression et l'activation de G α 12 et G α 13 dans des cellules embryonnaires P19 en différenciation ont été observées en réponse à l'acide rétinoïque (Neves et al., 2002). Une des fonctions les plus connues pour cette famille de protéines G est leur implication dans l'activation de RhoA via l'interaction avec des protéines à activité échangeur de nucléotide (GEF). La première GEF rapportée comme interagissant avec G α 12 et G α 13 est p115RhoGEF (Kozasa *et al.*, 1998). En plus d'activer RhoA, G α 12 et G α 13 sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette en permettant l'activation des cadhérines (Meigs *et al.*, 2001). G α 12 est impliquée dans la translocation de la protéine phosphatase 5 (PP5) et est responsable également de l'activation de cette phosphatase par l'acide arachidonique (Yamaguchi *et al.*, 2002). La stimulation des récepteurs couplés à G α 13 engage l'activation sélective de la protéine PKA sans l'élévation de la concentration d'AMPc. G α 13 en se fixant à l'AKAP110 permet le relâchement de la sous-unité catalytique de PKA du complexe AKAP110-PKA (Niu *et al.*, 2001). En plus de ces exemples, des données récentes indiquent que G α 12 et G α 13 peuvent interagir avec de nouvelles protéines et influencer leurs fonctions, comme par exemple le transporteur Na/H (Lin *et al.*, 1996).

Tableau III: Classification des sous-unités α de la protéine G

Familles	Sous-types	Effecteurs	Expression	Modulateurs Pharmacologiques
Gs	Gs(s)	Adenylate cyclase	Gs: ubiquitaire	CTX
	Gs(L)	Canaux Maxi K	Golf: neurones	
	Gs(XL)	Src tyrosine kinase		
	Golf	Tubuline		
Gi	Go1	Adenylate cyclase	Go: neurone	Go: PTX
	Go2	Rap1GAPII	Gi1-i3: ubiquitaire	Gi: PTX
	Gi1	ERK/MAPkinase	Gz: neurones et plaquettes	Gt: PTX, CTX
	Gi2	Canaux K ⁺	Gt1: cellules bâtonnets	Ggust: PTX
	Gi3	Canaux Ca ²⁺	Gt2: cellules cônes	
	Gz	Src tyrosine kinase	Gust: cellules du goût aigre/doux	
	Gt1	Tubuline		
	Gt2	cGMP-PDE		
	Ggust			
Gq	Gq	Phospholipase C β	Gq/11: ubiquitaire	Gq/11: YM-254890
	G11	p63-RhoGEF	G15/16: cellules hématopoïétiques	
	G14	Bruton's tyrosine kinase		
	G15/16	Canaux K ⁺		
G12/13	G12	E-cadhérine	ubiquitaire	
	G13	p115RhoGEF PDZ-RhoGEF LARG Protéine phosphatase 5 (PP5) AKAP110		

Sous-unité $G\beta\gamma$

$G\beta\gamma$ représente un complexe de deux sous-unités de la protéine G associées sous forme de dimère très stable qui est uniquement dissocié dans des conditions de dénaturation (Hamm et Gilchrist, 1996). L'association entre $G\beta\gamma$ est non-covalente et a lieu au niveau du cytosol, avant l'acheminement du complexe à la membrane plasmique (Hamm et Gilchrist, 1996).

La sous-unité $G\gamma$, une petite protéine de 9 kDa, est composée de deux hélices alpha, dont une hélice qui est impliquée dans l'interaction avec $G\beta$ (voir Figure 6, page 17) (Clapham et Neer, 1997). Il existe 13 isoformes de $G\gamma$ qui ont une identité de séquence entre 27-75% (Hamm et Gilchrist, 1996)

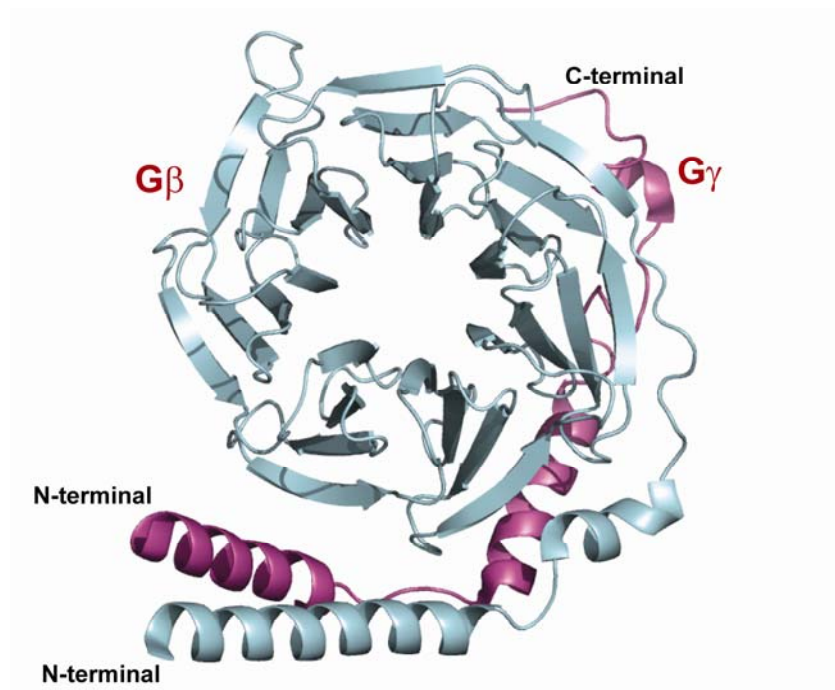


Figure 6: Structure du dimère $G\beta/\gamma$

En bleu la sous-unité $G\beta$ et en rose la sous-unité $G\gamma$. Image produite avec PyMOL avec le PDB : 3CIK

Chez l'humain, il existe cinq formes distinctes de sous-unités $G\beta$, $G\beta 1$ à 5 , qui présentent une grande similarité de séquence entre 50-83% (Hamm et Gilchrist, 1996). La sous-unité $G\beta$, une protéine d'environ 35 kDa, est constituée de deux régions structurales distinctes, un segment N-terminal d'environ 20 acides aminés en alpha hélice impliqué dans l'interaction avec la sous-unité $G\gamma$ (voir Figure 6, page 17) et le reste de la séquence impliqué dans la formation d'une structure particulière répétée 7 fois (Clapham et Neer, 1997). Cette séquence répétée est appelée 'WD-repeat' et elle n'est pas unique à la sous-unité $G\beta$. Plus d'une quarantaine de protéines possèdent un motif 'WD-repeat'. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs phénomènes cellulaires tels que la transduction des signaux, l'épissage des pré-ARNm, la régulation transcriptionnelle, l'assemblage du cytosquelette et le transport des vésicules (Tam et Saier, 1993). Le lien qui uni les membres de cette super famille est leur capacité à former des assemblages macromoléculaires. Par conséquent, cette propension à former des complexes protéiques s'avère être une part essentielle du fonctionnement des ces protéines à WD-repeat. La structure cristalline révèle que la sous-unité $G\beta$ est principalement composée de feuillets- β arrangés en anneau, qui ressemble à une hélice de bateau. Chacun des 'WD-repeat' est formé de deux dimères de résidus Tryptophane-Aspartate (WD) et de Glycine-Histidine (GH) séparés par une région variable de 40 acides aminés (Tam et Saier, 1993). Cette forme en anneau expose deux surfaces distinctes (comme montré à la Figure 6, page 17). La fonction de ces surfaces n'est pas très bien caractérisée, mais il semblerait qu'elles soient impliquées dans des interactions protéine-protéine. À la Figure 7, une interaction entre la sous-unité $G\alpha$ et l'une des deux surfaces exposées par la sous-unité $G\beta$ est observée.

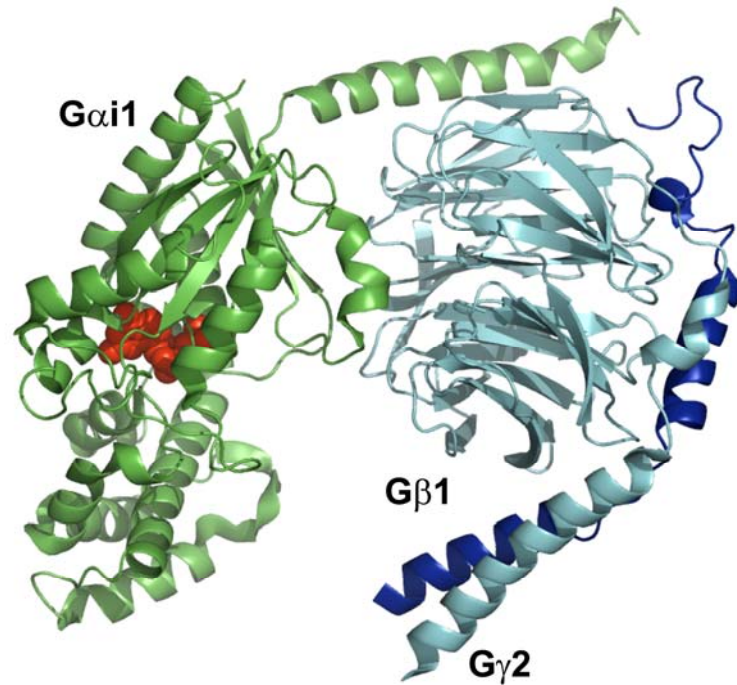


Figure 7: Structure de Gα et Gβγ

En vert la sous-unité Gαi1, en cyan la sous-unité Gβ1 et en bleu la sous-unité Gγ. Image produite avec PyMOL avec le PDB : 1GP2

L'implication de Gβγ dans la signalisation se fait à plusieurs niveaux en participant à l'activation des récepteurs, en influençant le cycle GTPasique de la sous-unité Gα ainsi qu'en permettant l'activation de certains effecteurs tels que certains canaux ioniques, la phosphatidyl-inositol 3'-kinase (PI3K), les PLC-β, les Src ainsi que l'activation des adénylates cyclases ACII, IV et l'inhibition des adénylates cyclases de type I (Schwindinger et Robishaw, 2001). De plus, le dimère participe directement à la désensibilisation des récepteurs en permettant le recrutement des kinases de la famille de GRK2 (Boekhoff *et al.*, 1994).

Assemblage du dimère $G\beta\gamma$

Comme mentionné plus tôt, $G\beta$ et $G\gamma$ forment un hétérodimère difficilement dissociable bien que non covalent (Hamm et Gilchrist, 1996). Cette interaction se fait via un enroulement des parties N-terminales de chacune des sous-unités (voir Figure 6, page 17). Contrairement à $G\alpha$ et $G\gamma$ dont l'expression dans un système bactérien est possible, la sous-unité $G\beta$ requiert une maturation supplémentaire que les bactéries ne sont pas en mesure de produire (Mende et al., 1995). Des $G\beta$ compétentes peuvent être synthétisées dans un système de réticulocyte de lapin pour former des interactions $G\beta\gamma$, mais seulement 30 à 50% des polypeptides synthétisés formeront des complexes. Ce faible pourcentage laisse croire que la synthèse de $G\beta$ pourrait être régulée par des protéines chaperonnes (Mende et al., 1995). Des résultats non publiés montrent que suite à l'immunoprécipitation de hsp90 (90 kDa heat shock protein), seule la forme non dimérique de $G\beta$ est co-immunoprécipitée et non le complexe $G\beta\gamma$. Cette observation suggère que la formation d'un dimère $G\beta\gamma$ fonctionnel nécessite une ou plusieurs protéines chaperonnes.

Modifications lipidiques des protéines G

Pour remplir leurs fonctions, les protéines G, synthétisées dans le cytosol, doivent subir une modification lipidique nécessaire à leur acheminement vers la membrane plasmique. Deux types de modifications lipidiques dans la portion N-terminale de la sous-unité $G\alpha$ ont été décrites dans la littérature. Toutes les sous-unités $G\alpha$ subissent une palmitoylation, mais les sous-unités α_i , α_o et α_z sont également myristoylées. Les myristates, des chaînes d'acides gras de 14 carbones, sont ajoutés directement lors de la synthèse des $G\alpha$ et leur liaison est irréversible, tandis que les palmitates, des chaînes d'acides gras de 16 carbones, sont ajoutés post-traductionnellement à la protéine et leur attachement est réversible (Evanko et al., 2000). Dans le cas du dimère $G\beta\gamma$, les sous-unités $G\gamma_1$, γ_9 et γ_{11} sont modifiées par un farnésyl, une chaîne d'acides gras de 15 carbones, suite à leur traduction. Pour les autres

G γ , un groupe geranylgeranyl, une chaîne d'acides gras de 20 carbones, est plutôt ajouté pour permettre leur acheminement à la membrane plasmique (Schwindinger et Robishaw, 2001). La conséquence fonctionnelle de ces différentes modifications lipidiques sur les sous-unités G γ n'est, à ce jour, pas complètement comprise (Takida et Wedegaertner, 2003). La fixation irréversible des groupements prényles s'effectue sur un résidu cystéine du motif CAAX (où C est une cystéine, A est un acide aminé aliphatique et X peut être différents acides aminés) du côté C-terminal de la protéine (Gelb *et al.*, 1998). La prénylation de la boîte CAAX est bien connue et se produit par un mécanisme en trois étapes : Suite à l'ajout de groupement prényl, la partie AAX est protéolysée, puis le carboxylate terminal du résidu cystéine est méthylé (Clarke, 1992).

Il a été démontré dans la littérature que G $\beta\gamma$ n'est pas ciblé efficacement vers la membrane plasmique lorsqu'exprimé transitoirement dans des cellules embryonnaires de rein humain (HEK293), mais qu'une co-expression avec G α augmente le ciblage à la membrane plasmique (Evanko *et al.*, 2001). Ceci laisse croire que l'information nécessaire à un bon acheminement de G $\beta\gamma$ n'est pas uniquement dictée par le dimère, mais que l'interaction avec G α favorise ce ciblage. D'autres protéines prénylées, telles les petites GTPases de la super famille Ras, requièrent un second signal pour être dirigées vers la membrane plasmique. H-Ras et N-Ras possèdent un site de palmitoylation en amont du motif CAAX. K-Ras, quant à elle, possède une séquence de lysines polybasiques adjacentes au résidu cystéine prénylé (Clarke, 1992). La mutation de ce second signal retient ces protéines mutantes dans le réticulum endoplasmique. Contrairement aux petites GTPases, le dimère G $\beta\gamma$ ne possède ni cystéine palmytoylée ni séquence de lysines polybasiques lui permettant un ciblage approprié vers la membrane plasmique. Par conséquent, G α jouerait le même rôle que le second signal pour les protéines Ras pour l'acheminement du dimère G $\beta\gamma$ à la membrane plasmique.

Activation et désactivation de la protéine G

Selon le modèle classique (voir Figure 8, page 23), l'activation du récepteur par son agoniste entraîne le recrutement de la protéine G hétérotrimérique et accélère l'échange du GDP en GTP au niveau de la sous-unité $G\alpha$. Cet échange GDP/GTP provoque une dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ qui se détachent du récepteur. Chacune de leur côté, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ ont la capacité de réguler l'activité de différents effecteurs soit indépendamment, en synergie ou de façon antagoniste (Gilman, 1987). Suite à l'hydrolyse du GTP en GDP par $G\alpha$, qui possède une activité GTPasique intrinsèque, le complexe $G\alpha\beta\gamma$ se reforme et est prêt pour un autre cycle d'activation par les récepteurs (Gilman, 1987). En plus des RCPG, il a été montré dans le cas des sous-unités de la famille $G\alpha_i$ que d'autres protéines sont en mesure d'activer la signalisation des protéines G sans l'intervention de récepteurs. Ces protéines sont nommées activateurs de la signalisation des protéines G hétérotrimériques (AGS) (Cismowski *et al.*, 2001). Il existe trois classes d'AGS, la classe I qui agit comme les RCPG en activant l'échange GDP/GTP, la classe II qui stabilise la forme $G\alpha$ /GDP et la classe III qui permet le relâchement du dimère $G\beta\gamma$ sans initier l'échange GDP/GTP (Lanier, 2004).

L'activité GTPasique ainsi que la réassociation de $G\alpha$ à $G\beta\gamma$ sont sujettes à plusieurs régulations par des protéines accessoires comprenant la famille des régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS). Les RGS stimulent l'activité GTPasique de la protéine $G\alpha$, favorisant ainsi un retour rapide à l'état inactif (Koelle, 1997). Les $G\beta\gamma$ peuvent également subir une régulation par des protéines accessoires. Par exemple, la phosducin fixe le dimère $G\beta\gamma$ et l'empêche de se réassocier avec la sous-unité $G\alpha$ (Schulz, 2001).

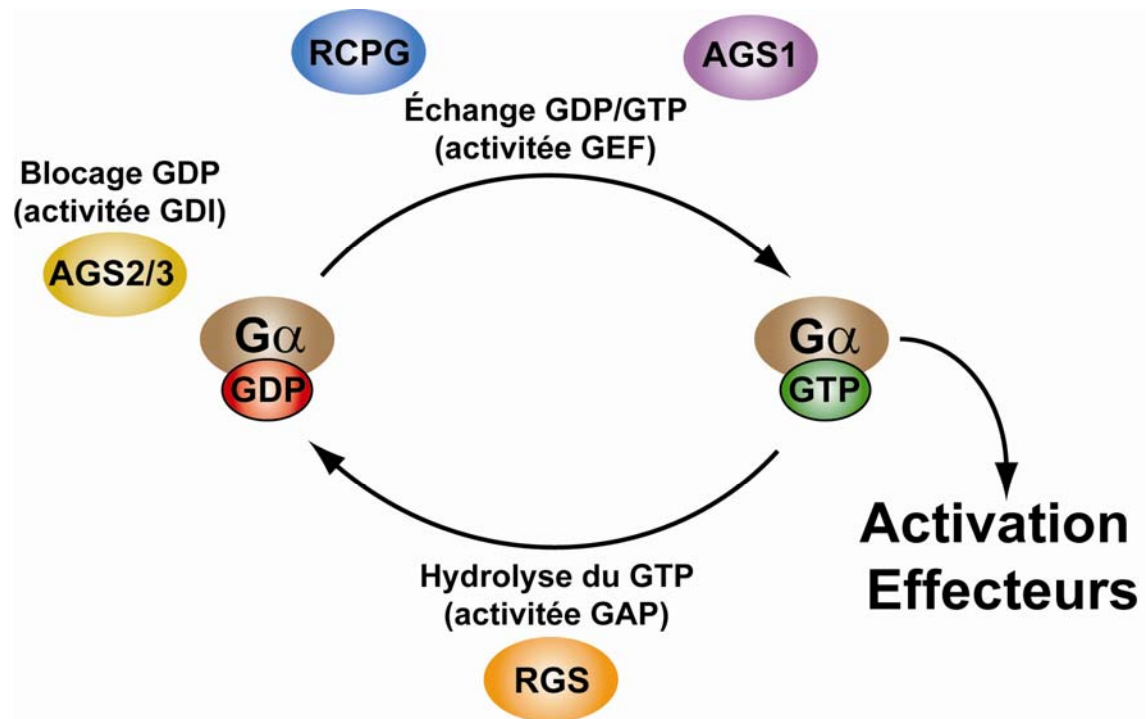


Figure 8: Cycle d'activation / désactivation de $G\alpha$

La liaison du GDP/GTP permet de contrôler l'activité des protéines G et dans le cas des $G\alpha$, deux types de protéines peuvent permettre cet échange, soit les RCPG (en bleu) et les AGS (en mauve). Une fois liées au GTP, les $G\alpha$ peuvent activer différents effecteurs. Afin de mettre fin à cette signalisation, certaines protéines GAP, les RGS (en orange), vont accélérer l'activité GTPase des $G\alpha$. Finalement, certaines protéines ont comme fonctions de garder les $G\alpha$ en formes inactives liées au GDP, les AGS2/3 (en jaune).

De nouveaux résultats remettent en doute le mécanisme classique d'activation de la protéine G par les RCPG. Chez la levure, la reproduction sexuée est régie par une signalisation passant par un récepteur de type RCPG. Sous la forme haploïde, la levure *Saccharomyces cerevisiae* exprime les gènes *gpa1*, *ste4* et *ste18* qui traduisent respectivement les protéines $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ (Klein *et al.*, 2000). La fixation d'une phéromone sur son récepteur active la protéine G hétérotrimérique, provoquant ainsi la stimulation de la voie de signalisation responsable de l'accouplement via $G\beta\gamma$ (Klein *et al.*, 2000). Chez des levures haploïdes stériles n'exprimant pas le gène *ste4* ($G\beta$), une protéine de fusion entre STE4 et GAP1 a été exprimée (protéine de fusion entre $G\alpha$ et $G\beta$). Les

résultats ont démontré que l'expression de cette protéine de fusion active aussi bien la voie de l'accouplement que la co-expression des ces mêmes protéines non-fusionnées (Klein *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent que la dissociation de l'hétérotrimère de protéines G n'est pas essentielle pour leurs fonctions. Également, des travaux réalisés par le groupe du Dr. Lohse ont démontré, en utilisant la technique de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) que la protéine G n'est pas dissociée suite à son activation. Selon la position du fluorophore sur la sous-unité $G\beta$, le transfert d'énergie du donneur fusionné à $G\alpha$ vers l'accepteur fusionné à $G\beta$ est augmenté ou diminué, démontrant la présence d'un changement de conformation plutôt qu'une dissociation au niveau du complexe $G\alpha\beta\gamma$ (Bunemann *et al.*, 2003). Contrairement au mécanisme classique d'activation de la protéine G, la dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ ne semble pas être nécessaire à l'activation des voies de signalisation.

Dans le laboratoire du Dr. Michel Bouvier, des résultats pointant vers les mêmes conclusions ont été obtenus lors d'études d'interactions protéine-protéine en temps réel. En utilisant la technique de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), qui sera décrite en détail ultérieurement, une interaction basale entre les RCPG et les protéines $G\alpha$, $G\beta$ ou $G\gamma$ a été mesurée (Gales *et al.*, 2005). Suite à l'activation du récepteur par son agoniste, une augmentation ou une diminution, selon le cas, très rapide du signal BRET a été observée. Ces résultats indiquent que les protéines G sont à proximité des RCPG et que la liaison d'un agoniste sur le récepteur produit un changement de conformation qui modifie cette proximité. Par conséquent, les RCPG ne recrutent pas tous les protéines G tel qu'établit par le modèle classique, il peut avec des cas où la protéine G serait pré-couplée et d'autre où la protéine G serait recrutée, et surtout la protéine G hétérotrimérique ne semble pas quitter le récepteur et ne semble pas se dissocier en $G\alpha$ et dimère $G\beta\gamma$ suite à son activation (Gales *et al.*, 2005).

Interactions entre les RCPG et les protéines G

L'interaction entre les récepteurs et les différentes sous-unités de la protéine G est au cœur même de la spécificité d'activation des voies de signalisation. Par exemple, un récepteur qui possède la capacité de lier la sous-unité $G_{\alpha q}$ et de l'activer, est en mesure de mobiliser le calcium intracellulaire suite à son activation (Wess, 1998). Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer l'activation sélective des sous-unités de la protéine G par les RCPG dont :

- 1- La co-expression de RCPG avec les différentes sous-unités en cellules vivantes. Cette méthode permet de mesurer rapidement l'effet de la surexpression des sous-unités G_{α} sur les différents effecteurs, par contre comme les récepteurs ainsi que les protéines G_{α} sont surexprimés, ce n'est pas toutes les combinaisons fonctionnelles qui peuvent être retrouvées physiologiquement. Ce type d'expérience permet simplement d'identifier les couples possibles (Wess, 1998).
- 2- Les expériences de reconstitutions *in vitro* sont utilisées pour déterminer la sélectivité d'activation. Dans ce type d'expérience les récepteurs et les protéines G_{α} sont purifiées séparément, puis ils sont mis en contact de façon combinatoire. L'activation de la protéine G_{α} est directement mesurée par l'incorporation d'un analogue du GTP, le GTP γ S (radioactif). Il est donc possible de mesurer l'efficacité d'activation des sous-unités de la protéine G directement, par contre comme les mesures sont effectuées *in vitro*, les différentes régulations cellulaires de l'activation d'un RCPG sont perdues (Wess, 1998).
- 3- L'immuno-neutralisation peut également permettre de déterminer le type de protéines G_{α} engagées par un RCPG. Dans ce type d'expérience, un anticorps dirigé contre la portion C-terminale des protéines G_{α} , préalablement démontrée comme importante dans la sélectivité d'activation des protéines G_{α} , est introduit dans les cellules ou extraits cellulaires, pour bloquer sélectivement $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, et $G_{\alpha i}$. L'interaction de l'anticorps sur les protéines G bloque le domaine C-terminal des G_{α} ce qui inhibe l'activation de ces protéines G_{α} par les récepteurs. Cette méthode permet uniquement de révéler l'utilisation directe des protéines G_{α} par les récepteurs et peut difficilement être réalisée sur des modèles de cellules entières, car les anticorps doivent être micro-injectés ou

introduits dans les cellules par des liposomes (Wess, 1998). 4- Finalement la sélectivité d'interaction entre les récepteurs et les protéines $G\alpha$ peut être mesurée par l'immunoprécipitation de récepteurs suivie par la révélation par immunobuvardage de la présence des protéines G. Cette technique va permet de mesurer uniquement les interactions fortes entre les récepteurs et les protéines, car l'utilisation de détergents pour lyser les cellules et solubiliser les récepteurs peut affecter le couplage de certaines interactions (Wess, 1998).

Au niveau du récepteur, ce sont les boucles intracellulaires qui sont responsables du contact avec la protéine G. Il a été démontré pour le récepteur muscarinique m2 et plusieurs autres récepteurs de la famille 1 que l'extrémité C-terminale de la boucle i3 est responsable de la spécificité d'interaction avec le protéine G_i/o (Liu *et al.*, 1996a). Pour les récepteurs de la classe 3, la boucle i2 serait plutôt l'élément de spécificité d'interaction avec la protéine G. En effet, pour le récepteur mGlu3, normalement couplé à G_i/o , le remplacement de la boucle i2 par celle du récepteur mGlu1, couplé à $G_q/11$, rend ce récepteur chimère capable de signaler comme un récepteur couplé à G_q (Francesconi et Duvoisin, 1998). Pour ce qui est de la boucle i3, elle est hautement conservée dans la classe III et joue un rôle clé dans l'efficacité du couplage avec la protéine G, plutôt qu'au niveau de la sélectivité de ce couplage (Chen et Manning, 2001).

En ce qui a trait à la protéine G, la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ semblent interagir avec le récepteur (Hamm, 1998). La sous-unité $G\alpha$ joue un rôle crucial dans la spécificité de reconnaissance par les récepteurs. Il a été montré que les cinq derniers acides aminés de la sous-unité $G\alpha$ sont essentiels pour la sélectivité d'activation des $G\alpha$ par les récepteurs (Blahos *et al.*, 1998). Lorsqu'il est ADP-ribosylé par la PTX, le résidu cystéine en position -4 de $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ et $G\alpha_t$, entraîne un découplage de la protéine G du récepteur (Umemori *et al.*, 1997). La sous-unité $G\alpha_q$ possède plutôt un résidu tyrosine en position -4 qui doit être phosphorylé pour un couplage efficace avec les récepteurs (Umemori *et al.*, 1997). De plus, il est possible de réaliser une sous-unité $G\alpha_q$ chimérique avec les cinq derniers résidus de

$G\alpha_i$, de $G\alpha_o$ ou de $G\alpha_t$. Lorsque cette protéine $G\alpha_q$ chimérique est co-exprimée avec des récepteurs normalement couplés à $G\alpha_i$, une augmentation de la production de DAG et IP₃, des seconds messager liés à l'activation de $G\alpha_q$, est mesurée suite à la stimulation du récepteur par son agoniste, confirmant l'importance des derniers acides aminés de $G\alpha$ pour la sélectivité d'activation par les RCPG (Blahos *et al.*, 1998). Le dimère $G\beta\gamma$ est aussi en interaction avec le récepteur. Les soixante résidus C-terminaux de $G\beta$ interagissent avec le récepteur α_2 -adénergique, indiquant que cette portion du C-terminal de $G\beta$ semble importante pour l'interaction de la protéine G hétérotrimérique avec les récepteurs (Taylor *et al.*, 1996). Finalement, l'extrémité C-terminale de $G\gamma$ serait en contact avec le récepteur lors de son activation (Ernst *et al.*, 2000).

Voies de signalisation et interactions croisées (cross-talk)

De par leur fonction importante dans l'homéostasie cellulaire, les RCPG ont la capacité d'engendrer une grande variété de voies de signalisation différentes passant de la formation de seconds messagers (AMPc, GMPc, DAG, IP₃ et calcium), à la régulation de l'ouverture de canaux ioniques, à l'activation de différentes GTPases (RhoA, Rac, Cdc42, Tubuline et autres) ainsi qu'à l'activation de plusieurs types de kinases (PKA, PKC/PKD, Src, MAP-kinase, JNK et récepteurs à activité tyrosine kinase).

Un des seconds messagers les plus connus produit suite à l'activation de certains récepteurs, est l'AMPc. La concentration cytoplasmique de ce second messager est fortement contrôlée par la régulation de deux groupes d'enzymes, qui dans un cas produit l'AMPc à partir de l'ATP (adenylates cyclases) et dans l'autre cas le dégrade (phosphodiesterases). Chez les mammifères, neuf isoformes d'adenylates cyclases (AC) transmembranaires (AC1 – AC9) et une isoforme soluble présente uniquement dans les

testicules, sont connues à ce jour. Toutes les isoformes transmembranaires sont activées par *G α s* et certaines sont inhibées par le dimère *G $\beta\gamma$* de *G α i* (AC1, AC5 et AC6). Par contre, les isoformes AC2, AC4 et AC7 sont plutôt activées par le dimère *G $\beta\gamma$* (Sunahara et Taussig, 2002). De son côté, la famille des phosphodiésterases contient onze membres (PDE1-PDE11), dont les isoformes PDE4, PDE7 et PDE8 qui sont sélectives pour l'hydrolyse de l'AMPc et les isoformes PDE5, PDE6, et PDE9 plutôt sélectives pour l'hydrolyse du GMPc. Les autres isoformes de la famille des phosphodiésterases sont non-sélectives (PDE1, 2, 3, 10, et 11) (Halpin, 2008). Il a été proposé que *G α t* puisse interagir avec des phosphodiésterases (PDE) sélectives pour l'hydrolyse du GMPc, et l'échange du GDP pour du GTP permettrait l'activation de ces PDE dans les cellules de la rétine (Artemyev et al., 1992). En parallèle, l'analyse de la structure de *G α gust*, une protéine *G α* exprimée sélectivement dans les cellules du goût, laisse croire que cette sous-unité *G α gust* pourrait comme *G α t*, réguler l'activité des PDE (McLaughlin et al., 1994). Ces résultats montrent qu'une modulation directe de l'activité des PDE est possible par des sous-unités *G α* , puisque plusieurs autres sous-unités *G α* (*G α i*, *G α o*, *G α s*) peuvent interagir avec des PDE (Otto-Bruc et al., 1994), par contre la fonction de ces interactions *G α /PDE* reste à déterminer. Une modulation indirecte par les RCPG des PDE est possible par la phosphorylation des PDE via PKA (Ahlstrom et Lamberg-Allardt, 1997) ou PKC (Michie et al., 1998). Par conséquent, la régulation de l'activité des PDE s'effectue directement par la production d'AMPc/GMPc et l'interaction avec les protéines *G α* , ou indirectement par l'activation des kinases en aval des seconds messagers produits par l'activation des RCPG.

L'augmentation de la concentration et la fixation d'AMPc permet l'activation de deux types de protéines effectrices : 1) la protéine kinase A (PKA), qui est composée de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques, est une protéine à activité kinase impliquée dans la phosphorylation de protéines importantes pour la régulation du métabolisme ainsi que pour la prolifération, différenciation et apoptose cellulaire (Bossis et Stratakis, 2004), 2) la protéine facteur d'échange de la guanine de Rap de type 3

(RAPGEF3 ou EAPC) qui est une GEF qui active les GTPases Rap-1 et Rap-2 suite à la liaison d'AMPc (Bos, 2006). Ces GTPases sont impliquées dans le contrôle de l'adhésion cellulaire régulé par certaines intégrines et la formation de jonctions cellulaires régulée par des cadhérines (Bos, 2003).

Le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) sont deux seconds messagers importants produits suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate par une enzyme phospholipase spécifique aux phosphoinositide de type C (PLC). Le DAG et l'IP3 vont induire la transduction de voies de signalisation via l'activation de la protéine kinase C (PKC) et la libération de calcium intracellulaire. Présentement chez les mammifères, treize isoformes de PLC ont été identifiées et elles se divisent en six sous groupes : PLC- β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ et - η (Suh *et al.*, 2008). Les isoformes PLC- β sont régulées par l'activation des protéines G insensibles à la PTX de la famille G α_q et via le dimère G $\beta\gamma$ des sous-unités de la famille G α_i

Une fois produit par les PLC, le DAG lie un domaine spécifique au niveau des PKC et permet leur activation. Les PKC se divisent en deux sous familles : les isoformes classiques (cPKC- α , - β_1 , - β_2 , et - γ) qui sont sensibles au calcium et les isoformes nouvelles (nPKC - δ , - ϵ , - ζ et - θ) qui sont indépendantes du calcium (Griner et Kazanietz, 2007). Le domaine de liaison aux DAG n'est pas unique aux PKC, il est également présent sur des GAPs de Rac (Chimaerins) et des GEFs de Ras (RasGRPs), ce qui augmente la complexité de la signalisation par les RCPG (Griner et Kazanietz, 2007).

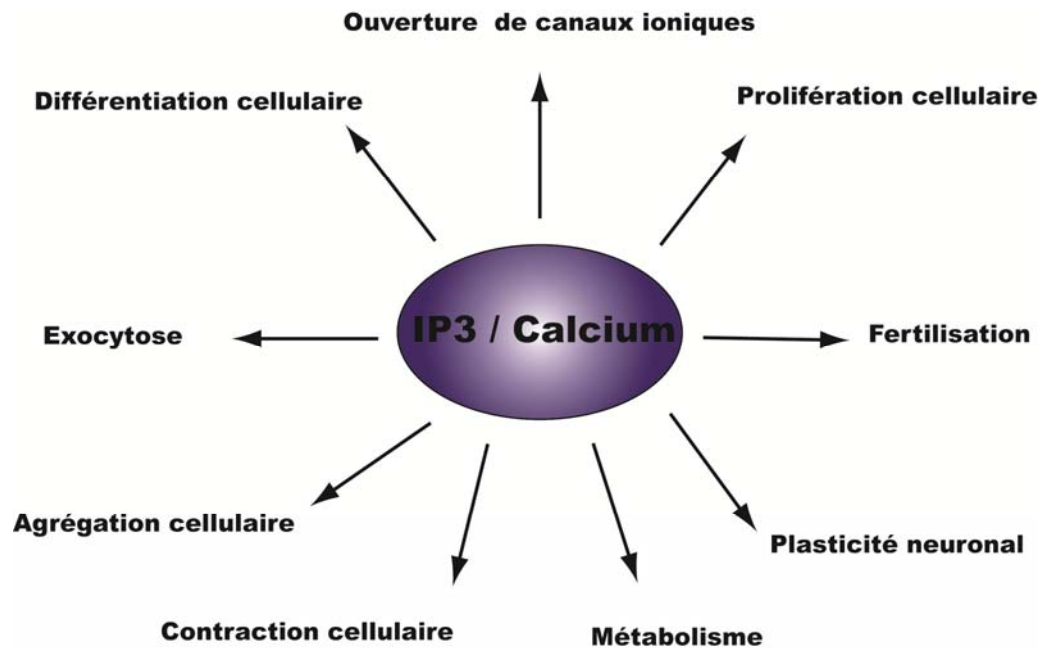


Figure 9: Fonctions biologiques du calcium

Le calcium est un ion métallique très important dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques (voir Figure 9, page 30) (Berridge, 2009). Du fait que le calcium est impliqué dans l'activation de plusieurs voies de signalisation, sa concentration cytoplasmique est hautement régulée, comme en fait foi l'écart entre sa concentration cytoplasmique et extracellulaire, d'environ 1 mM et 100 nM respectivement (Mikoshiba, 2007). Différents mécanismes permettent le maintien d'un faible niveau de calcium cytoplasmique, tels que le pompage du calcium à l'extérieur de la cellule via des pompes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localisées au niveau de la membrane plasmique, et également la présence de pompes de type ATPase réticulum sarcoendoplasmique (SERCA) au niveau du réticulum endoplasmique (Puzianowska-Kuznicka et Kuznicki, 2009).

L'homéostasie du calcium est un processus cellulaire qui est fortement régulé et l'activité de plusieurs protéines nécessite leur liaison au calcium, comme par exemple la

calmoduline, la chaîne légère de la myosine, la parvalbumine, les protéines S-100 ainsi que les calbindins 9- et 28 kDa, possédant tous un domaine similaire composé de deux hélices alpha, E et F, séparées par une boucle de fixation du calcium (Weinman, 1991). La caractéristique commune à toutes les protéines fixant le calcium est leur capacité à moduler l'activité de différentes enzymes, comme par exemple la protéine kinase dépendante du Calcium/calmoduline (CAMK1) qui est activée lorsque fixée par la calmoduline (Haribabu *et al.*, 1995).

Tout comme le pompage extra-cytoplasmique, l'entrée du calcium dans les cellules est fortement régulée via des canaux ioniques qui vont permettre l'entrée du calcium extracellulaire ou la libération du calcium par le réticulum endoplasmique. Les canaux calciques membranaires sont divisés en deux grandes familles selon qu'ils soient voltage dépendants ou non. Les canaux calciques voltage dépendant (VGCCs), principalement exprimés dans les neurones, vont s'ouvrir en fonction de la polarisation de la membrane cellulaire et peuvent être modulés par les récepteurs couplés aux protéines G (Dolphin, 2009). De leur côté, les canaux calciques indépendants du voltage se subdivisent en trois sous familles; (1) les canaux opérés par des récepteurs (ROC) qui sont soit activés par la fixation de ligands ou soit, dans la majorité des cas, activés par des seconds messagers, (2) les canaux opérés par les réserves calciques (SOCs) qui vont être activés par l'appauvrissement des réserves intracellulaires, (3) et les canaux opérés par les stress mécaniques qui vont être activés par l'étirement de la membrane plasmique (Guibert *et al.*, 2008).

Parallèlement, la libération des réserves intercellulaires est régie principalement par deux types de récepteurs canaux; (1) les récepteurs à la ryanodine, un alcaloïde de plante (Callaway *et al.*, 1994), qui sont régulés principalement par la phosphorylation via PKA (Herrmann-Frank et Varsanyi, 1993) et Cam-kinaseII (Dulhunty *et al.*, 2001), (2) les récepteurs aux IP3 qui vont permettre la libération du calcium via la fixation des IP3 (Berridge, 1984).

Interactions croisées des voies contrôlant les concentrations cytoplasmiques de calcium

La signalisation via le calcium est un mécanisme important dans plusieurs fonctions cellulaires et son niveau cytoplasmique est fortement contrôlé. L'entrée ou la libération de calcium par les différents canaux de la membrane plasmique et du réticulum peuvent être finement régulés par la convergence de plusieurs voies de signalisation distinctes en fonction des besoins cellulaires. Cette convergence de signaux peut se produire à toutes les étapes permettant l'élévation du calcium cytoplasmique, allant de l'amplification de la production des seconds messagers responsables de l'ouverture des canaux à l'inhibition de la recapture du calcium par le réticulum endoplasmique. Ces convergences de signaux sont appelées interactions croisées (en anglais, crosstalk) des voies de signalisation (Werry *et al.*, 2003).

Le contrôle de la production des seconds messagers DAG et IP3 est peut-être l'un des plus évidents et plus directs mécanismes de la régulation du calcium cytoplasmique. Tel que décrit précédemment, l'activation des PLCs permet de produire ces deux seconds messagers importants dans la signalisation via le calcium (Werry *et al.*, 2003). L'augmentation de l'activité de ces enzymes va au final augmenter la concentration cellulaire de calcium. Il a été démontré que les PLC- β peuvent être régulées de façon synergique par G α_q et le dimère G $\beta\gamma$ de G α_i . Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette synergie demeurent mal caractérisés (Zhu et Birnbaumer, 1996). Il a été proposé que la fixation différentielle et simultanée des différentes sous-unités de la protéine G permettrait de réguler l'activité des PLC- β via un changement de conformation de l'enzyme, ce qui favoriserait son activité enzymatique (Smrcka et Sternweis, 1993). De plus, il a été démontré que l'inhibition de la PLC suite à sa phosphorylation par les kinases PKC pouvait être renversée par le dimère G $\beta\gamma$, ce qui résulte en une augmentation de production de DAG et d'IP3 (Smrcka et Sternweis, 1993).

Un autre exemple d'interaction croisée entre deux voies de signalisation régulant la concentration calcique provient des récepteurs couplés aux Gas qui dans certaines conditions peuvent promouvoir ou inhiber l'activité des PLC- β via l'activation de la kinase PKA. Il a été démontré que la phosphorylation de PLC- β par PKA peut inhiber la formation de DAG et d'IP3 dans certaines conditions (Laglia *et al.*, 1996), alors que dans d'autres conditions cellulaires, le DAG et l'IP3 sont produits en plus grande quantité (Blackmore et Exton, 1986).

Il est également possible de réguler l'activité des PLC indirectement par une limitation du substrat, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂), essentiel à production de DAG et d'IP3. Il a d'ailleurs été démontré que l'augmentation de l'activité des enzymes PtdIns 4-kinase et PtdIns(4)P 5-kinase responsables des dernières phosphorylations du PtdIns(4,5)P₂ est impliquée dans l'augmentation de la signalisation calcique suite à l'activation de certains récepteurs (Stephens *et al.*, 1993). Par exemple, il a été proposé que l'activation du récepteur muscarinique de type 3 (M3R) dans les cellules HEK293 entraîne une augmentation de la production de PtdIns(4,5)P₂, ce qui permet d'amplifier la réponse calcique obtenue via l'activation d'autres récepteurs (Schmidt *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que la GTPase RhoA est capable d'activer la PtdIns(4)P 5-kinase (Chong *et al.*, 1994) et que G α q peut stimuler RhoA (Chikumi *et al.*, 2002), par conséquent il est possible d'imaginer des interactions croisées entre ces deux voies de signalisation.

La signalisation par la voie calcique peut également être régulée au niveau de la modulation de la libération du calcium retenu dans le réticulum endoplasmique, suite à la régulation de l'ouverture des canaux/récepteurs d'IP3. Par exemple, la phosphorylation par la kinase PKA, activée par l'élévation d'AMPc suite à l'activation de RCPG, peut sensibiliser l'ouverture des récepteurs-canaux IP3 (Chikumi *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que le dimère G $\beta\gamma$ de G α i est capable de lier directement le récepteur IP3 pour ainsi permettre

son ouverture (Zeng *et al.*, 2003). Ces différents exemples illustrent à nouveau que des interactions croisées entre plusieurs voies de signalisation peuvent permettre de favoriser l'augmentation de calcium.

Effet de la dimérisation sur les interactions croisées

La formation de complexes réceptoriels comprenant plus d'un récepteur, permettant dans certains cas de réguler la localisation ainsi que la fonction des RCPG, est un autre exemple d'interactions croisées. Cette influence par oligomérisation (homo- ou hétéro-) peut s'effectuer à trois niveaux; (1) en modifiant la capacité de lier les ligands, (2) en transposant la signalisation typique d'un récepteur à l'autre et (3) en changeant le couplage de la protéine G effectrice.

(1) La modification des propriétés de liaison des ligands par l'hétérodimérisation a été découverte pour certains récepteurs, qui démontrent une augmentation de l'affinité à leurs agonistes sans changer la spécificité de liaison aux autres ligands, comme dans le cas de l'hétérodimère du récepteur somatostatine sst5 et du récepteur à la dopamine D1 (Rocheville *et al.*, 2000), ou le cas de des récepteurs 5-HT avec le récepteur canabinoïde CB1 (Devlin et Christopoulos, 2002). Cette augmentation d'affinité peut conduire à l'activation de nouvelles voies de signalisation qui autrement seraient impossibles d'accès, car les effecteurs de ces voies ne sont que faiblement activés par chacun des récepteurs individuellement et que seule l'augmentation du nombre de récepteurs activés permet de franchir le seuil minimum pour engager ces nouvelles voies de signalisation. Par contre, il est plus ou moins clair si ce mécanisme est mis de l'avant pour une augmentation de la mobilisation de calcium (Werry *et al.*, 2003).

(2) La transposition d'une voie de signalisation d'un récepteur à un autre récepteur est possible dans le cas de récepteurs couplés de façon différentes à deux voies de

signalisation. Ainsi l'activation d'un récepteur donné, interagissant avec un deuxième récepteur, peut entraîner l'activation des voies de signalisation de ce deuxième récepteur. Concrètement, la dimérisation entre le récepteur à l'angiotensine AT1 et le récepteur à la bradykinine B2 permet au récepteur B2 de présenter la protéine $G_{\alpha q}$ au récepteur AT1, qui lorsqu'activé, entraîne une réponse calcique (AbdAlla *et al.*, 2000). Par conséquent, la dimérisation de B2 et AT1 permet la formation d'un complexe présentant les effecteurs de la signalisation calcique au récepteur AT1.

(3) Finalement, la dimérisation peut également influencer le couplage aux protéines G des récepteurs impliqués dans cette dimérisation. C'est le cas du dimère des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CCR5, tous deux couplés à $G_{\alpha i}$, qui deviennent couplés à $G_{\alpha q}$ lorsque sous forme hétérodimérique. Lorsqu'exprimés seuls, les récepteurs CCR2 et CCR5 sont capables d'activer la production de calcium via l'activation des PLC par le dimère $G_{\beta\gamma}$ de $G_{\alpha i}$, car ils sont influencés par la toxine PTX. Par contre, suite à leur co-expression, l'activation des PLC par CCR2 ou CCR5 devient insensible à la PTX, indiquant un changement de couplage (Mellado *et al.*, 2001). De façon similaire, la dimérisation entre les récepteurs dopaminergiques D1 et D2, respectivement couplés à $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha i}$, permet la mobilisation du calcium indépendamment de $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha i}$. La formation de l'hétérodimère permet un nouveau couplage des récepteurs à la sous-unité $G_{\alpha q}$, ce qui explique la mobilisation du calcium observée (Rashid *et al.*, 2007).

La dimérisation des récepteurs ouvre non seulement la question de la stœchiométrie récepteur / protéine G, mais questionne également l'impact de la présence de plusieurs types de protéines G différentes dans un même complexe sur les interactions croisées entre les voies de signalisation. Dans le cas d'hétérodimérisation entre des récepteurs couplés différemment à deux types de protéines G_{α} , est-il possible d'avoir les deux G_{α} différentes dans le même complexe ou bien existe-t-il deux populations de récepteurs distinctes couplés chacune à un type de protéines G?

Terminaison de la signalisation et désensibilisation

Afin de contrôler l'activité des RCPG, plusieurs mécanismes cellulaires sont mis de l'avant, et l'un de ces mécanismes est le recrutement de protéines régulatrices qui bloquent l'action du récepteur et permettent éventuellement son internalisation. Avant l'internalisation des RCPG, l'activité de ces derniers peut être bloquée par l'arrivée de kinases qui vont phosphoryler les récepteurs et ainsi empêcher les RCPG d'activer leurs différents effecteurs. Dans le cas de ligands hydrophiles, une fois à l'intérieur de la cellule les récepteurs n'ont plus accès aux ligands, ce qui permet de mettre fin à la signalisation des récepteurs. Suite à cette internalisation, les récepteurs sont soit recyclés soit dégradés. Afin d'être internalisés, les récepteurs peuvent emprunter différentes voies, mais les mieux caractérisées sont celles impliquant les puits tapissés de clathrine (Clathrin-coated pits; CCPs) (Wolfé et Trejo, 2007). Subdivisé en deux voies principales, l'acheminement des récepteurs dans les CCPs est régi par des séquences d'adressage contenues dans la portion C-terminale des récepteurs; (1) un motif à tyrosine (Y-x-x-Ø où Y représente une tyrosine, x n'importe quel acides aminés et Ø un gros résidu hydrophobe) et (2) un motif dileucine acide ([D/E]-X-X-X-L-[L/I], ou D/E représente des résidus acides, n'importe quel acides aminés, L une leucine et I une isoleucine) (Marchese *et al.*, 2008).

(1) Dans le cas du motif à tyrosine, la protéine adaptatrice à la clathrine AP-2 se fixe directement sur le récepteur via ce motif. La protéine AP-2 est composée de quatre sous-unités α , β 2, μ 2 et σ 2. La sous-unité μ 2 reconnaît directement le motif Y-x-x-Ø (Bonifacino et Traub, 2003). Pour que cette reconnaissance soit efficace, la tyrosine ne doit pas être phosphorylée. Le récepteur n'a pas besoin d'autres protéines facilitant le recrutement de la protéine AP-2 (Marchese *et al.*, 2008). Le récepteur prototypique de cette classe est le récepteur à la thrombine PAR1 qui est internalisé de façon constitutive, sans activation. Une mutation dans la séquence Y⁴²⁰KKL⁴²³ de ce récepteur entraîne la perte de cette internalisation constitutive (Paing *et al.*, 2006).

(2) Pour ce qui est du motif dileucine, la fixation de la protéine adaptatrice AP-2 se fait via un mécanisme qui implique la translocation d'une protéine d'échafaudage, l'arrestine. La phosphorylation des récepteurs par des kinases de type GRK permet de stabiliser leur interaction avec l'arrestine, en plus d'activer cette protéine d'échafaudage. L'un des récepteurs prototypique de cette famille est le récepteur adrénergique $\beta 2$ (Marchese *et al.*, 2008).

Selon le dogme, une fois activés par leurs agonistes, les récepteur vont recruter des kinases de type GRK qui vont les phosphoryler. Cette phosphorylation va permettre le recrutement de l'arrestine, qui à son tour permet le recrutement de la protéine adaptatrice AP-2. Une fois dans le complexe récepteuriel, AP-2 va provoquer l'arrivée et l'association en complexes des clathrines, formant ainsi des invaginations de la membrane plasmique créant les CCPs. Afin de finaliser la procédure d'internalisation des récepteurs, les dynamines, des GTPases, vont permettre la fermeture et le détachement des vésicules d'internalisation, donnant ainsi naissance aux endosomes (Claing, 2004). La phosphorylation initiale des récepteurs par les GRK semble être importante dans l'activation de l'arrestine plutôt que dans le recrutement en soi. En effet, la mutation du résidu responsable de la reconnaissance de l'état phosphorylé des récepteurs au niveau de l'arrestine, permet la fixation et l'activation de l'arrestine mutée à des récepteurs où leurs sites de phosphorylation ont été enlevés (Kovoor *et al.*, 1999).

De plus, le motif dileucine ne semble pas essentiel pour le recrutement de l'arrestine. Dans le cas du récepteur CCR2, la mutation du motif dileucine n'empêche pas le recrutement de l'arrestine, mais bloque l'arrivée de la protéine AP-2 dans le complexe, nécessaire pour permettre l'internalisation (Fan *et al.*, 2001). Ces résultats semblent indiquer que la présence des deux motifs, motif dileucine et motif de phosphorylation, sont essentiels pour la fonction de l'arrestine et de l'AP-2. En plus d'AP-2, la β -arrestine peut lier directement

la clathrine et cette interaction semble importante pour l'internalisation des RCPG induite par les agonistes (Krupnick *et al.*, 1997).

Famille des GRK

Les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) sont des protéines à activité kinase de la superfamille des kinases sérine-thréonine. Au niveau des RCPG, les GRK ont la capacité de phosphoryler différentes sérines ou thréonines, principalement concentrées dans la troisième boucle intracellulaire ainsi que dans la queue C-terminale, par contre aucun site consensus de phosphorylation n'a été attribué à ces kinases jusqu'à présent. En plus d'être impliquées dans la phosphorylation et la désensibilisation des RCPG, les GRK peuvent phosphoryler d'autres récepteurs membranaires tel que le récepteur au PDGF (Hildreth *et al.*, 2004), ainsi que différents substrats non réceptoriels tels que la tubuline, les synucléines, la phosphoducine, la protéine ribosomale P2 et autres (Penela *et al.*, 2003). En plus de leurs effets sur la signalisation via la phosphorylation de leurs substrats, les GRK contribuent également à la régulation de la signalisation cellulaire de façon indépendante de leur capacité de phosphorylation, grâce à leur capacité à interagir avec plusieurs protéines telles que les sous-unités $G\alpha_q$ et $G\beta\gamma$, la PI3K, la clathrine, les GIT, la caveoline, la MEK, protéine kinase B (PKB ou AKT) et la protéine inhibitrice de kinase RAF (RKIP) (Ribas *et al.*, 2007).

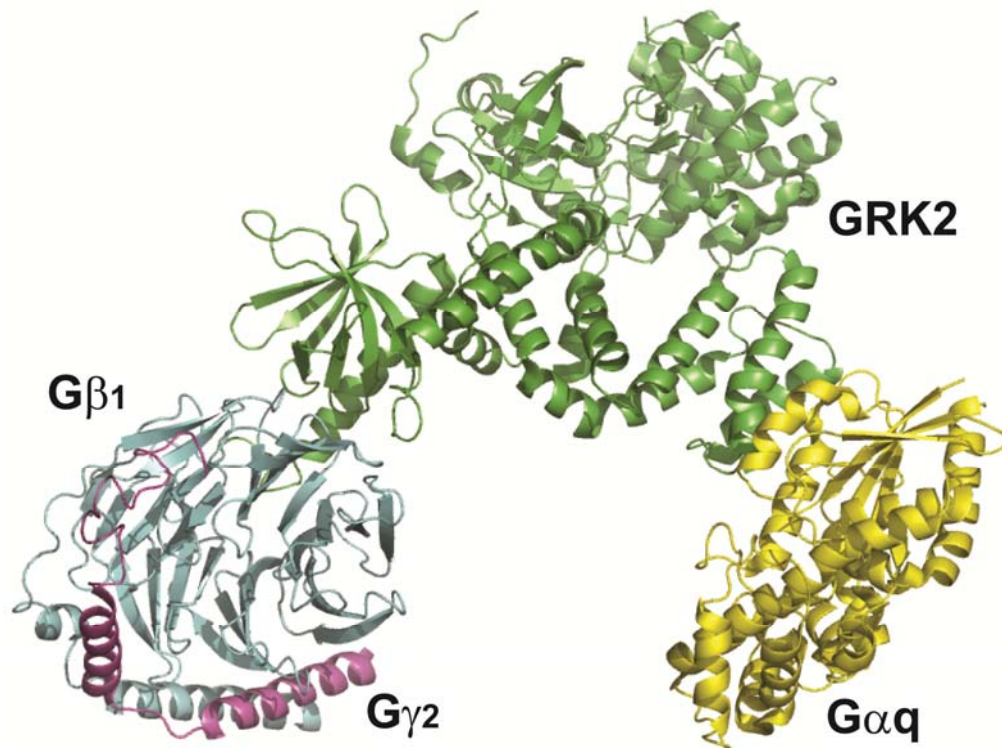


Figure 10: Structure de GRK2 en interaction avec la protéine G hétérotrimérique

En vert GRK2, en jaune la sous-unité $G\alpha_q$, en cyan la sous-unité $G\beta_1$ et en rose la sous-unité $G\gamma$. Image produite avec PyMOL avec le PDB : 2BCJ

Les GRK se divisent en trois familles: les GRK visuelles (GRK1 et GRK7), les GRK des β -adrénergiques (GRK2 et GRK3), et finalement la sous-famille GRK4 (GRK4, GRK5 et GRK6). Ces kinases partagent certaines caractéristiques, mais ont chacune leurs cibles préférentielles (Ribas *et al.*, 2007). De plus, elles partagent des architectures structurales similaires avec un domaine catalytique central d'environ 270 acides aminés, un côté N-terminal d'environ 180 acides aminés et un C-terminale plus variable, entre 105 et 230 acides aminés (Garcia-Higuera *et al.*, 1994). La partie N-terminale semble impliquée dans la reconnaissance des récepteurs et contient également un domaine RH, qui est un domaine retrouvé chez les aux régulateurs de signalisation des protéines G (RGS). Dans le cas des kinases GRK2/GRK3, ce domaine RH pourrait être impliqué dans la régulation de la

signalisation des RCPG sans phosphorylation, en se fixant au même site d'interaction que l'effecteur PLC sur Gαq (Carman *et al.*, 1999). Le C-terminal semble plutôt impliqué dans la localisation cellulaire pour toutes les GRK et plus spécifiquement dans l'adressage à la membrane plasmique via l'interaction avec Gβγ suite à la stimulation des RCPG, dans le cas de GRK2/GRK3 (voir Figure 10, page 39) (Kohout et Lefkowitz, 2003). Pour ce qui est des membres de la sous famille GRK4, des modifications lipidiques (GRK4 et GRK6) ou des séquences poly-basiques (GRK5), sont responsables de leur acheminement à la membrane plasmique (Willets *et al.*, 2003). Donc contrairement à GRK2/GRK3, les membres de la sous famille GRK4 sont constitutivement retrouvés à la membrane plasmique (Tran *et al.*, 2007).

Famille des arrestines

Les arrestines sont des protéines dites d'échafaudage, car leur fonction principale est de lier ensemble différentes protéines pour réguler leurs actions respectives. Outre la liaison de protéines, les arrestines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque. Les arrestines ont été découvertes originalement en tant que protéines complétant l'action des GRK dans l'arrêt de la signalisation des RCPG (Pfister *et al.*, 1985). Par la suite, il a été démontré que les arrestines jouent un rôle important dans l'internalisation des récepteurs via leur capacité à lier la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine (Goodman *et al.*, 1996) et plus récemment dans l'initiation de voies de signalisation alternatives tel l'activation des MAPK (McDonald *et al.*, 2000).

Les arrestines sont divisées en deux sous familles; les arrestines visuelles, uniquement présentes dans les cellules responsables de la vision (arrestine-1 et arrestine-3), et les β-arrestines ubiquitaires (β-arrestine1 et β-arrestine2). Les arrestines partagent toutes la même architecture structurale, constituée d'une structure allongée composée uniquement de feuillets bêta avec une seule hélice alpha. La structure se divise en deux sections, les

domaines N et C, représentant respectivement la région N et C terminale de la protéine (voir Figure 11, page 41) (Milano *et al.*, 2002). Ces deux domaines sont séparés par une région appelée noyau polaire (polar core), qui est composée de résidus chargés responsables de stabiliser la structure des arrestines (Milano *et al.*, 2002). Lors de la fixation de l'arrestine sur les récepteurs, ce noyau polaire est responsable des changements de conformation permettant les étapes subséquentes dans l'internalisation des récepteurs.

En plus de participer à l'internalisation des récepteurs, les arrestines ont été montrées comme étant des protéines d'échafaudage des composantes de la voie des MAP-kinases, et fixent ERK1/2 et Raf-1 (DeWire *et al.*, 2007). Ce rapprochement par les arrestines des différents membres d'une même cascade de signalisation permet une localisation spécifique et une meilleure efficacité de ces voies de signalisation.

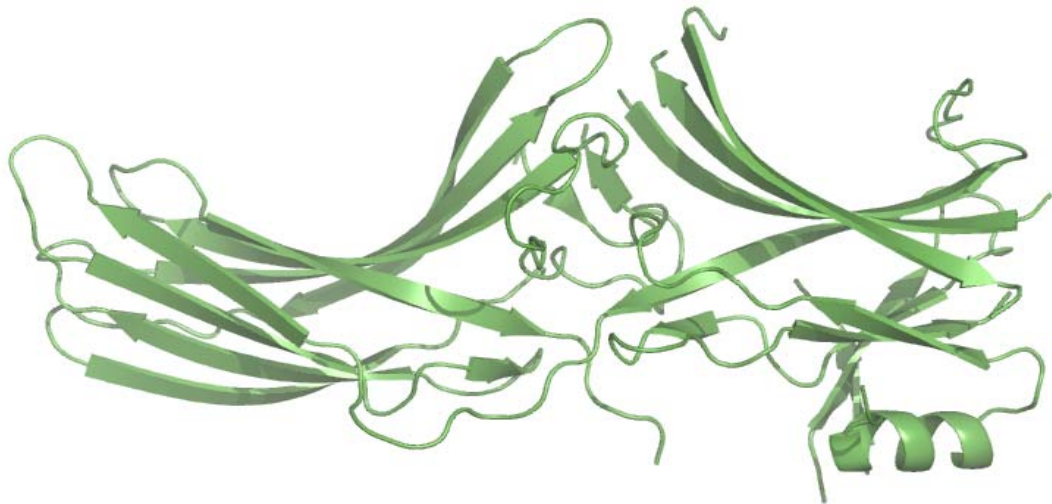


Figure 11: Structure de β -arrestin1

Image produite avec PyMOL avec le PDB : 3GC3

De plus, il a été démontré que β -arrestine2 interagit constitutivement avec ARNO, une protéine possédant une activité d'échangeur de GDP pour les ARF (ARF-GEF) (Claing, 2004). Également, β -arrestin2 lie ARF6, une GTPase, mais uniquement suite à la stimulation des récepteurs, ce qui permet de rapprocher ARNO de ARF6 deux protéines importantes dans l'endocytose des récepteurs (Salvador *et al.*, 2001). Cette observation très intéressante ouvre de nouvelles questions concernant la formation de complexes de plusieurs protéines avec un même récepteur. L'action de ARF6 sur le cytosquelette d'actine nécessite une activation/désactivation rapide. Toutefois, ARF6 a une activité GTPase régulée par un facteur d'activation d'activité GTPase (GAPs) essentiel pour l'hydrolyse du GTP (Salvador *et al.*, 2001). Les protéines GIT qui sont recrutées aux récepteurs via GRK2, possèdent cette fonction GAP (ARF-GAP) et permettent ainsi de stimuler l'activité GTPase de ARF6 (Salvador *et al.*, 2001). Par conséquent, la formation d'un super complexe GRK2/GIT (ARF-GAP), β -arrestine2/ARNO (ARF-GEF) sous un récepteur serait possible expliquant l'activation/désactivation rapide de ARF6 lors de l'internalisation des RCPG.

Récepteurs modèles

Récepteurs des opioïdes (récepteur delta opioïde)

L'existence de récepteurs pour les opiacés a été décrite pour la première fois en 1954, suite à des études de structure-fonction sur des séries chimiques basées sur les opiacés produits naturellement par le pavot (opium) (Beckett et Casy, 1954). Toutefois, la confirmation de la présence de ces récepteurs dans le cerveau a nécessité plusieurs années de recherche et l'élaboration de nouvelles méthodes d'analyse. Le marquage au tritium du naloxone, un antagoniste puissant des opiacés, a permis de démontrer une interaction spécifique pour cet antagoniste au niveau du cerveau des mammifères (Pert et Snyder, 1973). Suite à la

confirmation de la présence de récepteurs pour les opiacés, une vaste campagne de recherche de ligands endogènes a mené à la découverte des différentes enképhalines (Hughes *et al.*, 1975), de la β -endorphine (Cox *et al.*, 1976) et des dynorphines (Goldstein *et al.*, 1979), trois familles de ligands peptidiques pour les récepteurs opioïdes retrouvées dans le cerveau.

En parallèle, des études ont suggéré que l'action des opiacés soit due à une population hétérogène de récepteurs, plutôt que le résultat d'un seul type de récepteur. Le Dr. Martin et ses collègues ont proposé la présence de deux types de récepteurs opioïdes, basé sur leur observation de l'action différentielle de ligands analgésiques sur des réponses réflexes, les μ pour les récepteurs qui répondent à la morphine, et les κ pour les autres récepteurs répondant à la ketocyclazocine (Martin *et al.*, 1976). De plus, l'analyse pharmacologique des effets de différents peptides opiacés sur des modèles de souris a révélé la présence d'une troisième sous-famille de récepteurs, nommée delta (Lord *et al.*, 1977). Finalement, les trois gènes responsables de la synthèse des récepteurs μ , κ et delta ont été identifiés, permettant de confirmer les descriptions pharmacologiques réalisées 20 ans plus tôt.

Tableau IV: Différents récepteurs opioïdes et leurs ligands

Nomenclature recommandée	Ligands endogènes	Agonistes sélectifs	Antagonistes sélectifs	Agonistes inverses
μ , mu, MOR	β -endorphine enképhalines endomorphine-1 endomorphine-2	DAMGO PL017	CTOP Met-CAMO	
δ , delta, DOR	β -endorphine enképhalines	DPDPE SNC-80 Deltorphinell	naltrindole	TIPP ψ ICI 174,864 naltriben
κ , kappa, KOR	dynorphine A dynorphine B A-neoendorphine	U69593 CI 977 TRK820 U50488	nor-binaltorphimine	

Récepteur mu (MOR)

MOR est le récepteur le plus exprimé de tous les récepteurs opioïdes, et il est présent dans différentes régions du système nerveux central (Dhawan *et al.*, 1996). De plus, MOR est exprimé dans certaines fibres nerveuses dermiques et épidermiques (Stander *et al.*, 2002). Les fonctions du récepteur MOR sont multiples, passant de l'implication dans l'analgésie, la dépendance aux drogues, la réponse émotionnelle, le comportement d'attachement ainsi qu'une influence au niveau des systèmes de relâchement de certains neurotransmetteurs (dopamine, acétylcholine, glutamate, somatostatine). Les récepteurs MOR ont un rôle au niveau de la mémoire, de l'apprentissage et finalement au niveau de la réponse immunitaire ainsi que dans l'immunosuppression due à l'abus d'opiacés (Chefer *et al.*, 2003; Gaveriaux-Ruff *et al.*, 1998; Jamot *et al.*, 2003; Moles *et al.*, 2004; Morinville *et al.*, 2004; Tien *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2003).

En plus d'être considéré comme le récepteur principal de la morphine, MOR a plusieurs autres ligands endogènes (β -endorphine, les enképhalines ainsi que les endomorphines) et synthétiques (DAMGO et PL017) (voir Tableau IV, page 43). Le récepteur MOR est principalement couplé à la protéine G α i (Carter et Medzihradsky, 1993), ainsi l'engagement de cette sous-unité G α est important pour l'activation de diverses voies de signalisation telles que les ERK (Belcheva *et al.*, 2001), Jnk (Kam *et al.*, 2004), et STAT3 (Yuen *et al.*, 2004), en plus de permettre la translocation nucléaire de la calmoduline (Wang *et al.*, 2000), et finalement de favoriser l'expression et l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase) (Kam *et al.*, 2004). De plus il a été démontré que MOR pouvait stimuler les PKC via un couplage à G α 16, une sous-unité de la famille Gq (Lee *et al.*, 1998).

Tableau V: Ligands peptiques endogènes des opiacés et leur séquence en acides aminés

Enképhalines	Met5-enképhaline:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
	Leu5-enképhaline:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
	Met5-enképhaline-Arg6-Phe7:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe
	Met5enképhaline-Arg6-Gly7-Leu8:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu
Dynorphines	Dynorphine A:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
	Dynorphine B:	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Glu-Glu-Leu-Phe-Asp-Val
α -neoendorphine		Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
β -endorphine		Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Acn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
Deltorphines	Deltorphine:	Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH ₂
	Deltorphinell:	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂
	Deltorphinel:	Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂

Récepteur kappa (KOR)

Des études de radioliation ont démontré que le récepteur KOR est principalement distribué dans le système nerveux central (Mansour *et al.*, 1987), ainsi que dans certaines cellules immunitaires (Gaveriaux *et al.*, 1995). De par sa distribution, KOR semble impliqué dans la régulation de la température (Handler *et al.*, 1992), dans l'augmentation de l'ingestion de nourriture, ainsi que dans la diurèse de l'eau (Morley *et al.*, 1985; Pfeiffer *et al.*, 1986). De plus, certaines études semblent indiquer un rôle de KOR dans la modulation des fonctions dopaminergiques (Yuferov *et al.*, 2004).

L'existence du KOR a premièrement été proposée suite à des études réalisées avec la ketocyclazocine (Martin *et al.*, 1976), mais plusieurs ligands endogènes lui ont été attribués depuis; notamment les dynorphines A et B, ainsi que la α -neoendorphine (Goldstein *et al.*, 1979). Principalement couplé à Gai, KOR permet une diminution de l'activité des adénylates cyclases ainsi que la modulation de l'ouverture des canaux ioniques au potassium et calcium (Schoffelmeer *et al.*, 1988). De plus, KOR semble être en mesure de

stimuler l'échangeur Na^+/H^+ par une interaction avec NHERF-1/EBP50, via la famille $\text{Ga}_{12/13}$ (Huang *et al.*, 2004).

Malgré le fait qu'un seul gène codant pour le récepteur KOR a été découvert et qu'aucun épissage alternatif du gène n'a été montré, deux conformations actives du récepteur kappa ont été suggérées et nommées respectivement kappa1 et kappa2, basé sur des données pharmacologiques et des expériences de radioliation (de Costa *et al.*, 1989). Certains groupes ont attribué la pharmacologie du sous-type kappa2 à une interaction entre les récepteurs KOR et DOR sous forme d'hétérodimères (Jordan et Devi, 1999).

Récepteur delta (DOR)

Pour ce qui est du DOR, bien qu'il soit également retrouvé au niveau du système nerveux central, son expression est beaucoup plus faible comparativement à celle du MOR (Kitchen *et al.*, 1997). DOR est également retrouvé dans la peau (Salemi *et al.*, 2005), chez certaines cellules immunitaires (Gaveriaux *et al.*, 1995) ainsi que dans l'intestin (Pol *et al.*, 2003). Bien que les fonctions du DOR soient moins bien définies que celles du MOR, une implication pour le DOR a été suggérée dans l'analgésie, la motilité intestinale, l'humeur ainsi que le comportement. Le DOR semble également avoir un effet sur la régulation cardiaque (Reinscheid *et al.*, 1995).

DOR répond principalement aux enképhalines et β -endorphine. Par ailleurs, ce récepteur peut également lier plusieurs ligands synthétiques à activité agoniste, tels que le DPDPE et SNC-80 (Quock *et al.*, 1997; Raynor *et al.*, 1994). De plus, certaines molécules, telles que TIPP ψ , ICI 174,864 et naltriben, ont démontré des activités agonistes inverses pour le DOR (Neilan *et al.*, 1999; Pineyro *et al.*, 2001; Toll *et al.*, 1998). Suite à la découverte des opiacés endogènes chez les mammifères, le Dr. Erspamer et ses confrères ont tenté d'identifier les molécules responsables de l'analgésie sur la peau de certains amphibiens.

Deux groupes de peptides ont été ainsi découverts, un groupe sélectif pour les MOR, les dermorphines, et le deuxième groupe sélectif pour les DOR, les deltorphines (Zadina *et al.*, 1997). Certaines évidences biochimiques semblent démontrer que les deltorphines n'ont pas exactement les mêmes actions que le DPDPE, ce qui permet de croire qu'il existe deux populations différentes de récepteurs DOR, avec un seul gène codant pour ces deux populations, car il n'existe pas d'épissage alternatif du gène de DOR. Sur des tranches de cerveaux de rats et de souris, les deltorphines semblent préférentiellement fixer une population de DOR développée après un sevrage (Kitchen *et al.*, 1995). L'existence de ces deux propriétés de fixation différentielle, entre le DPDPE et les deltorphines, a poussé les pharmacologues à subdiviser les DOR en deux catégories; les delta-1 qui lient les deltorphines et les delta-2 qui lient le DPDPE (Zaki *et al.*, 1996). L'utilisation d'un ligand bivalent (qui possède la capacité de fixer deux récepteurs différents en même temps), le KDN-21, a révélé la formation d'un hétérodimère DOR-KOR qui possède les propriétés phénotypiques des récepteurs delta-1 (Bhushan *et al.*, 2004).

Principalement couplé à la protéine G α i, DOR inhibe les adénylates cyclases, stimule les phospholipases C (PLC) et affecte l'ouverture des canaux ioniques aux potassium et calcium. De plus, toujours en aval de l'activation de G α i, DOR régule l'activité de certaines cascades de kinases telles que les MAP kinases ERKs et p38 via Src, de AKT et de JNK/STAT3. En parallèle, DOR semble également réguler l'activité de certaines petites GTPases Ras, Rac, Raf-1 et Cdc42, et finalement DOR peut également transactiver certains RTK (Kam *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2000; Lo et Wong, 2004; Schulz *et al.*, 2004).

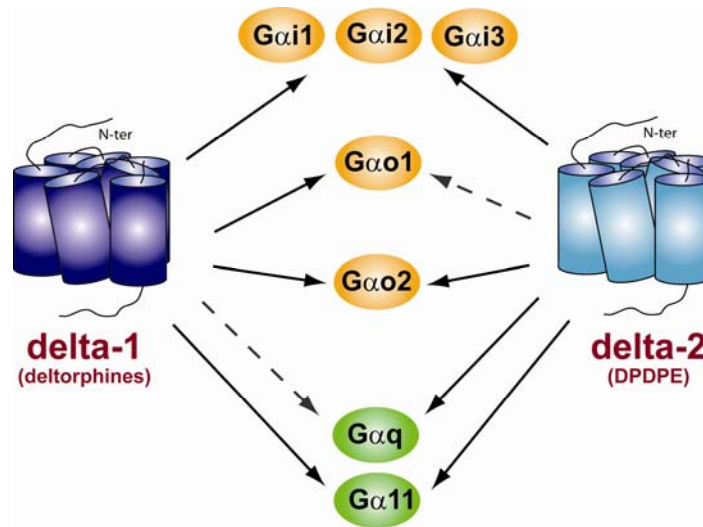


Figure 12: DOR et couplage différentiel aux protéines G

Couplage des deux sous-groupes pharmacologiques de récepteurs DOR (delta-1 en bleu foncé et delta-2 en bleu clair) aux différentes sous-unités $G\alpha$ ($G\alpha i$ en orange et $G\alpha$ en vert). Les flèches pleines représentent les couplages forts et les flèches en pointillé représentent les couplages faibles.

Le groupe du Dr. Garzón a démontré que l'injection d'oligonucléotides antisens contre différentes sous-unités $G\alpha$ a des impacts différents sur l'analgésie et l'anti-nociception supraspinale. Selon ces résultats, il semblerait que l'analgésie produite par le DOR passe par l'activation de $G\alpha o$, sous le contrôle de delta-1 (activé par les deltorphines). Par opposition, l'anti-nociception supraspinale serait plutôt reliée à l'activation de $G\alpha q$ sous le contrôle de delta-2 (activé par DPDPE) (Sanchez-Blazquez et Garzon, 1998). Par ailleurs, les DOR delta-2 sont caractérisés par la formation d'un hétérodimère MOR/DOR. Ces observations sont très intéressantes puisqu'il a également été montré par le groupe du Dr Hales que la formation d'un hétérodimère entre MOR/DOR permet l'activation de $G\alpha q$ responsable de l'activité excitatrice de la signalisation calcique (Charles *et al.*, 2003). Malgré l'activation de $G\alpha q$, la réponse demeure PTX sensible, ce qui semble indiquer une interaction croisée entre $G\alpha q$ et $G\alpha i$.

Comme le récepteur DOR semble coupler différentes sous-unités $G\alpha$ (voir Figure 12, page 48), ce récepteur est un modèle intéressant pour étudier la formation de complexes entre un récepteur et plusieurs $G\alpha$ différentes.

Récepteurs adrénergiques (récepteur $\alpha 2A$ -adrénergique)

Les récepteurs adrénergiques sont responsables de l'action sur le système nerveux central et périphérique produite par la noradrénaline (norépinephrine) ainsi l'adrénaline (épinéphrine). Ces deux agonistes naturels des récepteurs adrénergiques sont impliqués dans le contrôle de la pression artérielle, la force ainsi que la vitesse de la contraction du myocarde, dans le contrôle de l'ouverture des voies de respiration et dans le contrôle de plusieurs fonctions métaboliques (Bylund *et al.*, 1994).

En 1948, les récepteurs adrénergiques ont été divisés en deux classes selon leurs caractéristiques pharmacologiques; soient les types α et β (Ahlquist, 1948). Toujours basé sur leurs caractéristiques pharmacologiques, mais également sur des caractéristiques moléculaires, les neuf récepteurs adrénergiques sont actuellement divisés en trois grandes familles; les $\alpha 1$ (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C}), les $\alpha 2$ (α_{2A} , α_{2B} et α_{2C}) et les β ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$) (Bylund, 1988).

Tous les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ sont inhibés par l'antagoniste prazosin et leur activation est associée à une augmentation intracellulaire de calcium via l'activation de la sous-unité $G\alpha_q$ (Bylund *et al.*, 1994). De leur côté, les récepteurs adrénergiques $\alpha 2$ sont inhibés par les antagonistes yohimbine et rauwolscine, et leur activation produit principalement une inhibition de l'adénylate cyclase, via l'activation des sous-unités de la famille $G\alpha_i$ (Bylund *et al.*, 1994). Finalement, les récepteurs adrénergiques β sont inhibés par l'antagoniste propranolol, et leur activation par les agonistes naturels ainsi que par l'agoniste synthétique isoprotérénol produit une augmentation de l'AMPc dans la cellule,

via la stimulation des sous-unités de la famille G α s (Bylund *et al.*, 1994). Comparativement aux sous-types α , le récepteur β 2 adrénergique possède différentes affinités pour les ligands naturels dont l'adrénaline qui est 100 fois plus efficace que la noradrénaline pour l'activation des adénylates cyclases.

α 2A-adrénergique

Les récepteurs α 2A adrénergiques sont distribués dans plusieurs tissus allant du cerveau à la rate, en passant par les reins, les muscles squelettiques et cardiaque ainsi que le foie (Perala *et al.*, 1992). Du fait que les récepteurs adrénergiques sont nombreux, il est difficile d'attribuer des fonctions claires pour chacun des sous-types. Toutefois, il semblerait que le récepteur α 2A adrénergique soit impliqué dans l'hypotension, la sédation, l'analgésie, le contrôle de la température et l'inhibition présynaptique du relâchement de la noradrénaline (Kable *et al.*, 2000). Principalement couplés aux sous-unités G α i pour l'inhibition de l'adénylate cyclase (Bylund et Ray-Prenger, 1989), les α 2A adrénergiques sont également capables de stimuler la phospholipase A2 pour permettre la production d'acide arachidonique (Jones *et al.*, 1991), ainsi que de moduler l'ouverture des canaux potassiques et calciques (Limbird, 1988). De plus, il a été démontré que les récepteurs α 2A adrénergiques peuvent être couplés à la sous-unité G α s, par contre les significations biologiques de ce couplage restent toujours inconnues (Eason *et al.*, 1992).

Afin de réguler leur activité, les récepteurs sont sujets à l'internalisation suite à leur activation, et ces mécanismes de régulation sont plus ou moins efficaces selon le type de récepteur. Pour ce qui est des récepteurs adrénergiques α 2, le récepteur α 2A adrénergique est celui qui est le moins bien internalisé par la voie dépendante de la β -arrestine et de la dynamine (DeGraff *et al.*, 1999). Malgré cette faible interaction, le recrutement des arrestines est important pour la désensibilisation et l'internalisation normales du récepteur. La phosphorylation par GRK2 semble également importante dans cette internalisation, car

le recrutement de la spinophiline inhibe la phosphorylation des récepteurs α_{2A} adrénergiques, en empêchant le recrutement de GRK2 et par le fait même la liaison de l'arrestine, ce qui limite l'internalisation du récepteur (Wang *et al.*, 2004).

Récepteurs de la vasopressine (récepteur vasopressine de type 2)

Les récepteurs de la vasopressine ont tous comme ligand naturel l'hormone antidiurétique (ADH), aussi nommée arginine vasopressine (AVP). Cette hormone est un peptide de neuf résidus qui résulte du clivage d'une protéine précurseur produite par des cellules spécialisées de l'hypothalamus (Birnbaumer, 2000). La libération de l'AVP dans le sang est contrôlée par des osmorécepteurs capables de détecter de faibles augmentations de l'osmolarité du plasma (Bourque et Oliet, 1997). L'AVP circulante favorise la rétention d'eau par les reins, modifie la vasoconstriction de certaines veines, et permet la libération de l'adrénocorticotropine (ACTH). Ces actions sont entraînées par l'activation de trois récepteurs différents de la même famille; soit le récepteur à la vasopressine V2, V1a et V1b respectivement (Birnbaumer, 2000).

V2R

Le récepteur à la vasopressine V2 (V2R) est principalement exprimé au niveau de la membrane basolatérale des cellules principales des tubules collecteurs dans les reins, et son gène est situé sur le chromosome Xq28 (Birnbaumer *et al.*, 1992). L'activation de ce récepteur va permettre la relocalisation d'un canal aqueux, l'aquaporine de type 2 (AQP2), vers la portion luminale des cellules des tubules collecteurs. Ce processus est à la base du mécanisme moléculaire de l'augmentation de la perméabilité de l'eau de la membrane apicale (Nielsen *et al.*, 2002). Cette redistribution des AQP2 par l'activation des V2R passe par l'activation de la protéine G α_s , qui permet une production d'AMPc par les adénylates cyclases. En plus d'une redistribution rapide des AQP2, l'activation de V2R permet une augmentation de la synthèse des ARNm de ce canal aqueux (Birnbaumer, 2000).

L'activation des PLC a également été observée pour V2R, mais dans des conditions non physiologiques.

Transfert d'énergie de résonance non radiative

Afin d'étudier les interactions protéine-protéine ainsi que la formation de complexes protéiques, certaines techniques biophysiques exploitant un transfert d'énergie de résonance non radiative (RET) ont été mises au point au cours des dernières années. Ces approches RET exploitent toutes le même principe de base, où l'énergie émise par une molécule dite donneur d'énergie est transférée à une molécule dite accepteur d'énergie qui réémettra cette énergie pour donner un signal différent du donneur. L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance séparant le donneur et l'accepteur, et est inversement proportionnelle à la sixième puissance de cette distance (Cardullo, 2007). En d'autres mots, un faible changement dans la distance entre le donneur et l'accepteur entraînera un grand changement de transfert d'énergie. De plus, cette efficacité est dépendante d'une orientation permissive des dipôle électronique du couple donneur/accepteur et il doit y avoir un recouvrement entre les maximums d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur pour obtenir un transfert d'énergie non radiatif spontané. Pratiquement, il est possible de marquer des protéines d'intérêt avec des molécules donneuses et acceptrices (qui seront vue plus bas) et ainsi seule deux protéines à moins d'une certaine distance (entre 30Å et 150Å selon le couple donneur/accpeteur), distance maximale calculée permettant une transfert d'énergie (Förster, 1948), permettront le rapprochement de l'accepteur et du donneur de façon à transmettre efficacement l'énergie. De plus, il est possible de suivre l'évolution des interactions protéiques en temps réel, car la mesure du signal ne demande aucune modification ou lyse cellulaire.

GFP (Green fluorescent protein)

GFP d' *Aequorea victoria*

La propriété de bioluminescence de la méduse *Aequorea victoria* est le résultat non seulement de l'activité de l'aequorin, une photoprotéine dépendante du calcium, mais également du transfert d'énergie avec une protéine fluorescence verte (GFP). Suite au clonage de cette GFP en 1992 par le groupe de Cormier (Prasher *et al.*, 1992), plusieurs études ont démontré que les propriétés de fluorescence de cette GFP étaient encodées dans sa séquence primaire en acide aminés et que la formation du chromophore ne dépendait nullement de cofacteurs ou d'activités enzymatiques. Cette propriété auto-fluorescente a fait de la protéine GFP un outil incontournable de la biologie cellulaire en permettant de suivre la localisation et le mouvement d'autres protéines auxquelles la GFP a été génétiquement fusionnée.

La GFP est une protéine de 238 acides aminés, dont les résidus 7 à 229 sont essentiels pour permettre la fluorescence. La cristallographie de cette protéine a révélé une structure en forme de tonneau avec 11 feuillets- β (voir Figure 13, page 54) (Ormo *et al.*, 1996). Cette structure fournit un environnement propice à la fluorescence du chromophore suite à son excitation. Le chromophore est principalement formé par la cyclisation des résidus Ser65 (ou Thr65)-Tyr66-Gly67. Cette cyclisation est la résultante d'une réaction post-traductionnelle d'oxydation qui requiert de l'oxygène (Ormo *et al.*, 1996). De plus, les acides aminés Arg96 et Glu222, présents dans toutes les protéines fluorescentes découvertes à ce jour, semblent essentiels pour créer un environnement propice à la cyclisation des acides aminés du chromophore (Tsien, 1998). La formation de ce chromophore est l'étape limitante de la maturation de la GFP et est sensible à plusieurs facteurs environnementaux (Tsien, 1998).

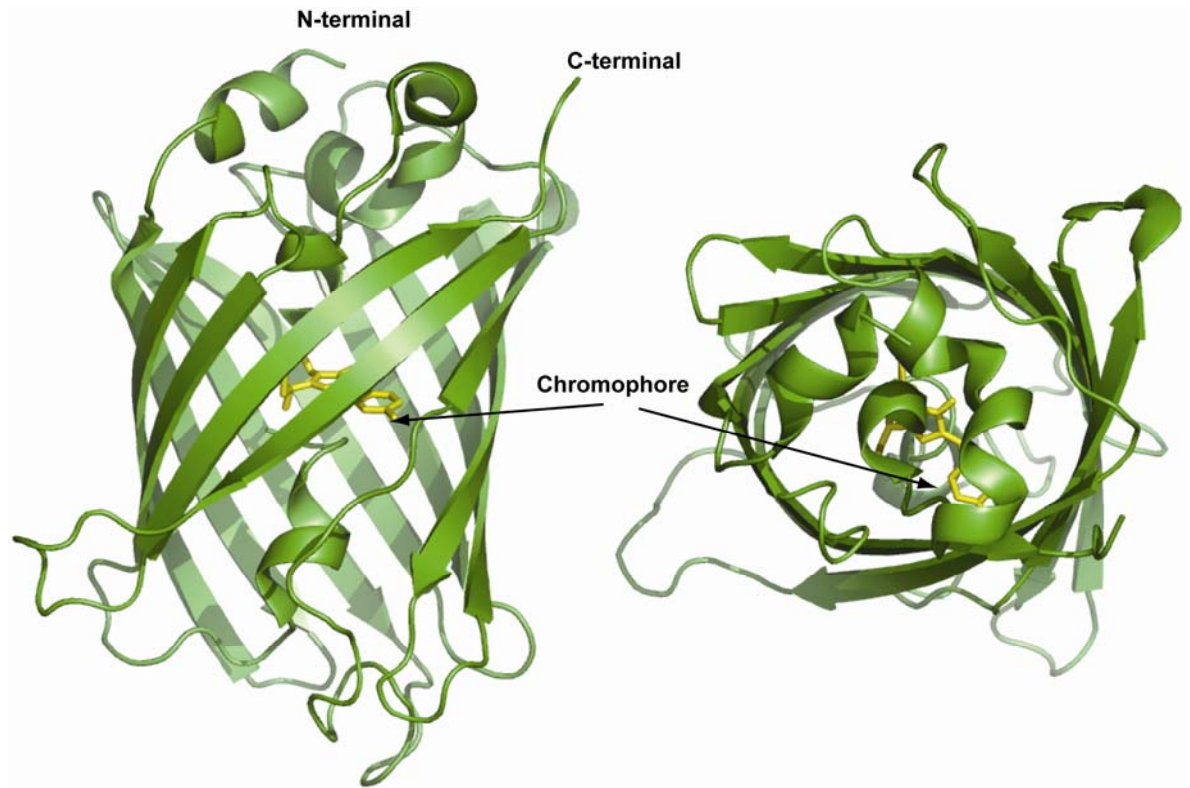


Figure 13: Structure de la GFP native de *Aequorea victoria*

Figure produite à partir du PDB 1W7S avec PyMOL. En vert la protéine GFP où les résidus responsables de la formation du chromophore ont été colorés en jaune.

Une fois le chromophore formé, la GFP devient une protéine exceptionnellement résistante à la chaleur ($T_m = 70^\circ\text{C}$), aux détergents, aux solvants organiques, aux sels chaotropiques, aux protéases communes (sauf à la pronase) et aux pH alcalins (Tsien, 1998). Toutefois plusieurs facteurs environnementaux et cellulaires peuvent influencer l'efficacité de fluorescence de la GFP. Cette protéine est relativement stable face aux modifications de pH. Dans une fourchette entre 7 et 11.5, la GFP possède une capacité de fluorescence non altérée, mais dans des pH plus acides la fluorescence est diminuée (Tsien, 1998). Malgré le fait que cette protéine mature possède une thermostabilité importante, la formation du chromophore est sensible à la température. Lorsque des cellules mammifères exprimant la

GFP native sont maintenues entre 30-33°C plutôt qu'à 37°C, la fluorescence est plus importante (Tsien, 1998).

La GFP native possède deux pics d'excitation qui sont dictés par l'état de protonation du résidu Tyr66 du chromophore. Lorsque déprotoné, le pic d'excitation est principalement à 395 nm, par contre en état protoné, le pic est plutôt à 475 nm. Une fois excitée, la GFP réémet son énergie à une nouvelle longueur d'onde d'environ 509 nm (Heim *et al.*, 1994). La GFP native a vu son utilisation limitée pour des applications d'imagerie cellulaire, dû à son excitation optimale près de l'ultraviolet (UV), car plusieurs biomolécules possèdent des propriétés de fluorescence dans cette région du spectre de longueur d'onde. Afin de contourner ce problème technique, différentes campagnes de mutations dirigées ou aléatoires ont été mises sur pied dans le but de mettre à jour les déterminants structuraux permettant de contrôler les propriétés spectrales de la GFP native.

Le groupe de Falkow a généré des mutants de la GFP native pour ainsi créer la EGFP, où la mutation du résidu S65T du chromophore permet d'avoir un seul pic d'excitation à 488 nm, sans modifier la longueur d'onde d'émission, et la mutation du résidu F64L permet d'avoir un meilleur repliement à 37°C (Cormack *et al.*, 1996). De plus, une fluorescence de 4 à 35 fois supérieure par rapport à la forme native est constatée avec ce mutant, ce qui en fait une protéine fluorescente de choix pour des études en biologie cellulaire (Cormack *et al.*, 1996). Par opposition, il est possible de générer une mutation dans la GFP native (T203I) en éliminant plutôt le pic d'excitation à 475 nm et en gardant le pic principal à 395 nm. Cette GFP est nommée Sapphire (Tsien, 1998). Il est non seulement possible de favoriser un pic par rapport à l'autre avec certaines mutations dans la GFP native, mais il est également possible de changer les propriétés spectrales pour avoir différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, donnant ainsi naissance à une plus grande variété de couleurs disponibles passant du bleu au jaune. En générant des mutations du deuxième résidu du chromophore, il est possible d'avoir une protéine fluorescente bleu (BFP; Y66H) avec des

longueurs d'ondes d'excitation à 380 nm et d'émission à 448 nm ou une protéine fluorescente cyan (CFP; Y66W) avec des longueurs d'ondes d'excitation entre 433 et 445 nm et d'émission entre 475 et 508nm (Cubitt *et al.*, 1995). Par contre ces mutations altèrent la brillance de ces deux protéines fluorescentes rendant ainsi plus difficile leur utilisation dans des contextes cellulaires. De plus, la BFP est un candidat moins intéressant, car dans cette région d'excitation, il y a plusieurs molécules biologiques qui ont des propriétés de fluorescence, augmentant ainsi le bruit de fond cellulaire.

Une autre mutation (T203Y) dans la GFP native a permis de générer une nouvelle couleur de protéine fluorescence jaune, la YFP et la version améliorée, EYFP, est rapidement devenue la protéine fluorescence la plus utilisée de la famille, du fait qu'elle est beaucoup plus brillante que toutes les autres protéines fluorescentes trouvées à ce jour (Shaner *et al.*, 2005). Par contre, la EYFP est plus sensible au milieu acide que la EGFP, perdant 50% de sa fluorescence dans une solution de pH 6.5 et moins ce qui limite légèrement son utilisation dans le cas de ciblage de protéines de fusion vers des régions acide de la cellule. De plus, elle est sensible aux ions chlore. Afin d'améliorer les propriétés spectrales des BFP et CFP ainsi que rendre la EYFP insensible au pH, plusieurs types de mutations ont été réalisées et les principales protéines fluorescences ainsi obtenues ont été répertoriées dans le Tableau VI. Les principales protéines fluorescentes utilisées dans les études de BRET sont les GFP² et GFP10 pour le BRET_{400-GFP} (BRET²), ainsi que les YFP pour le BRET_{480-YFP} (BRET¹). Les différences entre les deux configurations de BRET seront traitées ultérieurement.

Tableau VI: Caractéristiques des différentes GFP dérivées d'*Aequorea victoria*

Mutations, résidus principalement ciblés pour le changement de propriétés spectrales des GFP; Ex, longueur d'onde d'excitation; Em, longueur d'onde d'émission; * faible dimère

Nom	Mutations principales	Ex (nm)	Em (nm)	Brillance relative (% de EGFP native)	Structure Quaternaire
GFP native		395 et 475	509	<20	Monomère *
EBFP	F64L, Y66H, Y145F	380	448	27	Monomère *
EBFP2	S30R, Y39N, F64L, T65S, Y66H, S72A, N105T, I171V, N198S, A206V, I128V, Y145F, V150I, D155V, V224R	383	448	53	Monomère *
ECFP	F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	439	476	39	Monomère *
SCFP3A	F64L, S65T, Y66W, S72A, N146I, H148D, M153T, V163A, S175G, A206K	433	474	45	Monomère *
EGFP	F64L, S65T	488	507-509	100	Monomère *
GFP2	F64L, Y100F, S108T, M141L, I219V, H231L	400	510	n.d.	Monomère *
GFP10	64L, Y100F, S108T, M141L, S147P, S202F, I219V, H231L	400	510	n.d.	Monomère *
EYFP	S65G, V68L, S72A, T203Y, H231L	515	528	151	Monomère *
Venus	F46L, F64L S65G, V68L, S72A, M153T, V163A, S175G, T203Y, H231L	515	528	156	Monomère *
mAmetrine	S20R, Y39N, T50S, F64L, S72A, F99S, N105S, K107R, Y145M, S147V, H148W, N149D, V150A, M153T, V163A, R168E, I171V, S175G, H181A, P192S, T203F, A206K, S208F, K214Q, L231P	406	526	78	Monomère

Protéine fluorescente des Anthozoa

La recherche de protéines fluorescentes rouges a été une avenue critique pour fournir des outils d'imagerie à multiple couleurs. Dans cette quête, les mutations sur des protéines fluorescentes basées sur *Aequorea* ont atteint une limite avec la YFP. Afin de palier à ce manque, certains groupes ont confirmé la présence de protéines fluorescentes rouges dans certains coraux de récif et anémones de mer tel la *Discosoma striata* d'où la DsRed a été clonée. Par contre, la version native de DsRed présente plusieurs problèmes, avec une maturation lente du chromophore passant du vert au rouge. De plus, la DsRed est un tétramère obligatoire avec une possibilité de fusion génétique problématique, ce qui rend son utilisation dans un cadre de biologie cellulaire à plusieurs couleurs impossible. La DsRed est une protéine de 225 acides aminés qui forme une structure tertiaire similaire à la GFP (voir Figure 14, page 59) avec un chromophore composé de la cyclisation de trois acides aminés; Gln66 Tyr67 et Gly68. Comparativement à la GFP d'*Aequorea*, la DsRed est stable entre pH 5-12 et est 5 fois plus résistante au photoblanchiment (Shrestha et Deo, 2006).

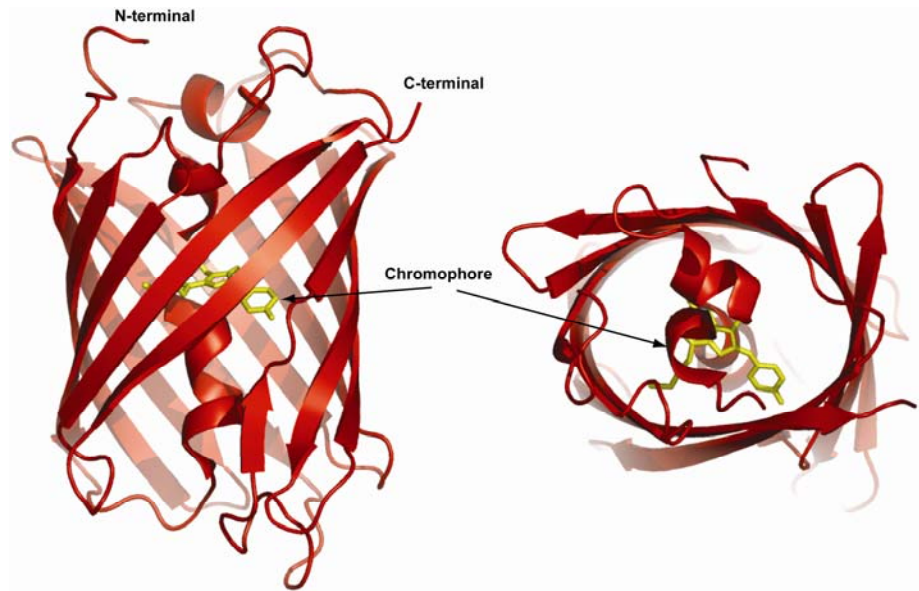


Figure 14: Structure de mCherry

Figure produite à partir du PDB 2H5Q avec PyMOL. En rouge la protéine mCherry où les résidus responsable de la formation du chromophore ont été colorés en jaune.

Avec ses caractéristiques de fluorescence dans le rouge uniquement (excitation à 558 nm et émission à 583 nm) et de nombreux inconvénients d'utilisation, une série de mutations ont été effectuées sur la DsRed permettant d'améliorer les temps de maturation passant de 15 heures pour la DsRed native à 6 heures pour la DsRed2 et finalement à 1 heure à la DsRed-Express (Bevis et Glick, 2002). Afin de rompre le tétramère de DsRed, une série de mutations dirigées ont été effectuées en vain, car les monomères résultants de ces mutations perdaient toute capacité de fluorescer (Campbell *et al.*, 2002). L'utilisation de la méthode d'évolution dirigée sur la DsRed a finalement permis au groupe du Dr. Tsien de mettre au point une protéine fluorescente rouge monomérique.

Tableau VII: Caractéristiques de différentes FP dérivées de la DsRed

Ex, longueur d'onde d'excitation; Em, longueur d'onde d'émission;

Nom	Ex (nm)	Em (nm)	Brillance relative (% de EGFP native)	Structure Quaternaire
Protéine fluorescente orange				
mOrange	548	562	146	Monomère
dTomato	554	581	142	Dimère
DsRed	558	583	174	Tétramère
DsRed2	563	582	72	Tétramère
DsRed-Express	555	584	58	Tétramère
Protéine fluorescente rouge				
mApple	568	592	109	Monomère
mStrawberry	574	596	78	Monomère
mRFP1	584	607	37	Monomère
mCherry	587	610	47	Monomère
mRaspberry	598	625	38	Monomère
Protéine fluorescente infrarouge				
mPum	590	649	12	Monomère

L'évolution dirigée consiste à générer une succession de mutations aléatoires suivies d'une sélection, dans le cas de la DsRed l'amélioration de la fluorescence dans le rouge était le mode de sélection des clones. Avec un total de 33 mutations dans la DsRed native, une première génération de protéines fluorescentes rouges monomériques voit le jour, nommée mRFP1 (Campbell *et al.*, 2002). Malheureusement, la brillance de cette mRFP1 est grandement affectée comparativement à la DsRed native. Toujours par évolution dirigée, le groupe de Tsien a généré une panoplie de protéines fluorescentes avec de nouvelles propriétés spectrales et ces protéines fluorescentes ont été nommées avec le nom de fruit représentant leur couleur d'émission (voir Tableau VII, page 60) (Shaner *et al.*, 2004). Avec cette évolution des propriétés de la DsRed native et les différentes formes de GFP, il est maintenant possible de combiner ces multiples protéines fluorescentes pour faire de l'imagerie cellulaire à plusieurs couleurs.

Transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET)

Le désir de mesurer des phénomènes physiologiques dans des conditions natives a entraîné la mise au point d'une grande variété de nouvelles techniques. La génération des différentes protéines fluorescentes a permis une révolution dans les études protéique de localisation cellulaire et très rapidement les méthodes basées sur le transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) ont pris de l'importance, permettant la mesure d'interactions protéiques en cellules vivantes. Le FRET est basé sur un principe physique, décrit par Théodor Förster dans les années 1940 (Förster, 1948), selon lequel l'excitation d'une molécule donneuse d'énergie mène à un transfert d'énergie à une molécule acceptrice via une interaction dipôle-dipôle des nuages électroniques de chacun des fluorophores. Par conséquent, les deux molécules doivent être très proches (moins de 100 Å), avoir une orientation dipolaire permissive pour le transfert d'énergie et un chevauchement entre les spectre d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur (Förster, 1948). Avant l'avènement des protéines fluorescentes, il était possible de mesurer du FRET entre deux fluorophores chimiques. Par contre, étant donné que leur utilisation dans un contexte de cellules vivantes requiert la micro-injection, l'utilisation de tels fluorophores chimiques demeure très limitée. Le clonage des gènes responsables de la fluorescence chez certains organismes marin, a permis la fusion génétique de fluorophores de type GFP aux protéines d'intérêt, simplifiant ainsi l'utilisation du FRET dans la mesure d'interactions protéiques *in vivo*. En plus des protéines fluorescentes, il est maintenant possible de marquer génétiquement à la fluorescence des protéines d'intérêt avec des méthodes dite à activité enzymatique suicide tel les étiquettes SNAP (Keppler *et al.*, 2003; Maurel *et al.*, 2008), CLIP (Gautier *et al.*, 2008) et HALO (Los et Wood, 2007). Dans les trois cas l'enzyme (pour SNAP et CLIP l'O⁶-alkylguanine-DNA-Alkyltransférase humaine modifiée et pour HALO l'haloalkane dehalogenase modifiée de bactérie) va interagir et être lié de façon covalente par son substrat pour ainsi marquer la protéine d'intérêt. L'avantage de cette méthode de suicide enzymatique provient de la grande versatilité de marquage possible pour une même étiquette, car les substrats spécifiques pour chacun des trois technologies

peuvent être modifiés chimiquement par des petites molécules fluorescentes de couleurs différentes. En plus des protéines fluorescence, les étiquette à activité enzymatique suicide augmentent les combinaisons de FRET possible de mesurer.

Un des principaux avantages du FRET est qu'il est possible de combiner cette technique avec la puissance de la microscopie pour localiser les interactions protéiques en cellules vivantes. Également, le couplage à la microscopie permet de suivre la cinétique et le mouvement de ces interactions, ce qui en fait une technique de choix pour suivre différents phénomènes cellulaires. De plus, le FRET permet de suivre des interactions intramoléculaires aussi bien que des interactions intermoléculaires. Cette grande versatilité du FRET a permis la mise au point de plusieurs types de stratégies afin de suivre les interactions protéiques et ainsi il est possible de suivre directement le recrutement d'une protéine à une autre ou leur dissociation et de suivre un changement de conformation au sein d'une protéine.

Le couple de fluorophores principalement utilisé est la CFP comme donneur et la YFP comme accepteur d'énergie. La CFP possède un pic d'émission à 475 nm qui est en mesure de transférer son énergie à la YFP possédant un pic d'excitation à 515 nm. Le maximum d'émission de la CFP n'est pas exactement à la même longueur d'onde que l'excitation de la YFP, mais les deux pics se chevauchent de sorte que la YFP est allumée par la CFP lorsque ces deux fluorophores se retrouvent à proximité l'un de l'autre. Plusieurs autres couples de fluorophore peuvent être utilisés pour mesurer du FRET avec des protéines de fusion (voir

Tableau VIII, page 63).

Tableau VIII: Couples de protéines fluorescentes utilisées pour le FRET

Ex, excitation; Em, émission

Protéines donneur	Ex	Em	Protéines accepteur	Ex	Em
EBFP	380	440	EGFP	484	507
CFP	433	475	YFP	515	528
T-saphir	395	510	YFP	515	528
T-saphir	395	510	mOrange	548	562
YFP	515	528	mCherry	587	610

Un des principaux désavantages du FRET est l'excitation croisée des fluorophores. Ainsi, lors de l'excitation du donneur d'énergie une faible stimulation de l'accepteur est possible, pouvant ainsi fausser le signal du transfert d'énergie. Cette stimulation directe de l'accepteur doit être prise en compte dans l'analyse des résultats. Pour chacun des couples de protéines étudiés, des contrôles bien précis doivent être introduits pour corriger les valeurs afin d'éliminer toute trace de contamination. Pour ce faire, la mesure croisée de chacun des fluorophores doit être effectuée en utilisant les paramètres de l'autre (Cardullo et Parpura, 2003). Bien contrôlé, le FRET est un outil extrêmement puissant pour la mesure d'interactions protéiques et la formation de complexes protéiques dans leur contexte cellulaire.

Bioluminescence

Aujourd'hui en biochimie, le phénomène de bioluminescence est un outil largement utilisé dans des systèmes rapporteurs ou dans des méthodes analytiques extrêmement sensibles. La bioluminescence est également utilisée dans l'étude d'interactions protéine-protéine, qui fait intervenir un transfert d'énergie de la luciférase à une protéine fluorescente telle la GFP. Cette technique appelée BRET sera expliquée en détail ultérieurement.

La bioluminescence est un phénomène naturel retrouvé dans plusieurs organismes distincts tels que certaines bactéries, la Cnidaria (Coelenterates), la luciole, les Dinoflagellés et certains types de vers. Cette production de lumière est la résultante de l'oxydation de la luciférine, le substrat d'une photoprotéine appelée luciférase (Wilson et Hastings, 1998). Chez certaines bactéries, cette lumière est produite continuellement par une multitude de flashes d'une durée de 0.1 à 1 seconde. Ceci demande un contrôle efficace de l'activité de la luciférase et pour ce faire la luciférine est séquestrée, puis rapidement mobilisée (Wilson et Hastings, 1998). Chez les organismes eucaryotes, la production de cette lumière est régulée par différents mécanismes de contrôle spécifiques à chaque espèce. Pour les vers et les lucioles, les luciférases sont séquestrées dans des organelles provenant de la modification du réticulum endoplasmique et des peroxisomes respectivement (Wilson et Hastings, 1998). Les Dinoflagellés possèdent plutôt une structure cytoplasmique responsable de l'emménagement des luciférases. Dans cet organisme, les flashes lumineux sont générés par une modification rapide du pH au sein de l'organelle activant ainsi la luciférase (Wilson et Hastings, 1998). Finalement, les Coelenterates vont plutôt utiliser la mobilisation du calcium pour réguler cette production de luminescence (Wilson et Hastings, 1998).

Luciférases

Dans le BRET, la protéine donneuse d'énergie est une enzyme bioluminescente, la luciférase. La séquence en acides aminés des luciférases est typiquement différente d'un organisme à l'autre et elles peuvent être classifiées en trois grandes catégories selon l'organisme dont elles proviennent; les Lux représentant la classe des bactéries, les Lcf pour les dinoflagellés et finalement les Luc pour les organismes lucioles (Wilson et Hastings, 1998). Le mécanisme de production de lumière ainsi que le type de substrats utilisés varient également d'une espèce à l'autre. La luciférase la mieux caractérisée est celle de la luciole. Cette luciférase est une protéine monomérique de 62 kDa qui a été cristallisée. Elle présente deux domaines distincts, un large domaine N-terminal et un petit domaine C-terminal tous deux reliés par une hélice de quatre résidus flexibles. L'interjection des deux domaines est caractérisée par un domaine à activité ATPasique

(Conti *et al.*, 1996). Afin de produire de la lumière, la luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine (benzothiazoyl-thiazole) en présence de l'ATP et de Mg^{2+} . Cette réaction requiert la formation d'un intermédiaire dioxétanone riche en énergie. Cet intermédiaire est le produit de la réaction entre un adénylate, l'oxygène et la cyclisation d'un peroxyde. Le bris du dioxétanone libère environ 50 kcal/mol d'énergie et cette énergie est nécessaire à la génération de l'état excité de l'oxyluciférine. Au final, environ un photon sera généré par l'oxydation de luciférine. La couleur produite varie du vert à l'orange en fonction de la structure tridimensionnelle du site catalytique (McElroy et DeLuca, 1983).

Pour leur part, les dinoflagellés, algues unicellulaires responsables de la phosphorescence de la mer, utilisent plutôt un mécanisme de séquestration du substrat (Wilson et Hastings, 1998). La luciférine des dinoflagellés est similaire à la chlorophylle des plantes et elle est très sensible à l'auto-oxydation, ce qui est inefficace pour la production de lumière. Par contre en présence de la luciférase, la luciférine peut alors produire de la lumière. Chez les *Gonyaulax*, un dinoflagellé, deux protéines sont requises pour la production de bioluminescence. La première est une protéine dimérique de deux sous-unités identiques de 75.5 kDa, la protéine fixatrice de luciférase (LBP) séquestre les luciférines à un pH physiologique afin de les protéger contre leur auto-oxydation. La deuxième protéine est la luciférase (LCF), une protéine de 137 kDa, qui est inactive à un pH physiologique (Wilson et Hastings, 1998). Ces deux protéines et la luciférine sont retrouvées dans des organelles spécialisées appelées scintillons et lorsque le pH des scintillons devient plus acide, les luciférines sont relâchées par la LBP et sont alors disponibles pour être oxydées par la luciférase. La bioluminescence produite est faible avec un maximum d'émission à 470 nm (Wilson et Hastings, 1998).

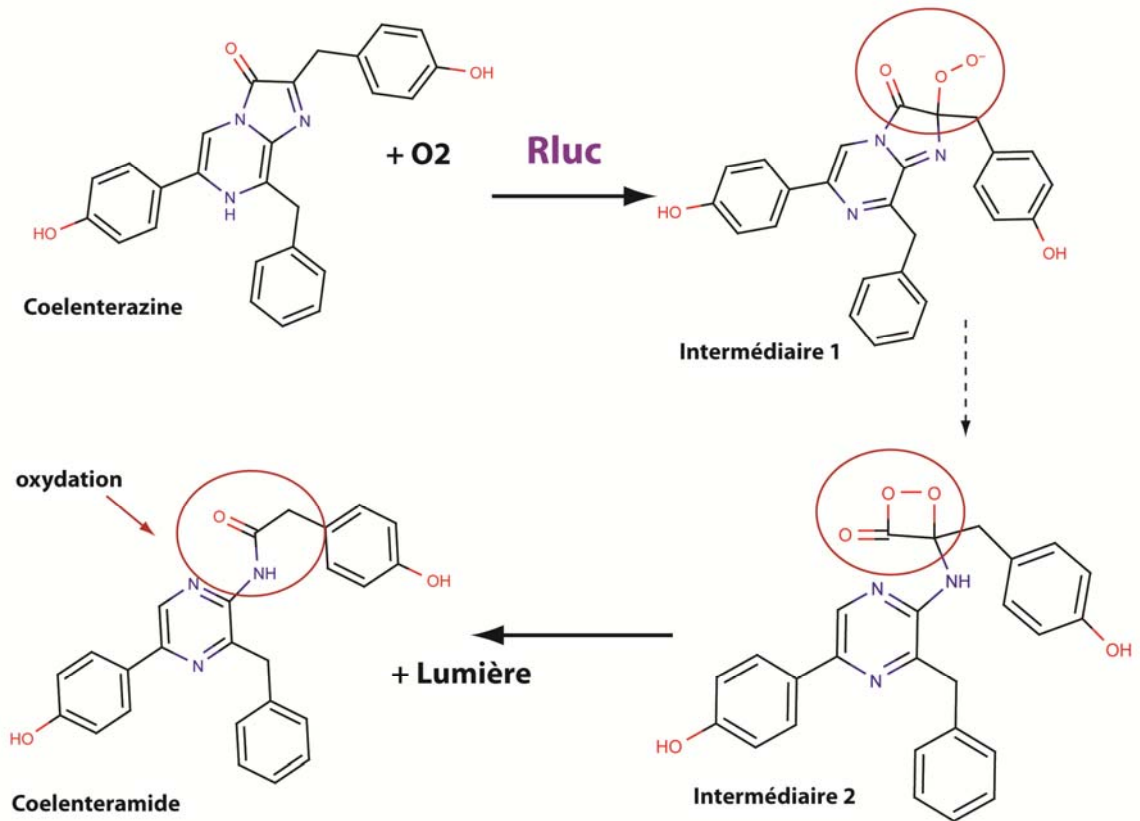


Figure 15: Réaction d'oxydation de la coelenterazine par la Rluc

L'oxydation des coelenterazines débute par la fixation d'une molécule d'oxygène sur la molécule donnant l'intermédiaire 1. Par la suite, l'attaque de l'oxygène chargé sur le groupement carbonyle adjacent donne l'intermédiaire 2. Finalement l'intermédiaire 2 se transforme en coelenteramide en libérant une molécule de CO_2 et de l'énergie sous forme de lumière.

Finalement, les coelenterates font également intervenir un intermédiaire dioxétanone pour la production de lumière tout comme les lucioles, mais sans utiliser l'ATP et le Mg^{+2} pour contrôler la production de lumière. *La Rénilla reniformis*, une pensée de mer, va plutôt utiliser un mécanisme nécessitant quatre protéines différentes et la mobilisation du calcium pour réguler l'oxydation de la luciférine, nommée plus spécifiquement coelenterazine (Wilson et Hastings, 1998). D'abord, une sulfokinase enlève le sulfate d'une coelenterazine-sulfatée, un intermédiaire dans la biosynthèse de la coelenterazine qui serait la forme de réserve. Une fois désulfatée, la coelenterazine interagit avec une protéine de

18.5 kDa qui possède trois sites de liaison au calcium (Wilson et Hastings, 1998). Cette interaction avec cette protéine liant le calcium va permettre de contrôler l'oxydation des coelenterazines par la luciférase (voir Figure 15, page 66), une protéine monomérique de 36 kDa (*Rluc*) (voir Figure 16, page 67). En présence de calcium, les coelenterazines seront alors disponibles pour réagir avec la luciférase.

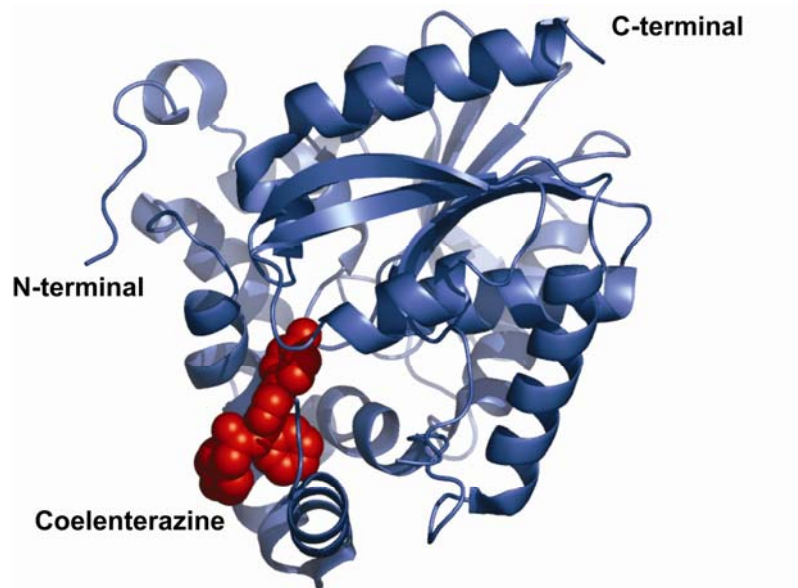


Figure 16: Structure de la *Rluc*

Figure produite à partir de du PDB 2PSJ avec PyMOL. En bleu la protéine Luciférase et en rouge la coelenterazine.

Une cinquième protéine, la *Renilla* GFP, est présente pour modifier la couleur émise chez la *Renilla reniformis* (Wilson et Hastings, 1998). Cette GFP, lorsque fixée à la luciférase, va capter l'énergie produite par la *Rluc* et la réémettre à une nouvelle longueur d'onde. La *Rluc* seule émet une couleur bleutée (longueur d'onde près de 480 nm), mais lorsqu'elle est liée à la *Renilla* GFP, la couleur émise devient plutôt verdâtre (longueur d'onde près de 509 nm) (Wilson et Hastings, 1998). Ce transfert d'énergie est à la base de la technologie BRET.

Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

Le BRET est un phénomène naturel qui se produit chez certains êtres vivants, tels la *Renilla reniformis* et l'*Aequorea victoria*. Chez ces organismes, l'enzyme luciférase effectue une dégradation oxydative de son substrat générant ainsi de la lumière. Lorsque la luciférase est à proximité des protéines GFP, l'énergie de résonance de bioluminescence est transférée à la GFP, qui réémettra cette énergie à une autre longueur d'onde (Xu *et al.*, 1999). Ce transfert d'énergie de la luciférase à la GFP est dépendant de plusieurs facteurs, tels que l'orientation des deux protéines, ainsi que de la distance qui les sépare ainsi que le chevauchement des spectres d'émission de la luciférase et d'excitation des protéines fluorescentes. L'efficacité de transfert d'énergie est déterminée par le rapport de la lumière provenant de la GFP sur la lumière produite par la luciférase (ratio BRET).

Ce transfert d'énergie a été mis à profit dans l'étude d'interactions protéine-protéine. Xu *et al* ont démontré l'homodimérisation de kaiB, une protéine impliquée dans le cycle circadien, par l'utilisation des protéines de fusion luciférase et EYFP. Lorsque les protéines kaiB-Rluc et kaiB-EYFP ont été exprimées dans des bactéries, un transfert d'énergie BRET a été mesuré (Xu *et al.*, 1999). Ce transfert d'énergie témoigne de la proximité des deux protéines d'intérêt. Cette approche aussi a été utilisée pour étudier la dimérisation du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) par le groupe du Dr. Bouvier (Angers *et al.*, 2000). Après avoir co-exprimé les protéines de fusion β_2 AR-Rluc et β_2 AR-GFP dans un système d'expression hétérologue de mammifères, ils ont observé un transfert d'énergie à l'état basal. Ces résultats ont permis de poser l'hypothèse selon laquelle le récepteur β_2 AR serait présent dans les cellules sous forme d'oligomères et ce très tôt dans sa maturation. De plus dans l'étude de Angers *et al*, le BRET a été utilisé pour la première fois pour mesurer une

interaction induite entre deux protéines. Suite à l'activation du récepteur β 2-AR, les auteurs ont suivi le recrutement de la β -arrestine directement au récepteur (Angers *et al.*, 2000).

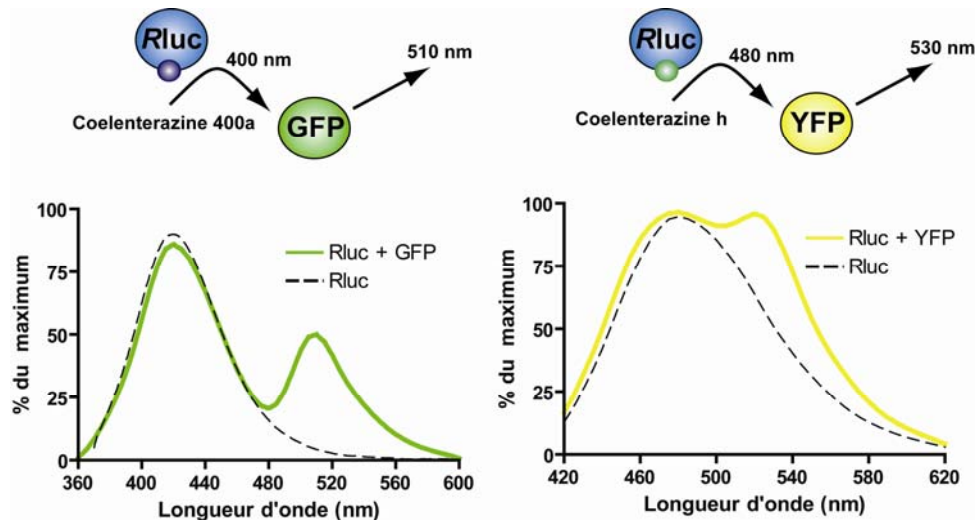


Figure 17: Spectres de transfert d'énergie des deux configurations de BRET.

Les différences majeures entre les deux configurations de BRET (BRET² à gauche et courbe en vert, BRET_{480-YFP} à droite et courbe en jaune) sont le type de substrat utilisé (coelenterazine 400a pour le BRET_{400-GFP} et coelenterazine h pour le BRET_{480-YFP}), ainsi que le type de protéine fluorescente utilisée comme accepteur (GFP² pour le BRET_{400-GFP} et YFP pour le BRET_{480-YFP}).

Deux configurations de BRET sont présentement disponibles. La première configuration développée utilise la luciférase/coelenterazine-h comme donneur d'énergie et la protéine EYFP comme accepteur d'énergie (voir Figure 17, page 69). La bioluminescence produite par la luciférase possède un maximum d'émission à environ 475 nm. La EYFP de son côté possède un maximum d'excitation à 512 nm. Par conséquent, le recouvrement des spectres du donneur et de l'accepteur n'est pas optimal, ce qui résulte en une moins bonne efficacité du transfert d'énergie. Pour pallier à ce problème, la compagnie Packard a développé un nouveau substrat, la coelenterazine-400a, permettant d'avoir un maximum d'émission à 420 nm (voir Figure 17, page 69). L'utilisation de la GFP², qui possède un maximum

d'excitation près de 400 nm, comme accepteur d'énergie, permet un bon recouvrement avec le spectre d'émission de la coelenterazine-400a. Selon la théorie du transfert d'énergie de résonance, meilleur est le chevauchement des spectres entre le donneur et l'accepteur d'énergie, meilleur est le transfert d'énergie. Non seulement le spectre de recouvrement est plus important avec la configuration 2, mais la séparation entre les spectres d'excitation de la coelenterazine-400a et d'émission de la GFP² est plus importante, ce qui facilite leur mesure. Comme l'efficacité du transfert d'énergie est le ratio entre la réémission de lumière produite par la GFP et celle produite par la luciférase, il est important de pouvoir bien les distinguer.

L'utilisation de la coelenterazine-400a permet une meilleure séparation donneur/accepteur, par contre la production de lumière par la *Rluc* est grandement affectée, ce qui rend la détection des photons produit par la luciférase plus difficile et nécessite l'utilisation d'appareils de mesure plus performants et coûteux. Le groupe du Dr. Gambhir ont mis au point une série de mutation aléatoire au sein de la *Rluc* afin d'améliorer les propriétés spectrales de cette dernière. Ils ont observé qu'une mutation du résidu 185 méthionine en valine (M185V) permet d'avoir une augmentation significative de la lumière avec la coelenterazine-h (environ 3 fois) et une augmentation beaucoup plus importante avec la coelenterazine-400a (environ 20 fois). De plus, l'ajout d'une deuxième mutation C124A, qui n'a aucun effet par elle-même, semble promouvoir l'amplification de lumière obtenue par la mutation M185V, permettant ainsi d'obtenir une production de lumière de près de 44 fois supérieure à la *Rluc* native (Loening *et al.*, 2006). Cette *Rluc* avec les mutations C124A et M185V est appelée *RlucII*. Le groupe de Pflieger a comparé directement les différents variant de la *Rluc* avec les deux configurations de BRET et montré que la *RlucII* ainsi que la *Rluc8* augmentaient la sensibilité du BRET_{400-GFP} ce qui accroît le potentiel des applications de cette technologie. De plus, l'utilisation de ces *Rluc* mutants leur ont permis de mesurer des cinétiques d'interactions prolongées avec le BRET_{400-GFP} pour la première fois (Kocan *et al.*, 2008).

Biocapteurs

De manière générale, un biocapteur est constitué d'une cible biologique ou d'une portion d'une cible biologique (enzyme, anticorps, récepteur...) et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique en un signal aisément mesurable et analysable (généralement lumineux). Il existe différentes classes de biocapteurs passant des petites molécules chimiques aux protéines de fusion avec des rapporteurs. Comme il est possible de fusionner génétiquement des transducteurs de signal (fluorescent ou bioluminescent) directement aux molécules biologiques, plusieurs biocapteurs cellulaires ont vu le jour. Ces biocapteurs, produits en cellules vivantes, ont comme principal avantage de permettre une multitude de mesures et ce en temps réel dans des conditions *in vivo*, permettant de suivre pas-à-pas la cinétique d'un effet biologique.

Afin de mesurer le calcium intracellulaire, trois catégories de biocapteurs génétiquement encodés sont principalement utilisées et basées sur la bioluminescence, la fluorescence ou le FRET (voir Figure 18, page 72). Dans le cas des rapporteurs bioluminescents, l'activité bioluminescente de certaines luciférases telles l'aequorin, protéine bioluminescente d'*Aequorea victoria* et l'obelin, protéine bioluminescente d'*Obelia longissima*, est dépendante de la présence d'ions calcium. Dans le cas de l'obelin, la présence d'ions calcium semble permettre un changement de conformation de l'apo-photoprotéine, qui est maintenue dans un état intermédiaire d'oxydation de la coelenterazine, permettant ainsi la complétion de la réaction enzymatique et une production de lumière (Campbell, 1974). En termes de biocapteur, cette enzyme bioluminescente va émettre de la lumière détectable uniquement lorsque la concentration du calcium sera suffisamment élevée pour permettre l'interaction du calcium avec ces trois sites de liaison.

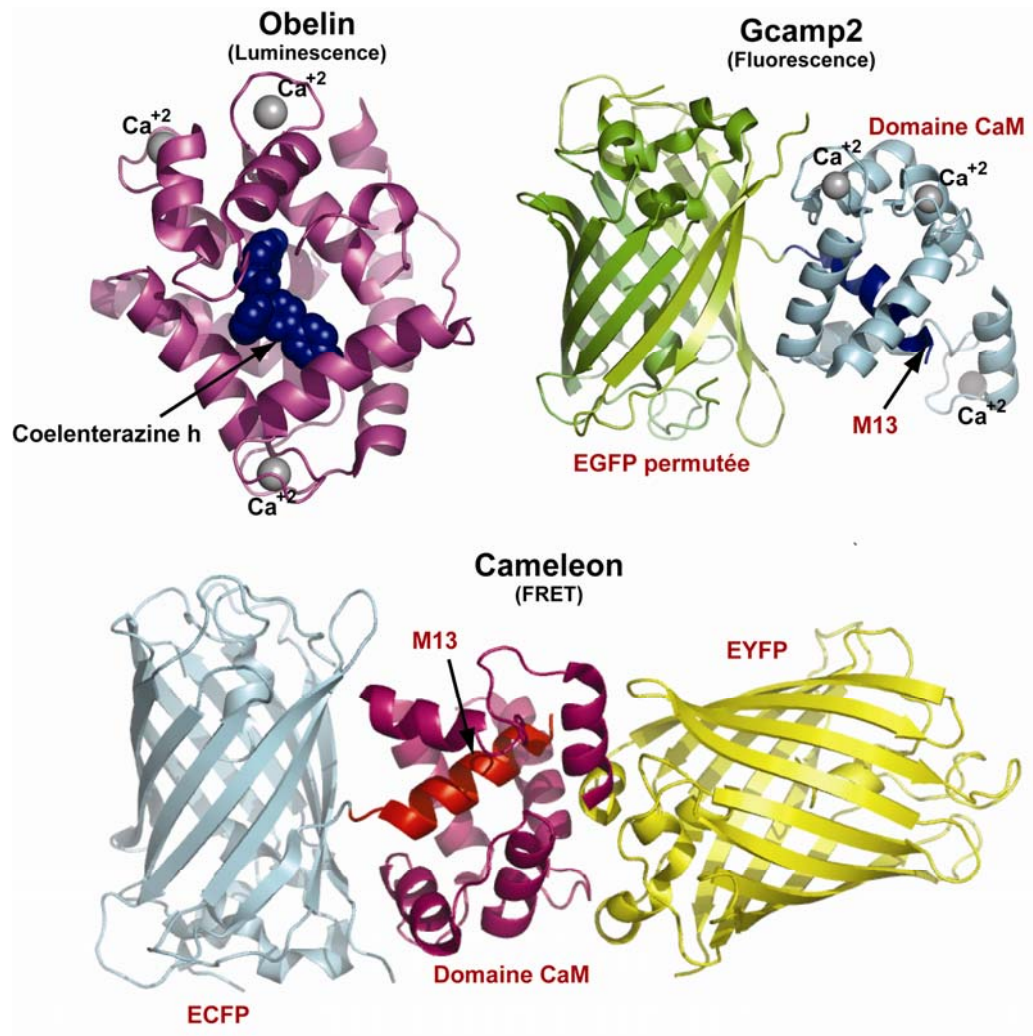


Figure 18: Types de biocapteurs du calcium

Figure produite à partir des PDB 2F8P pour obelin et 3EKJ pour Gcamp2. Pour la Cameleon, une reconstruction manuelle entre 2WSO et 3EKJ a été réalisée avec PyMOL.

Depuis moins de trois ans, il est possible de mesurer la concentration du calcium intercellulaire avec un biocapteur génétiquement encodé basé sur l'apparition de fluorescence. Pour ce faire, le groupe du Dr. Kotlikoff a produit une protéine de fusion entre un domaine d'interaction au calcium de la CaM kinase et un domaine d'une protéine de levure (M13) interagissant uniquement avec à la CaM liée au calcium. Le groupe a

également utilisé les propriétés d'une GFP circulairement permutée, qui consiste à intervertir le C-terminal et le N-terminal de la EGFP. Cette permutation circulaire de la EGFP ne change pas les propriétés spectrales de la protéine fluorescente, mais elle la rend plus sensible aux changements de conformation. En plaçant cette EGFP entre les domaines M13 et CaM, ils ont démontré que la liaison d'ions de calcium conduit à un changement de conformation au sein de cette protéine de fusion (Gcamp2), permettant ainsi la formation du chromophore essentiel à la fluorescence de cette EGFP permutée (Tallini *et al.*, 2006).

Tableau IX: Liste des biocapteurs génétiques FRET

Dim, diminution; aug, augmentation. Les biocapteurs sont divisés en trois catégories; en rouge, les second messagers; en vert, les GTPase; en jaune, le domaine de phosphorylation

Nom du biocapteur	Cible	Domaines d'interaction	Donneur / Accepteur	Amplitude (fois)
Cameleon-2	Calcium	Cam-M13	EBFP-EGFP	1.8 (dim)
Cameleon-YC3.6	Calcium	Cam-M13	CFP-cp173Venus	6.6 (dim)
EPAC	cAMP	EPAC	CFP-YFP	(dim)
cGES-DE2	cGMP	domaine GAF (PDE2A)	CFP-YFP	1.4 (aug)
Raichu-Ras	Ras	Ras, RBD (Raf1)	CFP-YFP	2.0 (aug)
Raichu-Rap1	Rap1	Ras, RBD	CFP-YFP	2.0 (aug)
Raichu-Rac1	Rac1	Rac1, domaine CRIB (PAK1)	CFP-YFP	(aug)
Raichu-Cdc42	Cdc42	Cdc42, domaine CRIB (PAK1)	CFP-YFP	(aug)
Raichu-RhoA	RhoA	RhoA, RBD (PNK)	CFP-YFP	(aug)
AKAr1	PKA	substrat (PKA), 14-3-3	ECFP-Citrin	1.5 (aug)
Srk-indicator	Src	domaine SH2, substrat Scr	ECFP-Citrine	1.3 (dim)
Picchu	EGFR	CrkII (SH2-SH3-SH2) del	CFP-YFP	1.6 (aug)
Aktus	Akt/PKB	substrat Akt/PKB, 14-3-3	CFP-YFP	1.1 (aug)
CKAR	PKC	substrat PKC, FHA2 (Rad53p)	CFP-YFP	1.3 (dim)
EAS-2	ERK2	mEtsI(15-46)	CFP-YFP	(dim)

Le troisième type de biocapteur de calcium est basé sur le FRET intramoléculaire entre un donneur et un accepteur d'énergie qui sont séparés par les mêmes domaines M13 et CaM que le rapporteur de calcium fluorescent Gcamp2. Nommé Cameleon, ce biocapteur de

calcium FRET va changer de conformation en présence de calcium et ce changement de structure va rapprocher le donneur et l'accepteur d'énergie, une CFP et une YFP respectivement, ce qui produira une augmentation du ratio de FRET. Dans la version préliminaire de ce biocapteur, l'augmentation du ratio était faible (Evanko et Haydon, 2005). Par contre, l'utilisation de la permutation circulaire de la Venus a grandement amélioré l'amplitude de la réponse obtenue, passant de 1.8 fois avec la version Cameleon-2 à 6.6 avec la version YC3.6, ce qui rend l'utilisation de ce biocapteur beaucoup plus sensible au changement de calcium intracellulaire (Nagai *et al.*, 2004).

À ce jour, une multitude de nouveaux biocapteurs basés sur la luminescence, la fluorescence ainsi que sur le FRET/BRET ont été décrits, mais de par leur plus grande versatilité et la possibilité de mesurer les changements sur une seule cellule à la fois, les biocapteurs de type FRET ont gagné en popularité (voir

Tableau IX, page 73).

Biocapteurs BRET de l'AMPc

Présentement très peu de biocapteurs de BRET sont disponibles, mais dans les prochaines années, avec les nouvelles protéines fluorescentes ainsi que l'amélioration de la *Rluc*, plusieurs nouveaux biocapteurs BRET devrait voir le jour. L'utilisation de biocapteurs BRET permet de compenser les désavantages du FRET, en éliminant les problèmes d'auto-fluorescence des cellules et de certaines molécules physiologiques, les problèmes de photo-blanchiment, ainsi que l'excitation directe des accepteurs (Gandia *et al.*, 2008). Par conséquent, le BRET est légèrement supérieur au FRET lors de criblages à haut débit. Basé sur un biocapteur d'AMPc FRET (DiPilato *et al.*, 2004), le groupe de Sternweis a mis au

point un biocapteur BRET qui mesure le niveau d'AMPc cellulaire (Jiang *et al.*, 2007). Afin de mesurer le niveau d'AMPc, le biocapteur BRET est composé d'une EYFP (accepteur d'énergie), d'une Rluc (donneur d'énergie) et entre ces deux rapporteurs de BRET, des domaines de EPAC-1, une protéine qui lie naturellement l'AMPc, ont été ajoutés (voir Figure 19, page 75). Comme cette protéine EPAC-1 a comme principale fonction d'activer une petite protéine G (Rap-1), des mutations dans son domaine d'interaction avec cette GTPase ont été introduites afin d'éviter de perturber cette voie de signalisation. Le ratio BRET de base obtenu avec ce biocapteur est relativement élevé, par contre la fixation d'AMPc produit un changement de conformation au sein du biocapteur qui altère la distance entre les deux rapporteurs. Concrètement l'augmentation de la concentration d'AMPc cellulaire produit une diminution du signal de BRET. Cet outil représente une méthode de choix pour suivre la production d'AMPc cellulaire en temps réel suite à l'activation de récepteurs couplés Gs.

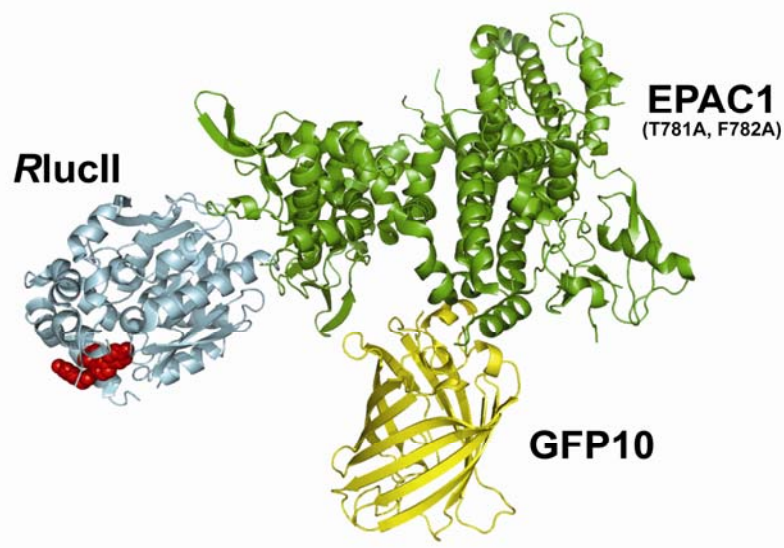


Figure 19: Biocapteur BRET_{400-GFP} de l'AMPc

Combinaison et Multiplexage des technologies de RET

Avec l'explosion des nouvelles protéines fluorescentes, il est maintenant possible d'imaginer la détection d'interactions impliquant plus de deux partenaires. Afin d'y parvenir, différentes approches ont été décrites dans la littérature ayant comme point en commun la combinaison de différentes techniques de mesure d'interactions entre deux partenaires, tels les RET et les essais de complémentation protéique (PCA), de protéines rapporteuses de fluorescence biomoléculaire (BiFC) (Hu *et al.*, 2002) ou de luminescence (BiLC) (Paulmurugan et Gambhir, 2003). Les essais BiFC et BiLC sont basés sur la reconstitution d'un chromophore ou d'une activité enzymatique respectivement, suite au rapprochement des fragments de la protéine rapporteuse séparée en deux. Ainsi les deux fragments sont fusionnés génétiquement aux protéines d'intérêt et lorsqu'il y a proximité entre les deux protéines d'intérêt, l'activité de la protéine rapporteuse est rétablie. Utilisant cette technique de BiFC, le groupe du Dr. Regan a montré la reconstitution de la EGFP suite à l'interaction de deux domaine leucine-zipper qui ont été fusionnés chacun à une portion de la EGFP (Magliery *et al.*, 2005). Par la suite, cette méthode a rapidement été reprise pour les différentes variantes de la GFP (voir Tableau X, page 76).

Tableau X: Liste des différentes GFP et luciférase utilisées en PCA

Ex, excitation; Em, émission; Ch, coelenterazine-h

	Protéines	Site de coupure	Ex/Em
BiFC	EGFP	157–158	485/500
	YFP, Citrine, Venus	154–155 et 172–173	515/528
	CFP, Cerulean	154–155 et 172–173	452/478
	mRFP1-Q66T	154–155 et 168–169	549/570
	mCherry	159–160	587/610
BiLC	RLuc	110–111	Ch/485
	GLuc	93–94	Ch/480

En utilisant le couplage du BiFC de la YFP avec la technique de BRET, le groupe du Dr. Bouvier a été en mesure de montrer l'interaction entre trois protéines, soit un dimère de récepteur CRLR avec une protéine régulatrice RAMP (Heroux *et al.*, 2007). De plus, il est possible de coupler le BiFC avec le FRET et ainsi pouvoir suivre la localisation cellulaire des différentes interactions, comme dans le cas de la formation nucléaire d'un complexe quaternaire entre un hétérodimère Fos/Jun et la sous-unité p65 de NF-kappaB (Shyu *et al.*, 2008).

L'utilisation séquentielle de techniques de RET a également permis d'observer des complexes protéiques à trois partenaires. En utilisant la combinaison du transfert d'énergie entre CFP - YFP et entre YFP-mRFP, appelé 3-FRET, le groupe du Dr. Sorkin a démontré le transfert séquentiel à l'intérieur d'une protéine de fusion CFP-YFP-mRFP possédant des sites de coupure protéolytiques entre les protéines fluorescentes (Galperin *et al.*, 2004). De plus, ils ont montré la formation d'un complexe protéique à trois protéines entre le récepteur tyrosine kinase EGFR et deux protéines régulatrices de son activité, soit Cbl et Grb2. En parallèle, le groupe du Dr. Franco ont démontré la formation d'un complexe récepteuriel comprenant trois récepteurs, soit le récepteur adénosine 2A, le récepteur dopamine D2 et le récepteur canabinoïde CB1, en utilisant un transfert d'énergie BRET entre la luciférase et la GFP² suivi d'un transfert d'énergie FRET entre la GFP² et la YFP (Carriba *et al.*, 2008). Cette technique est nommée transfert d'énergie de résonance séquentiel (SRET). Pour diverses raisons techniques, le transfert séquentiel FRET et BRET-FRET (SRET) reste à ce jour contesté, et plusieurs mises au point seraient requises afin de démontrer hors de tout doute la validité de cette approche. Une partie de la discussion de cette thèse mettra en relief ces points techniques.

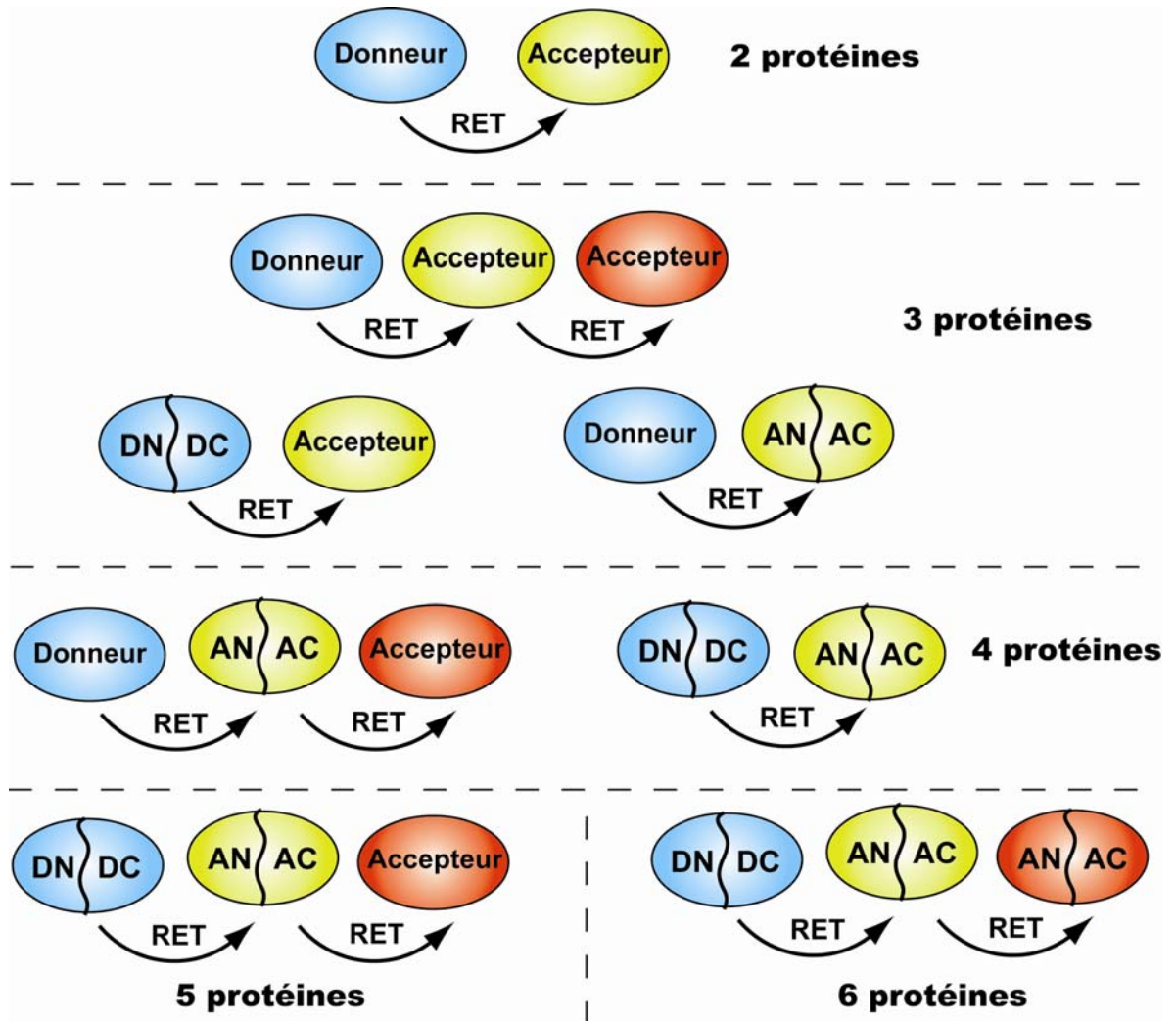


Figure 20: Combinaisons de RET et PCA

De façon logique, après avoir mesuré la formation de complexes à trois protéines avec l'utilisation du BiFC-BRET, certains groupes ont appliqué le concept à la mesure des complexes à quatre protéines. En couplant le BiFC avec le BiLC, et en mesurant un transfert d'énergie entre les deux protéines rapporteuses reconstituées, il est possible de suivre la formation de complexes à quatre protéines. Le groupe du Dr. Hebert et le groupe du Dr. Javitch ont démontré la formation de complexes comprenant quatre récepteurs β 2-adrénérique et récepteurs dopamine D2, respectivement, en fusionnant génétiquement

chacun des deux fragments de *Rluc* et de *YFP* aux récepteurs (Guo *et al.*, 2008). Les évidences de complexes comprenant quatre récepteurs sont davantage convaincantes dans le cas de l'étude du Dr. Javitch, car leurs résultats ont été confirmés par la modélisation des interfaces d'interaction ainsi que des études de réticulation (cross-linking) (Guo *et al.*, 2008). Théoriquement, il serait possible de poursuivre l'idée dans la même direction en utilisant plusieurs BiFC et BiLC afin de mesurer des transferts d'énergie séquentiels pour suivre la formation de complexes à cinq voire même à six protéines (voir Figure 20, page 78).

La combinaison des techniques de RET et PCA permet de mesurer la formation de complexes à plus de deux partenaires. Par contre, le signal résultant de ce transfert d'énergie suite à la reconstitution des rapporteurs nécessite la présence de tous les partenaires en même temps, ce qui limite leur utilisation à la mesure de complexe protéique. Afin de mesurer plusieurs événements cellulaires en même temps et de façon indépendante, certaines technologies ont été mises au point dans les dernières années. L'une de ces techniques, la plus développée dans la lecture simultanée (multiplexage) de bio-essais, est la technologie xMAP de Luminex. Cette technologie est basée sur la séparation par cytométrie de flux de microsphères possédant un code de couleurs spécifiques et qui peuvent être marquées de façon différentielle permettant théoriquement le multiplexage de plus de 100 différents essais dans une seule réaction (Pang *et al.*, 2005). Présentement, il est possible d'avoir des trousse d'essais pour mesurer la phosphorylation de sept kinases (IR, IGF-1R, IRS-1, Akt, PRAS40, p70S6 et GSK-3 β) impliquées dans la voie de signalisation Akt dans un lysat cellulaire. Le principal désavantage de cette technique est la nécessité de mesurer les différents signaux *in vitro* suite à la lyse cellulaire.

Afin de permettre une lecture en cellules vivantes, certains groupes ont commencé à utiliser plusieurs biocapteurs de FRET en même temps. Le groupe du Dr. Danuser a utilisé le

mutiplexing de biocapteurs des petites protéines G, Rac, Cdc43 et RhoA, avec l'assistance de calculs informatiques afin de mettre au point un modèle d'activation différentiel de ces GTPases lors du remodelage de la membrane plasmique (Machacek *et al.*, 2009). La prise de donnée de chacun des biocapteurs est effectuée dans des expériences séparées et la relation entre ces divers événements est comptabilisée afin de générer le modèle final. En d'autres mots, seuls les résultats individuels sont multiplexés et non la prise du signal, ce qui ne simplifie pas réellement l'expérience.

Dans le but d'intégrer différentes voies de signalisation suite à l'activation des RCPG, le groupe du Dr. Roe a utilisé en concomitance le biocapteur FRET d'AMPc et la molécule fluorescente sensible au calcium Fura-2. En présence d'AMPc cytoplasmique, le biocapteur de FRET change de conformation et donne ainsi un signal de FRET différent. De son côté le Fura-2, une petite molécule perméable à la membrane plasmique, possède deux pics d'excitation à 340 nm et à 360 nm qui sont sensibles à la liaison de calcium. Par conséquent, le ratio 340/360 va varier en fonction de la concentration cellulaire de calcium (Harbeck *et al.*, 2006; Landa *et al.*, 2005). Cette étude a permis de démontrer une relation étroite temporelle entre l'oscillation du niveau de production d'AMPc et l'augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium suite à la dépolarisation de la membrane plasmique dans les cellules MIN6 (Landa *et al.*, 2005).

Très peu d'études utilisent le multiplexage des différents signaux dans un seul essai sur des cellules entières. Une partie de cette thèse est justement consacrée à l'élaboration de nouvelles méthodes d'utilisation combinée d'essais de BRET / FRET et de multiplexage d'essais de BRET.

Objectifs de la thèse

L'étude moléculaire des récepteurs de type RCPG est au cœur même de la compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission de l'information extracellulaire aux cellules, ainsi que l'adaptation de ces dernières à leur environnement. Avec les exemples grandissants de la formation d'homodimère/hétérodimère/oligomère de récepteurs fonctionnels pour certains RCPG, il est important de revisiter et d'adapter les différents modèles de signalisation proposés afin d'inclure cette nouvelle réalité. Cette thèse, qui est dédiée à l'étude de la formation moléculaire de complexes protéiques impliqués dans la signalisation des RCPG, vise deux grands objectifs 1) développer de nouvelles approches technologiques pour l'étude des interactions protéine-protéine, 2) appliquer ces approches à l'étude des complexes signalétiques des RCPG.

Principaux objectifs technologiques :

- 1- La mise au point de nouvelles configurations de BRET et leur combinaison dans un seul et même essai, en tirant profit de l'amélioration de la luciférase de *renilla* et de l'augmentation du nombre de couleurs de protéines fluorescentes disponibles.
- 2- L'utilisation combinatoire des configurations de BRET₄₀₀-GFP (aussi connu sur le nom BRET²) et de BRET₄₈₀-YFP (aussi connu sur le nom BRET¹), afin de mesurer les trois interactions binaires indépendantes qui sont présentes au sein d'un complexe à trois protéines, dans les mêmes conditions cellulaires.

Principaux objectifs biologiques :

- 3- Mesurer la cinétique de recrutement des protéines régulatrices, leurs effets sur la formation des complexes récepteur/protéine G, ainsi que l'effet de ces différentes protéines régulatrices entre elles.
- 4- Déterminer la possibilité de détecter différentes sous-unités G α dans un même complexe avec des récepteurs et tester l'influence de tels complexes sur la signalisation des RCPG.

Résultats

Article 1

Multiplexing of Multicolour Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays Allows Simultaneous Monitoring of G Protein Engagement and Second Messenger Generation.

Billy Breton, Christian Le Gouill and Michel Bouvier

Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) est une méthode sensible permettant de mesurer des interactions protéines-protéines et de détecter la signalisation des RCPG via l'utilisation de biocapteurs en cellules vivantes. Par contre, il est difficile de mesurer différents événements cellulaires en parallèle avec le BRET. Avec l'amélioration de la bioluminescence de la luciférase de *renilla*, en mutant deux résidus (C124A et M185V) ainsi que la mise au point de plusieurs nouvelles couleurs de protéines fluorescentes (FP), il a été possible de mettre au point trois nouvelles configurations de BRET ayant comme substrat la coelenterazine-400a (Coel-400a); BRET_{400-BFP} qui utilise la BFP, BRET_{400-CFP} qui utilise la CFP ainsi que BRET_{400-mAmetrine} qui utilise la mAmetrine comme accepteur d'énergie. Comparativement au BRET_{400-GFP} (aussi appelé BRET²), les trois nouvelles configurations de BRET sont légèrement moins sensibles, par contre la GFP2 utilisée dans le cas du BRET_{400-GFP} n'est pas adaptée pour faire des lectures simultanées de différents signaux de BRET. En revanche, l'utilisation combinatoire du BRET_{400-BFP} et du BRET_{400-mAmetrine} a permis pour la première fois de mesurer en parallèle différents signaux de BRET, dans les mêmes cellules. Ainsi, il a été possible de suivre l'activation de la protéine G en même temps que la production d'AMPc par un récepteur couplé à Gas, le récepteur à la vassopressine de type 2 (V2R). En plus de fournir une plus grande variété de couleur de BRET, la mise au point de trois nouvelles configurations de BRET a permis de combiner différents signaux de transfert d'énergie dans un seul essai, permettant ainsi de suivre différentes voies de signalisation en parallèle, dans des conditions cellulaires.

**Multiplexing of Multicolour Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays
Allows Simultaneous Monitoring of G Protein Engagement and Second Messenger
Generation.**

Billy Breton, Christian Le Gouill and Michel Bouvier*

Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Groupe de
Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, CP 6128 Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

*Corresponding author:

Michel Bouvier

Université de Montréal


IRIC

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Qc. Canada, H3C 3J7.

Tel: 514-343-6319

Fax: 514-343-6843

Email: 

Short Title: Multiplexing BRET assays

Abstract

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) is increasingly used to monitor protein-protein interactions and cellular events in cells. However, the ability to monitor multiple events simultaneously is limited by the spectral properties of the existing BRET partners. Taking advantage of newly developed *renilla* luciferases and blue-shifted fluorescent proteins, the possibility of creating novel BRET configurations using a single luciferase substrate and distinct fluorescent proteins was explored. Three new BRET assays leading to distinct colour bioluminescence emission were generated and validated. The spectral properties of two of the fluorescent proteins used (EBFP2 and mAmetrine) and the selection of appropriate detection filters permitted the concomitant detection of two independent BRET signals without cross-interference in the same cell following addition of a unique substrate for *renilla* luciferase-II, coelentrazine-400a. Using individual BRET-based biosensors monitoring the interaction between the V2-vasopressin receptor and the G protein γ_2 subunit and the production of cAMP, we established the proof of principle that two new BRET configurations can be multiplexed to simultaneously monitor G proteins engagement by their receptor and the ensuing production of a second messenger. The development of this new multiplexed BRET configuration opens perspectives for concomitant monitoring of various independent biological processes in living cells.

Keywords (6): Biosensor, BRET, Fluorescent protein, Spectral analysis, Vasopressin receptor, and G-proteins

Introduction

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

used in combination with Rluc-fused proteins, as energy acceptors, to monitor protein-lipid (9) and protein-RNA interactions (10) in living mammalian cells.

To date, three major BRET configurations using distinct Rluc substrates and FPs were developed and used for protein-protein interaction and conformational rearrangement monitoring. BRET1 uses coelenterazine-h (Coel-h) and a yellow FP (YFP) (5, 6), coelenterazine-400a (Coel-400a) and UV-excited green FPs (uvGFP) for BRET2 (11, 12) and coelenterazine-h (Coel-h) and the monomeric orange FP (mOrange) for BRET3(13). Each of these BRET assays present advantages that can be exploited for specific applications. BRET3 resulting in the emission of red light, is less likely to be quenched by biological tissues (compared to yellow and green for BRET1 and 2) and would thus facilitate *in-vivo* detection. BRET2 has the best signal to noise ratio of the three configurations due to the larger Stoke's shift of the uvGFPs and allows monitoring of smaller BRET changes. BRET1 results in the highest absolute signal, in part due to the very high quantum yield of YFP, allowing detection of BRET between proteins expressed at lower levels. In addition, BRET1 and BRET2 can be combined to allow monitoring of three pairwise interactions within the same cell populations (14). However, none of the BRET partners, used so far, allows for simultaneous spectral resolution of signals, a prerequisite for true multiplexing in a single cell. The ability to multiplex BRET signals would allow detection of distinct biological processes simultaneously in a single cell.

With the objective of developing BRET configurations that could be multiplexed, we set out to search for FPs that could serve as BRET acceptors for Rluc-Coel400a. The

identification and characterization of new BRET partners would lead to more flexibility for using BRET in different experimental conditions and could allow using existing collection of proteins already in fusion with different FPs. For this purpose, we took advantage of the recently developed mutant form of Rluc (RlucII) that increases its bioluminescence by a factor of 3 to 45 times depending of the coelenterazine used as substrate (15). Such an increase in the amount of energy emitted by RlucII should theoretically allow monitoring of energy transfer to FPs for which, transfer could not be readily detected using wild-type Rluc due to their less than optimal excitation spectrum overlap with the donor emission spectrum. FPs were selected and tested on the basis that they could all be excited by the same energy donor: Rluc-Coel400a and because they exhibit Stoke's shifts, which allow sufficient spectral resolution for multiplexing BRET signals.

In the present study, we established the ability of four additional FPs (EBFP2, sCFP3a, and mAmetrine) to accept energy transfer from RlucII/coel-400a, generating three new BRET configurations. The spectral properties of mAmetrine and EBFP2 allow for multiplexing with RlucII/coel-400a as an energy donor and thus a simultaneous monitoring of two independent biological phenomena in a single cell.

Materials and Methods

Plasmids

All fusion proteins in this study were subcloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Plasmids encoding the G protein subunits used, in this study, were bought at

Missouri University of Science and Technology (www.cdna.org). The GFP10-G γ_2 construct was previously described (16). From GFP10-G γ_2 , constructs for EBFP2-G γ_2 , sCFP3A-G γ_2 and mAmetrine-G γ_2 were derived by excising the GFP10 coding sequence with NheI-BamHI and replacing it by a PCR-amplified coding sequence of EBFP2, sCFP3A and mAmetrine, respectively. EBFP2 (17), and mAmetrine (18) were from AddGene (Cambridge, MA, USA) and sCFP3 was generously provided by Dr. Gadella (19). The V2R-RlucII fusion was done by PCR from V2R cds and a mutant form of Rluc (15) in which C124 and M185 were replaced by alanine and valine residues, respectively. This mutant Rluc, named RlucII, demonstrates an enhanced energy output from improved enzymatic properties. The BRET-cAMP biosensors were derived from already published GFP10-EPAC-RlucII fusion protein (20), in which GFP10 was replaced by the appropriate FPs using NheI-BamHI restriction enzymes (as described above for the GFP10- γ_2) to generate EBFP2-EPAC-RlucII, sCFP3A-EPAC-RlucII and mAmetrine-EPAC-RlucII. Sequence integrity for the different clones was confirmed by DNA sequencing.

Cells culture and transfection

HEK293s cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (Wisent, Qc, Canada) and, incubated at 37°C in 5% CO₂. Two days before the experiments, 250 ng of total DNA was transfected in 40 000 cell/ml and distributed in poly-ornitine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) - treated white 96-well CulturePlates

(Perkin–Elmer, Waltham, MA, USA), using polyethylenimine 25 kD linear (PEI; Polysciences, Warrington, PA, USA) as transfecting agent (3:1 PEI/DNA ratio). 1- 50 ng of each of the expression vectors was diluted in 150 mM NaCl and the total quantity of DNA was completed at 250 ng with Salmon Sperm DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Bioluminescence and fluorescence spectra detection

Cells expressing the individual FP-EPAC-RlucII fusion protein were seeded at 100 000 cells/well in a 96-well white Optiplate (Perkin–Elmer, Waltham, MA, USA) and the fluorescence spectra were acquired every 2 nm between 430-600 nm after excitation at 400 nm using a FlexStationII microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The bioluminescence spectra were acquired every 5 nm between 360-600 nm after two minutes exposure to 5 μ M coelenterazine 400a (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) using the FlexStationII microplate reader. The graph represents the bioluminescence expressed as a fraction (%) of the donor's maximum intensity in function of the wavelength.

BRET measurements

Transfected cells were washed twice, directly in the 96-well culture plates, with phosphate buffered saline (PBS) and kept in 100 μ l of PBS. BRET was monitored 10 minutes after addition of 5 μ M coelenterazine 400a, in a Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) equipped with different acceptor /donor emission filter sets. Four filter sets were used in this study; Filter set 1: acceptor 530 \pm 20 nm/donor

480±20 nm; Filter set 2: acceptor 515±20 nm/donor 400±70 nm ; Filter set 3: acceptor 480±20 nm/donor 400±70 nm and Filter set 4: acceptor 550 longpass/donor 400±70 nm. For dual BRET assays, measurements were taken with three filters to follow multiple energy transfers: 400±70 nm for the common donor (RlucII-Coel400a), 480±20 nm for EBFP2 BRET and 550 longpass for mAmetrine BRET. BRET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter divided by the emission detected using the energy donor filter. Finally, the specific BRET signal was defined as the difference between the total BRET signals and the one obtained with RlucII alone.

Statistical analysis

Statistical significances of the differences between conditions were assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests with the PrismTM 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Results

Bioluminescent spectra

BRET_{400-GFP} (also known as BRET2) is characterized by an energy transfer from the Rluc-mediated oxidation of coelenterazine-400a (Coel-400a) to UV-shifted GFPs that can be excited at 400 nm and reemit light at 510 nm (ex: GFP² and GFP10) (4). Recently described FPs with different emission wavelengths and Stoke's shifts, but close excitation peak in the dark-blue region of the spectrum; EBFP2 (17), sCFP3A (19) and mAmetrine (18), could represent potential BRET partners for Coel-400a/RlucII for creating novel BRET configurations emitting at different colours . To assess the possible energy transfer between Coel-400a/RlucII and these fluorescent proteins, bioluminescence spectra were measured from cells expressing an unimolecular BRET-based cAMP-biosensor of each color, EBFP2-EPAC-RlucII, sCFP3A-EPAC-RlucII, mAmetrine-EPAC-RlucII and GFP10-EPAC-RlucII. As shown in Fig. 1A-D, the spectra were characteristic of an energy transfer since, both RlucII and FPs' light emissions were observed. In order to determine whether the second peak truly results from fluorophore reemission, which in some cases is a relatively small shoulder (ex: EBFP2), the spectrum for a non-BRET competent mCherry-EPAC-RlucII construct (equivalent to RlucII alone) was subtracted from the recorded spectrum for each FP. As seen in Fig. 1E, the resulting spectra were essentially identical to those obtained following direct light excitation of each FPs (Fig. 1F), confirming that the second peak originated from an energy transfer to an FP.

Since all constructs have essentially the same structure and sequence except for a few mutations within the FPs leading to their specific spectral properties, the observed differences in emission intensity result from their distinct intrinsic ability to be excited and reemit transferred energy from the Coel-400a/RlucII. The differences are dictated by the extent of overlap between the RlucII/Coel400a emission spectrum and the excitation spectrum of a given FP, as well as the quantum yield of the individual fluorophores. Based on the spectral overlap, the best partners for the energy transfer with RlucII/Coel400a are in decreasing order: GFP10, mAmetrine, sCFP3A and EBFP2. Yet, for the amplitude of their emission peak (area under the reemission peak), the order was GFP10 (175.8) > sCFP3A (127.1) = mAmetrine (121.0) > EBFP2 (40.8), which is consistent with the cumulating effect of the donor emission/acceptor excitation overlap and the fluorophore quantum yield, on BRET efficacy. The relatively small reemission observed for EBFP2 is to be expected, given its relatively low quantum yield and a left-shifted excitation maximum peak (386 nm), when compared to the other fluorescent proteins (21). The above data illustrate that energy transfer can be monitored between RlucII/Coel400a and the four UV-shifted FPs tested, opening the possible development of three novel BRET assays; BRET_{400-BFP}, BRET_{400-CFP}, and BRET_{400-mAmetrine} with EBFP2, sCFP3A and mAmetrine, respectively.

Multi-colour BRET:

Given the different spectral properties of the confirmed BRET pairs, we then explored whether some filter sets could optimally detect these BRET. For this purpose, four

donor/acceptor filter sets were tested (480/530, 410/515, 410/480, 410/550) for monitoring bi-molecular BRET between the V2 vasopressin receptor in fusion with RlucII (V2-RlucII) and the γ_2 subunit of a heterotrimeric G protein in fusion with the different FPs (FP-G γ_2) upon stimulation of the receptor with increasing concentration of arginine-vasopressin (AVP). As shown in Fig. 2A-D, both basal and AVP-promoted BRET increases were detected between FP-G γ_2 and V2R-RlucII for several FPs and filters combinations. The basal BRET signal has been attributed to pre-coupling of the receptor with the G protein, whereas the agonist-promoted increase reflects a functional engagement of the G protein by the receptor (16, 22, 23). The BRET generated by specific FPs were differentially detected by distinct filter sets but perfect correlations between basal and agonist-promoted BRET increases were observed independently of the filter set used (Fig. 2E), indicating that the characteristics of the different filters only affect the intensity of the detected signal. Also, the detected EC₅₀ for an AVP-stimulated increase in BRET between V2R-Rluc and each of the FP-G γ_2 were essentially the same, independently of the identity of the FPs or the filter combinations. The optimal filter sets for detecting BRET signals were distinct between each FP; filter set 1 was optimal for GFP10 and mAmetrine whereas filter set 3 was for sCFP3A and EBFP2. These combinations of filters and FPs are thus optimal for developing multiplexing of four well resolved BRET assays. It is noteworthy that even for EBFP2, which yielded the weakest energy transfer (Fig. 1A), the selection of a proper filter set allowed for the detection of a robust signal.

Interestingly, some of the filter sets did not detect the BRET signal generated by some FPs. For example, no BRET could be detected with the mAmetrine- $G\gamma_2$ in filter set 3 or with EBFP2- $G\gamma_2$ in filter set 4. Yet, good BRET signals were observed for mAmetrine- $G\gamma_2$ with filter sets 4, set 1 and to a lesser extent with set 2 and, for EBFP2- $G\gamma_2$, with filter set 3 and to a lesser extent with set 2. The absence of detected BRET between V2R-RlucII and $G\gamma_2$, with certain FPs and some filter sets, did not result from a lack of interaction but from the inadequacy of these filters for resolving emissions from an energy transfer.

A BRET between RlucII and either mAmetrine or EBFP2 can be detected by distinct filter sets without cross-contamination and the monitoring of two independent energy transfer between a common donor (Rluc emission: $400\pm 35\text{nm}$) and two acceptors (EBFP2 emission: $480\pm 20\text{nm}$ and mAmetrine emission: 550 long pass) can be read simultaneously in the same cell.

Multiplexing BRET

To experimentally determine whether simultaneous measurements of BRET between RLucII and both EBFP2 and mAmetrine could be used to differentially follow two events within the same cell, EBFP2- $G\gamma_2$, V2R-RlucII and mAmetrine-EPAC-RlucII were co-transfected to monitor both the G-protein engagement by V2R by direct interaction and the production of cAMP by an unimolecular cAMP-biosensor based on a conformational change induced upon cAMP binding on EPAC. In cells co-expressing V2R-RlucII and

EBFP2- $G\gamma_2$, a significant basal and an AVP- promoted increase in $BRET_{400-BFP}$ were detected (Fig 3A), reflecting the engagement of the G protein by the receptor whereas no significant $BRET_{400-mAmetrine}$ was observed (Fig 3B). In cells co-expressing V2RlucII and mAmetrine-EPAC-RlucII a significant AVP- and forskolin-promoted decrease in $BRET_{400-mAmetrine}$ was detected (Fig. 3B), which indicated an increase in cAMP levels; no $BRET_{400-BFP}$ was detected in these cells (Fig3A). These results confirmed the selectivity of each filter sets for detecting only one of the two BRET events. In cells co-expressing V2R-RlucII, EBFP2- $G\gamma_2$ and mAmetrine-EPAC-RlucII, AVP promoted a significant increase in $BRET_{400-BFP}$ (Fig 3A), reflecting the engagement EBFP2- $G\gamma_2$ by V2R-RlucII as well as a concomitant decrease in $BRET_{400-mAmetrine}$ (Fig 3B) reflecting increase in cAMP levels. Forskolin-stimulated cAMP production also promoted a reduction in $BRET_{400-mAmetrine}$ (Fig 3B) but did not affect the $BRET_{400-BFP}$ (Fig 3A), which is consistent with the ability of Forskolin to stimulate adenylyl cyclase independently of the receptor/G protein interaction. It is worth mentioning that the basal $BRET_{400-BFP}$, observed in cells co-expressing V2R-RlucII, EBFP2- $G\gamma_2$ and mAmetrine-EPAC-RlucII, is lower than in cells expressing only V2R-RlucII or EBFP2- $G\gamma_2$ (Fig. 3A). This can easily be explained by the fact that BRET is a ratio of EBFP2-emission/RlucII-emission and that the RlucII signal originated from both V2R-RlucII and mAmetrine-EPAC-RlucII in these cells. Interestingly, the AVP-promoted $BRET_{400-BFP}$ increase was very similar in the two transfection conditions ($73 \pm 29\%$ vs $60 \pm 11\%$ for cells expressing both or only one RlucII biosensors, respectively) indicating that the presence of the two RlucII-based biosensors did not influence their dynamic response.

As shown in Fig. 3C, in cells co-expressing V2R-RlucII, EBFP2-G γ_2 and mAmetrine-EPAC-RlucII, AVP promoted an increase in BRET_{400-BFP} and a decrease in BRET_{400-mAmetrine} with similar EC50s (9.4 ± 2.8 nM vs 2.4 ± 0.2 nM). These values were in the same range of its K_d (~2nM) (24), which is consistent with the fact that both G protein engagement and cAMP production, are closely linked to AVP binding to its receptor.

Discussion

Our study led to the development of three new BRET generations that complement the existing ones and, provided for the first time a toolbox for simultaneous multiplexing of spectrally resolved BRET assays within the same cell.

Multicolour BRET

To date, three configurations of genetically encoded BRET assays, using Rluc as the energy donor, have been described: BRET1, 2 and 3. BRET 1 and 3 use coel-h as the Rluc substrate for transferring energy to YFPs (eYFP, citrine, venus, YPET) and RFPs (mOrange, mTomato and sdTomato), respectively. BRET2 uses Coel-400a and Rluc as an energy donor and a uvGFPs (GFP10, GFP2 and Sapphire) as energy acceptors. In this study, three additional new BRET generations are presented. They all use coel-400a as an Rluc substrate and acceptor FPs that can be excited at a similar wavelength (~400 nm) but emit at different colours as a result from distinct Stoke's shifts. To prevent confusion between the different Rluc-based BRET configurations, we propose a new nomenclature by indicating first the emission peak of the donor, followed by the name the prototypical FP, which usually reflect its emission colour. According to this nomenclature, the 3 new BRET assays developed herein would be: BRET_{400-BFP}, BRET_{400-CFP} and BRET_{400-mAmetrine} and, BRET1, 2 and 3 would become: BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and BRET_{480-Orange}, respectively.

When comparing the transfer efficacy of the four BRET_{400-FP}, the original BRET_{400-GFP} remains the most robust due to its superior quantum yield and better overlap between the

RLuc emission and FP excitation spectra. The lowest transfer efficacy was observed for BFP, then CFP and Ametrine; this most likely explains why BRET using these FPs was not reported until now. Only the availability of Rluc mutant forms, such as Rluc8 and RlucII (15, 25), that emit higher levels of bioluminescence upon oxidation of Coel400a, opened the possibility of using BFP, CFP and mAmetrine as viable BRET2 acceptors. Indeed, in our hands the amount of light emitted by RlucII, as compared to the wild type enzyme, is 50-200 fold higher thus leading to detectable transfer to BFP, CFP and mAmetrine despite of a sub-optimal overlap between RlucII-400a emission and FPs excitation spectra. The selection of optimal filter sets to quantify the BRET generated by specific fluorophores is also an important parameter to obtain the best signal to noise ratio. Indeed, BRET being a ratio between the emissions a FP over Rluc, the wavelength band-pass of the filters will directly influence the amplitude of the BRET signal determined. Larger BRET ratios are obtained by selecting filters that favour the detection of the FP over that of the Rluc emission. It is however important not to affect the dynamics range of the signals, to select a filter band-pass that will allow the detection of sufficient amount of light to remain within the linear range of the detectors. A good illustration of this phenomenon is provided by observation that the filter set generating the largest signal for the BRET_{400-GFP} are Rluc em: 480±20nm GFPem 530±20 and not Rluc em: 410±35 nm; GFP em: 515±15 nm that are commonly used for this type of BRET (11, 12). The filter sets used do not affect the amplitude of the response since the increase in basal signal was directly proportional to the ligand-promoted increase in BRET between V2-RlucII and GFP-G γ ₂ (fig. 2E). However,

the larger absolute signals allow the detection of small BRET that could be partially hidden in the background noise when non-optimal filter sets are used.

Although BRET_{400-GFP}, which corresponds to traditional BRET₂, remains the BRET system generating the largest signal with RlucII-400a, access to additional BRET colours provides diverse advantages. First, the ability to perform BRET_{400-CFP} represent an interesting alternative to directly use the many proteins and protein libraries that are already CFP-tagged for studying proteins localization or protein interaction in FRET-based systems. Moreover, some FPs such as mAmetrine and EBFP2 have similar excitation profiles but different Stoke's shifts resulting in spectrally resolvable emission spectra that allow multiplexing for the simultaneous detection of two distinct BRET events with a single Rluc substrate in living cells. It should also be noted that even though a single prototypical FP was used for each of the new BRET colour, a selection of FPs could be used for two of the new BRET generations: BRET_{400-BFP} (EBFP, EBFP2, mKalama1), BRET_{400-CFP} (ECFP, sCFP3a, CYPET, mCerulean, mTFP1.0). In some cases, the specific biophysical properties of some FPs could make them preferred choices.

Multiplexing BRET

A few studies described genetically-encoded dual FRET-based assays (26) that allow detecting two FRET simultaneous events within the same cell. These assays provide the advantage of single cell microscopy imaging (26) which despite recent improvements, this

application remains a challenge for BRET due to the low level of light emitted by Rluc and the low sensitivity of microscopy imaging detectors. However, the quantification of two FRET events is complicated by the fact that only a limited numbers of FP pairs are available for efficient transfer. For most existing pairs, the excitation of the donor with a light source leads to the direct excitation of the acceptor. Moreover, the emission spectra of the existing FP FRET acceptors are similar making their spectral resolution difficult leading to spectral bleed-through. This forces the use of mathematical correction factors that are not always easy to reduce to practice and require additional control measurements. When measuring RET using plate readers, in contrast to the situation in microscopy, BRET is more sensitive than FRET. This is due in part to the high sensitivity of the PMT detectors used in plate readers that allows easy detection of BRET. Moreover, light excitation of the donor leads to some level of cellular autofluorescence, is limiting the dynamic range of the FRET responses (27). Thus, for different applications, (ie: imaging vs activity detection in plate readers), either technique may be preferred.

Our study presents a first proof of principle that two BRET events can be monitored simultaneously within the same cell. BRET_{400-BFP} monitored the engagement of G γ by V2R whereas BRET_{400-mAmetrine} detected the conformational rearrangement of a cAMP biosensor. Both events triggered by the activation of the receptor were observed within the same cells without cross-interference of the individual signals. This multiplexing method is distinct and complementary to other BRET approaches previously reported. For instance, the combination of BRET_{400-GFP} and BRET_{480-YFP} described in the accompanying paper (14)

allows the detection of the two signals in the same cell population but not simultaneously in the same cell, due to the use of two different Rluc substrates and the difficulty in resolving the 4 distinct spectra. However, the BRET_{400-GFP}/BRET_{480-YFP} combination also allows detecting FRET between GFP and YFP giving access to all pair-wise RET events between three partners, something that cannot be done with BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing. The BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing allow the monitoring of two BRET signals simultaneously in a single well, this facilitates kinetic comparisons between the two events and reducing the number of manipulation steps needed, thus opening the door to high-throughput screening applications. By its ability to monitor events independently, BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing, is also distinct from recently developed sequential RET (28) and bimolecular fluorescence complementation BRET assays (29, 30) that are designed to monitor a single event involving three partners.

In the present study, BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing was used to combine a unimolecular biosensor (mAmetrine-EPAC-RlucII) with two probes (EBFP2-G γ ₂ and V2R-RlucII) detecting a protein-protein interaction. However, the assays would also allow combining of two unimolecular biosensors or three probes for monitoring the interaction of one partner in fusion with RlucII with two distinct partners in fusion with mAmetrine and EBFP2, respectively. In the latter case, the extent of BRET observed with each of the partner will be influenced by the relative expression levels of the partners. However, these levels can easily be determined by measuring the direct fluorescence of the two spectrally resolved fluorophores and the luminescence from RlucII.

In addition to introducing three new generations of BRET, our study presented a proof of principle that spectrally resolved BRET assays can be multiplexed to monitor two independent cellular events. These assays will definitely be valuable tools to monitor protein-protein interactions as well as other events such as second messenger production for which RET biosensors can be designed. The robustness of the assays and easy implementation, should guarantee a wide utilisation as well as their successful combination with other approaches such as bimolecular fluorescence or luminescence complementation assays (29) (31) to increase the number of interactions that could be simultaneously monitored within the same cell.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Monique Lagacé for her critical reading of the manuscript. BB was the holder of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. MB holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research to MB.

References

1. Morin, J. G., and Hastings, J. W. (1971) Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* **77**, 313-318
2. Dacres, H., Wang, J., Dumancic, M. M., and Trowell, S. C. (2009) Experimental Determination of the Forster Distance for Two Commonly Used Bioluminescent Resonance Energy Transfer Pairs. *Anal Chem*
3. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* **3**, 165-174
4. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**, Unit 5 23
5. Xu, Y., Piston, D. W., and Johnson, C. H. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 151-156
6. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3684-3689
7. Jiang, L. I., Collins, J., Davis, R., Lin, K. M., DeCamp, D., Roach, T., Hsueh, R., Rebres, R. A., Ross, E. M., Taussig, R., Fraser, I., and Sternweis, P. C. (2007) Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem* **282**, 10576-10584
8. Charest, P. G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* **6**, 334-340
9. Pontier, S. M., Percherancier, Y., Galandrin, S., Breit, A., Gales, C., and Bouvier, M. (2008) Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J Biol Chem* **283**, 24659-24672
10. Martel, C., Dugre-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trepanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., and Desgroseillers, L. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA* **16**, 585-597
11. Bertrand, L., Parent, S., Caron, M., Legault, M., Joly, E., Angers, S., Bouvier, M., Brown, M., Houle, B., and Menard, L. (2002) The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *J Recept Signal Transduct Res* **22**, 533-541
12. 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

13. De, A., Ray, P., Loening, A. M., and Gambhir, S. S. (2009) BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J* **23**, 2702-2709
14. Breton, B., C., L. G., and Bouvier, M. (2010) Combining Resonance Energy Transfer Methods Reveals a Complex Between the α_{2A} -Adrenergic Receptor, $G\alpha_{i1}\beta_{1}\gamma_2$ and GRK2. *FASEB J* **Accompanying paper**
15. Loening, A. M., Fenn, T. D., Wu, A. M., and Gambhir, S. S. (2006) Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**, 391-400
16. 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
17. Ai, H. W., Shaner, N. C., Cheng, Z., Tsien, R. Y., and Campbell, R. E. (2007) Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry* **46**, 5904-5910
18. Ai, H. W., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., and Campbell, R. E. (2008) Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nat Methods* **5**, 401-403
19. Kremers, G. J., Goedhart, J., van Munster, E. B., and Gadella, T. W., Jr. (2006) Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* **45**, 6570-6580
20. Leduc, M., Breton, B., Gales, C., Le Gouill, C., Bouvier, M., Chemtob, S., and Heveker, N. (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 297-307
21. Day, R. N., and Davidson, M. W. (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* **38**, 2887-2921
22. Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16077-16082
23. 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
24. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* **105**, 887-895
25. Kocan, M., See, H. B., Seeber, R. M., Eidne, K. A., and Pflieger, K. D. (2008) Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen* **13**, 888-898

26. Carlson, H. J., and Campbell, R. E. (2009) Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 19-27
27. Boute, N., Jockers, R., and Issad, T. (2002) The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 351-354
28. 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
29. Heroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., and Bouvier, M. (2007) Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J Biol Chem* **282**, 31610-31620
30. Rebois, R. V., Robitaille, M., Petrin, D., Zylbergold, P., Trieu, P., and Hebert, T. E. (2008) Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods* **45**, 214-218
31. 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

Figure 1: Bioluminescence and fluorescence emission spectra

Bioluminescence emission spectra of cells over-expressing EBFP2-EPAC-RlucII (A, blue line), sCFP3A-EPAC-RlucII (B, cyan line), GFP10-EPAC-RlucII (C, green line) and mAmetrine-EPAC-RlucII (D, dark yellow line) and negative control mCherry-EPAC-RlucII (A-D, black dash line) were measured following the addition of Coel-400a. The bioluminescence of the mCherry-EPAC-RlucII control was subtracted from the emission spectrum for each FP-EPAC-RlucII fusion proteins and normalized as a ratio of the maximal emission for each FP (E). Fluorescence spectra obtained with cells over-expressing each FP-EPAC-RlucII fusion proteins were measured following direct excitation at 400 nm (F). The curves were generated using the LOWESS fitting equation from the PrismTM 4.0 software.

Figure 2: Multicolour BRET measurements

BRET between V2R-RlucII and either GFP10-G γ_2 (green), EBFP2-G γ_2 (blue), sCFP3A-G γ_2 (cyan) or mAmetrine-G γ_2 (dark yellow) were measured in cells co-expressing the indicated BRET partners and G α_{12} , in the presence or absence of increasing concentrations of AVP. Cells were stimulated for 20 minutes with the indicated concentration of AVP and Coel-400a was added 10 minutes before the readings were taken. BRET was measured using four different filter sets with specific band-pass as indicated in panels A-D. Results are expressed as means \pm S.E.M. of three independent experiments, performed in triplicate; curves were analyzed using a nonlinear regression sigmoid fit from the PrismTM 4.0

software. E) The AVP-promoted BRET was plotted as a function of basal BRET signals of each pair as measured using each of the 4 filter sets. The linear correlations depicted by 4 lines correspond to the BRET values determined by the 4 filter sets for each of the BRET pairs and were obtained using a linear regression fit from the PrismTM 4.0 software .

Figure 3: Multiplexing BRET

BRET_{400-BFP} (A) and BRET_{400-mAmetrine} (B) were measured in cells expressing combinations of V2R-RlucII, Gα12, EBFP2-Gγ₂ and mAmetrine-EPAC-RlucII. BRET was measured in the absence of ligand or following 20 minute stimulation with AVP (100nM) or forskolin (100μM). Coel-400a was added 10 minutes before readings were taken using a single energy donor filter (400±70 nm) and two different energy acceptor filters 480±20 nm for BRET_{400-BFP} and 550LP for BRET_{400-mAmetrine}. Two-way ANOVA analyses followed by Bonferroni post-tests were used to assess the statistical significance of the differences (**P < 0.001). BRET_{400-BFP} between the V2R-RlucII and EBPF2-Gγ₂ (squares) and BRET_{400-mAmetrine} for the cAMP biosensor mAmetrine-EPAC-RlucII (circles) were measured simultaneously, in cells co-expressing these constructs, following 20 minute stimulation with increasing concentration of AVP (C). The results are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments performed in triplicates. The curves were generated using the nonlinear regression sigmoid fit from PrismTM 4.0 software.

Figure 1

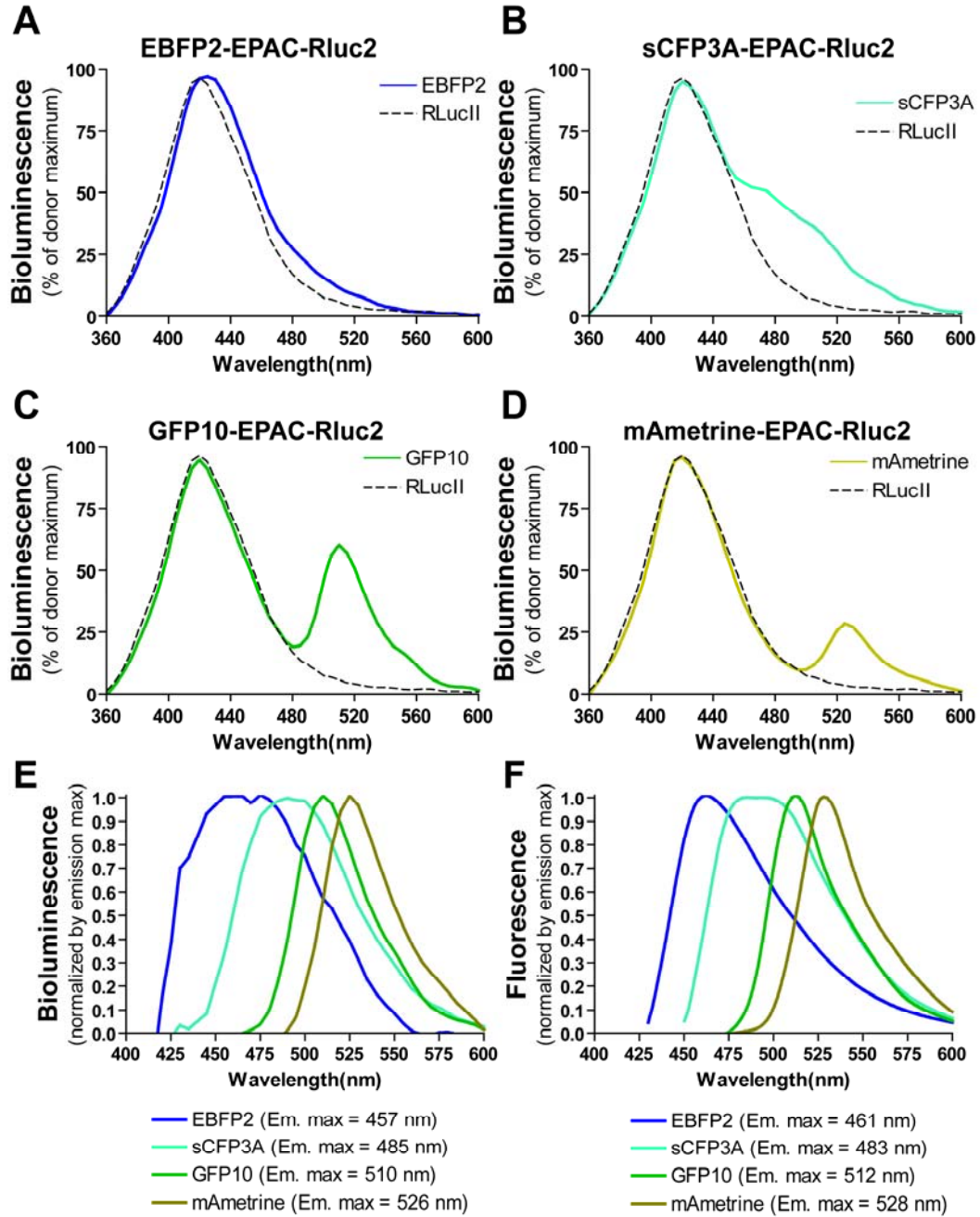


Figure 2

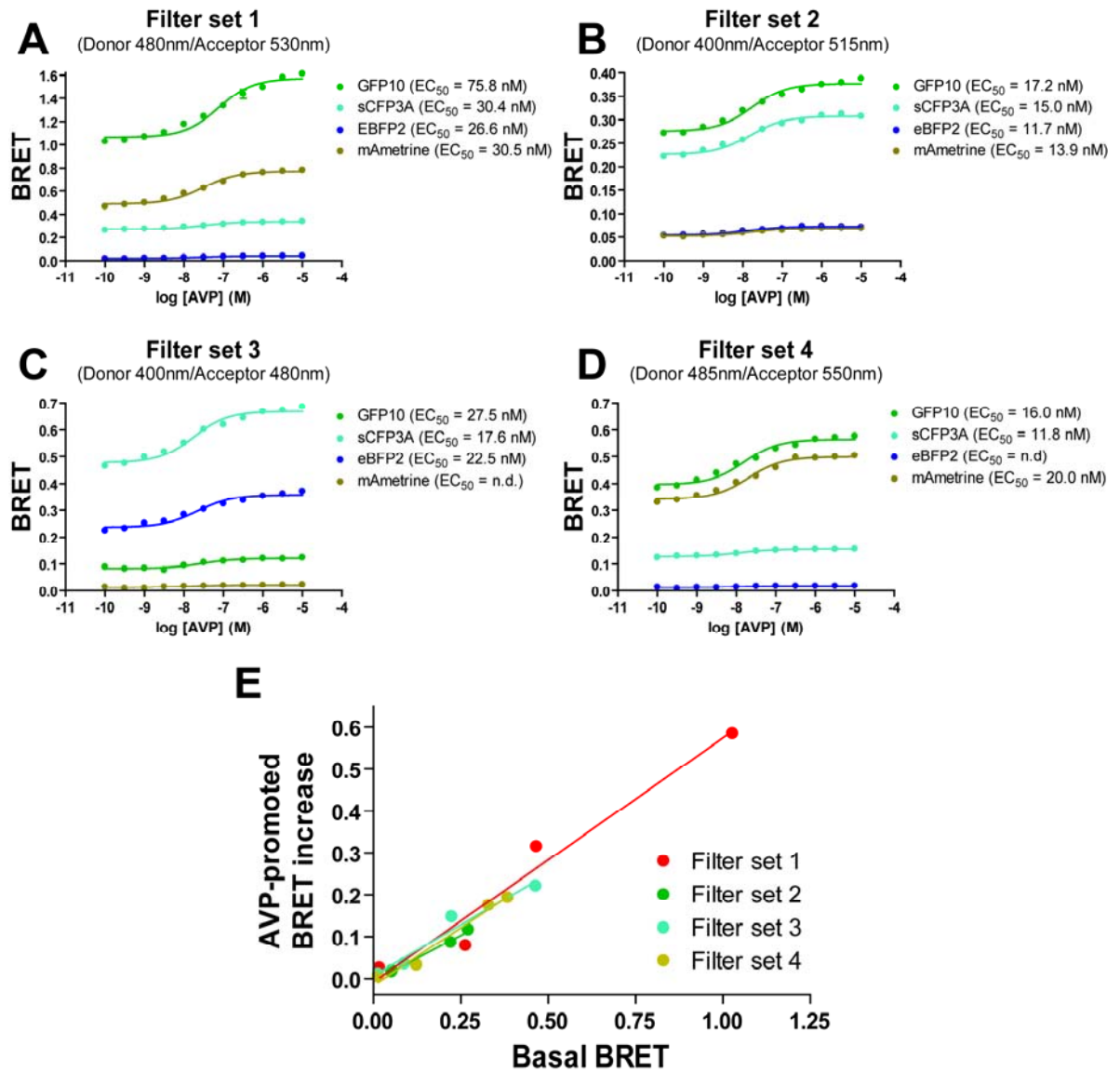
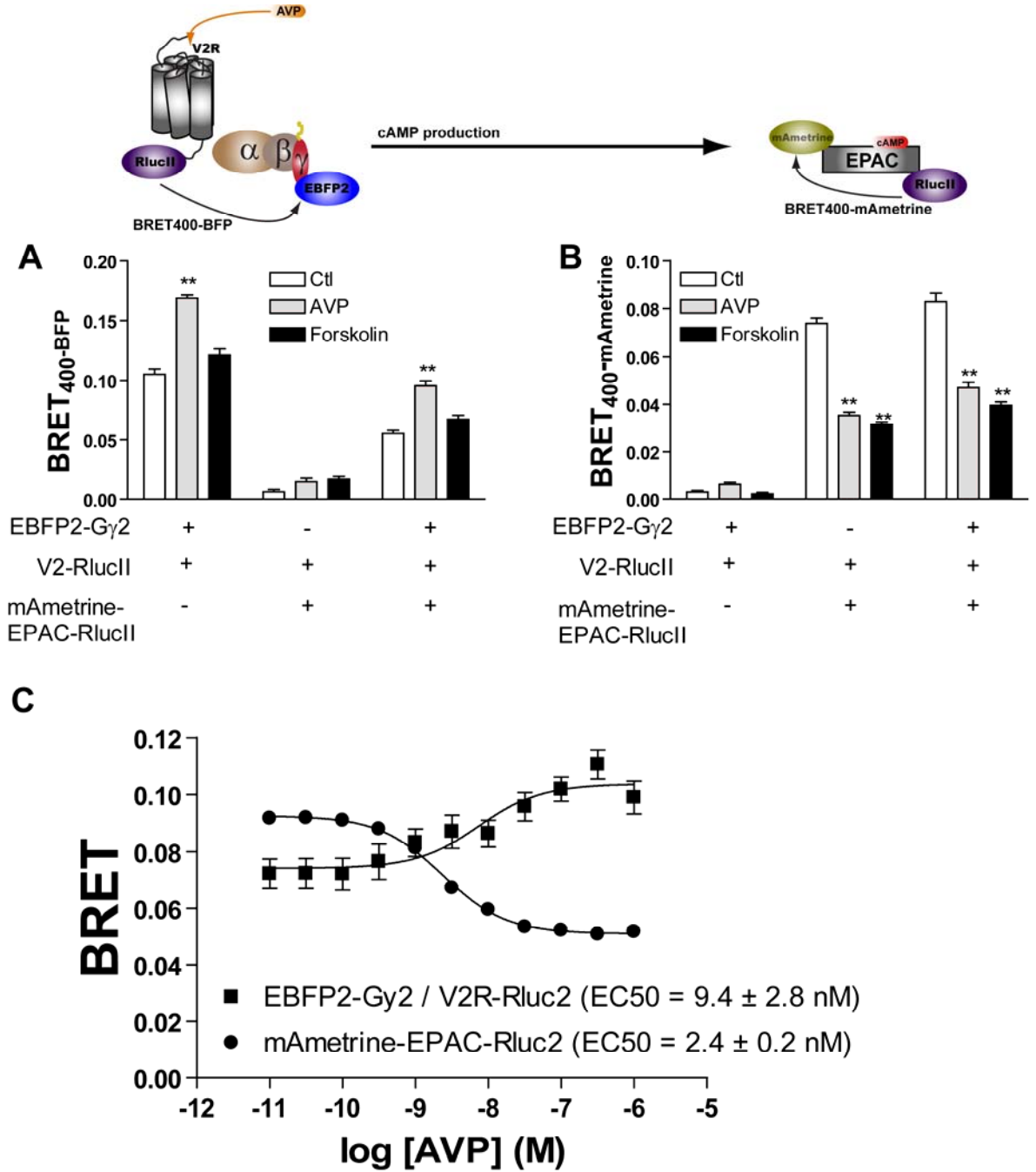


Figure 3



Article 2 :

Combining Resonance Energy Transfer Methods Reveals a Complex Between the α_{2A} -Adrenergic Receptor, $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ and GRK2

Billy Breton and Michel Bouvier

La stimulation ainsi que l'arrêt de la signalisation par les RCPG sont des processus hautement régulés, par plusieurs types de protéines différentes. Afin de mesurer l'importance de certaines de ces protéines régulatrices au niveau de la formation des complexes récepteurs / protéines G, l'utilisation combinatoire du BRET_{400-GFP} (BRET²) et du BRET_{480-YFP} (BRET¹) a été mise au point, pour suivre en parallèle trois interactions protéiques indépendantes au sein du même complexe. Les deux configurations de BRET utilisent le même donneur d'énergie, soit la luciférase de *renilla*, excitée par deux substrats différents (coelenterazine-h dans le cas du BRET_{480-YFP} et la coelenterazine-400a dans le cas du BRET_{400-GFP}), avec comme accepteur d'énergie, des protéines fluorescentes (FP) différentes pour chacun des BRET. Ces accepteurs d'énergie sont aussi des partenaires de FRET, où la GFP2 (FP du BRET_{400-GFP}) devient un donneur d'énergie pour la YFP (FP du BRET_{480-YFP}). Grâce à l'utilisation combinatoire des deux configurations de BRET, il a été possible de suivre l'effet de la GRK2 sur le complexe entre le récepteur α_{2A} -AR et la protéine G, démontrant que l'entrée de GRK2 amplifie le changement de conformation entre $G\beta\gamma$ et le récepteur, sans affecter l'interaction $G\alpha$ -récepteur. De plus, les cinétiques du recrutement de GRK2 au complexe récepteur/protéine G et celle du changement de conformation au sein de la protéine G hétérotrimérique, sont les mêmes, démontrant que GRK2 peut interagir avec le récepteur/ $G\alpha_i$ / $G\beta\gamma$ dans un même complexe. L'utilisation de cette nouvelle méthode de mesure d'interaction protéique a permis pour la première fois de suivre l'effet d'une troisième protéine sur un complexe préformé, ainsi que de mesurer la formation d'un nouveau complexe impliquant différentes protéines régulatrices des RCPG.

Combining Resonance Energy Transfer Methods Reveals a Complex Between the α_{2A} -Adrenergic Receptor, $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ and GRK2

Billy Breton, Monique Lagacé and Michel Bouvier

Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Corresponding author:

Michel Bouvier

Université de Montréal

IRIC

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Qc. Canada, H3C 3J7.

Tel: 514-343-6319

Fax: 514-343-6843

Email: 

Short Title: BRET-FRET combination reveals signaling complexes

Abstract:

Traditionally, G protein-coupled receptor (GPCR) interactions with their G proteins and regulatory proteins GPCR kinases (GRK) and arrestins are described as sequential events involving rapid assemblies and disassemblies. To directly monitor the dynamics of these interactions in living cells, we combined two spectrally resolved bioluminescence and one fluorescence resonance energy transfer methods. The RET combination analysis revealed that stimulation of α_{2A} -AR leads to GRK2 recruitment to the receptor and its associated $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex indicating that GRK interacts with the receptor before a complete dissociation of $G\alpha\beta\gamma$ occurs. The interaction of GRK with $G\gamma_2$ and the α_{2A} AR occurred with kinetics similar to that of the receptor-promoted change in RET between $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$ and persisted until the translocation of β arrestin2 to the receptor indicating that GRK2 remains associated to the receptor/G-protein complex for longer periods than anticipated. Moreover, GRK2 or a kinase-deficient GRK2 mutant potentiated the receptor-promoted changes in RET between $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$ suggesting that the recruitment of GRK2 to the complex contributes to the structural rearrangement of the signaling unit independently of the kinase activity. In addition to reveal unanticipated dynamics in GPCR signaling complexes, the manuscript presents a methodological approach that will be applicable to many biological systems.

Key Words: Bioluminescence, Fluorescence, G protein-coupled receptors, Arrestins, Signaling

Introduction

The events leading to the activation and desensitization of G protein-coupled receptors (GPCR) are generally believed to follow a sequential scheme. Agonist binding to the receptor promotes recruitment of the heterotrimeric G protein and catalyses the exchange of GDP for GTP, leading to the dissociation of the $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ subunits from one another and from the receptor. Following these events, GPCR kinases (GRK) are believed to be transiently recruited to the agonist-bound receptor to catalyse receptor phosphorylation. The increased affinity of the phosphorylated receptor for β arrestins then promotes their association and prevents further productive interactions with the G protein. β arrestins also link the receptor to the adaptor protein, AP2, and clathrin leading to endocytosis. However, the phosphorylation-independent actions of GRK and the roles of both GRKs (1) and β arrestins as scaffolding proteins (2) establishing new signaling modules, challenges this sequential vision of G protein signaling regulation. For instance, GRK were shown to promote G protein signaling desensitization in a phosphorylation-independent manner (3, 4). Although the precise mechanisms remains poorly understood, it was suggested that, at least for GRK2, direct binding to $G\alpha_{q/11}$ family members through a conserved regulator of G protein signaling (RGS) domain may directly inhibit G protein signaling (5). The crystallographic structure of GRK2 complexed with $G\alpha_q$ and $G\beta_1\gamma_2$ subunits revealed that the kinase can bind $G\beta\gamma$ - and $G\alpha_{q/11}$ -subunits simultaneously while maintaining a surface for a possible concomitant interaction with a GPCR, thus providing a plausible structural explanation to the phosphorylation-independent actions of the GRK2 (6). The interaction

between GRK2 and G $\beta\gamma$ dimers through the plextrin homology domain of GRK2 has been well documented (7-9). These data suggest that complexes between GRK2 and G protein subunits may occur upon recruitment of the kinase to the receptors. However, the real time interactions between GRK2 and G proteins have not been investigated in living cells.

In the last few years, fluorescent and luminescent proteins tagged to proteins of interest have considerably contributed to the study of protein dynamics and interactions in cells. In particular, methods based on fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer (FRET and BRET) have been extensively used to monitor both constitutive and dynamic protein-protein interactions in their natural environments (10-12). Whereas FRET involves energy transfer between two fluorophores with distinct emission spectra, BRET results from bioluminescent non-radiative energy transfer to a fluorophore. FRET between many distinct fluorophore pairs have been successfully used to monitor protein-protein interactions. For BRET, two main variants, both using *Renilla* luciferase (Rluc) as the energy donor, have been used. BRET_{480-YFP} (also known as BRET¹) involves the oxidation of coelenterazine h (coel-h; peak emission at 480nm) and energy transfer to a yellow-shifted GFP (classically eYFP or venus; peak emission at 530nm) whereas BRET_{400-GFP} (also known as BRET²) results from the oxidation of coelenterazine 400a (coel-400a; peak emission at 400nm) and transfer to a UV-excitable GFP (classically GFP² or GFP10; peak emission at 510nm) (13, 14).

Here, we combined BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP}, which allows simultaneous real-time monitoring of pair-wise interactions within a multi-protein complex in living cells, to monitor interactions between the α_2 -adrenergic receptor ($\alpha_{2A}AR$), $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$, GRK2.

Materials and Methods

Expression constructs:

All DNA coding sequence for the wild-type receptors, G protein subunits, GRKs (except for GRK5, see below) and β arrestin and those fused to YFP, uvGFP and Rluc were sub-cloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen). The original DNA constructs encoding $G\alpha_{i1}$, $G\beta_1$ and gamma $G\gamma_2$ subunits were from Missouri University of Science and Technology (Missouri S&T, Rolla, MO, USA). The generation and functionality of $\alpha_{2A}AR$ -GFP², $\alpha_{2A}AR$ -Venus, $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, GFP10- $G\gamma_2$ and Rluc- $G\gamma_2$ were described previously (15, 16). The GRK2-eYFP fused protein was a generous gift from Dr Laporte (17). To generate GRK2-Rluc and GRK2-GFP², PCR fragments encoding full-length *Renilla* luciferase or GFP² sequences from the phRluc or pGFP² vectors (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) respectively were sub-cloned in a position equivalent to eYFP in GRK2-eYFP. For GRK2_{K220R}-GFP², PCR-based mutagenesis was used to substitute an arginine in place of the lysine at position 220 of GRK2-GFP². For, GRK5-GFP², the GRK5 DNA sequence containing plasmid pRK5-GRK5 (graciously donated by Dr. Lefkowitz) was amplified by PCR without the stop codon. The full-length GFP² PCR fragment from pGFP² vectors (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was then sub-cloned at the 3' end of the GRK5 sequence. Finally, the construction and functionality of β arr2-Rluc, V2-GFP², GABA_BR1b-Rluc, GABA_BR2-eYFP and GABA_BR2-GFP² were described previously (18, 19). The spectral properties of the all GFP used, are presented in Supplemental table S1.

Cell culture and transfection:

HEK293T were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine (Wisent Inc, St-Bruno, Qc, Canada) and incubate at 37°C in 5% CO₂. Two days before the experiments, 2.5 µg total DNA was transfected for 400 000 cell/ml in 6-well plates using polyethylenimine 25 kD linear (PEI; Polysciences, Inc., Pennsylvania, USA) as transfecting agent (20) (3:1 PEI/DNA ratio). Ten to 500 ng of each of the expression vectors was diluted in 150 mM NaCl and the total quantity of DNA was completed at 2.5 µg with Salmon Sperm DNA.

BRET and FRET measurements:

Transfected cells were washed twice, detached and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). Hundred thousand cells per well were distributed in 96-well microplates (White Optiplate , PerkinElmer, Waltham, MA, USA). BRET_{480-YFP} was read two minutes after exposing cells to 5 µM coelenterazine-h (Nanolight technology, Pinetop, AZ, USA) using the Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany) equipped with acceptor (530±20 nm) and donor (480±20 nm) filters (BRET_{480-YFP} filter set). BRET_{400-GFP} was read one minute after exposing cells to 5 µM of coelenterazine-400a (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) using a modified TopCount NXT microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) equipped with acceptor (515±15

nm) and donor (410±40 nm) filters (BRET_{400-GFP} filter set). FRET_{GFP-YFP} was read following excitation at 400nm and using a FlexStation2 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with the monochomator set at 515±4nm or 538±4nm for detection of the donor and acceptor emission, respectively. For technical simplicity and in order to compare the kinetics of interactions, the reading of each RET mode was generally performed in different wells containing cells derived from the same population of transfected cells. However, BRET-FRET combining measurements can also be performed on the same cells in a unique well (Supplemental Fig. 2).

Total fluorescence and bioluminescence measurements:

Total fluorescence and bioluminescence were evaluated for each well (96-well plate, 100 000 cells/well) using a FlexStation2 and Mithras LB 940, respectively. The uvGFP fluorescence was excited at 400nm and read at 515nm, whereas YFP was excited at 485nm and read at 538nm. Fluorescence values were corrected by subtracting the autofluorescence of cells not expressing uvGFP or YFP. Bioluminescence was evaluated for each well after addition of 5µM coelenterazine h.

BRET and FRET ratio calculation:

RET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter sets divided by the emission detected with the energy donor filter sets. RET ratios were corrected by subtracting the background ratio obtained from cells expressing only the

energy donor. In MRET experiments, $BRET_{400-GFP}$ values were also corrected by subtracting the contamination of the YFP signal within the uvGFP channel (Supplemental Fig. 1). RET titration curves were generated by maintaining the amount energy donor construct constant and transfecting increasing amounts of energy acceptor constructs and, the . The obtained RET, was expressed as a function of the total acceptor fluorescence over the total donor emission (bioluminescence for BRET and fluorescence for FRET) detected for each transfection condition.

Spectral measurement:

Cells were seeded at 100 000 cells/well in a 96-well microplate (White Optiplate) and excitation and emission spectra were acquired using a FlexStation2. Emission values at different wavelengths were expressed as a percentage of the maximal value obtained from the donor. For $FRET_{GFP-YFP}$, uvGFP was excited at 400nm and emission was acquired every 2 nm between 480-580 nm. For $BRET_{480-YFP}$, emission was acquired every 2 nm between 420-600 nm after cell exposure to 5 μ M coelenterazine h and, for $BRET_{400-GFP}$, every 2 nm between 380-550 nm after exposure to 5 μ M coelenterazine 400a.

Calcium measurement

Obelin biosensor was used as cellular calcium reporter (21). Basically, cells transiently expressing Obelin plasmids was washed twice, detached and resuspended in Tyrode's buffer (137mM NaCl, 2.8mM KCl, 12mM $NaHCO_3$, 5.5mM glucose, 0.4mM NaH_2PO_4

and 10mM Hepes, pH7.4). The cells was treated 4 hours with 2 uM coeleterazine-h. In 96-well microplates (White Optiplate), 100 000 cells was added per well and 10 μ M norepinephrine was injected. Luminescence was measured each 500 milliseconds for 30 to 45 seconds using Mithras LB 940 microplate reader without filter.

Statistical analysis:

Statistical significances of the differences between conditions were assessed by ANOVA followed by a posteriori Newman-Keuls test with the Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Combining BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP}

To monitor reciprocal interactions between multiple partners, we took advantage of the spectral properties of luminescent substrates and fluorophores used in BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP}. Whereas the luminescence emitted by Rluc-promoted oxidation of Coel-h and Coel-400a (that are respectively used for BRET_{480-YFP} and BRET_{400-GFP}) selectively excite yellow-shifted (YFP) and ultra-violet-excited GFPs (uvGFP) respectively, the YFP and uvGFP represent good FRET partners. Thus, it is theoretically possible to monitor BRET_{480-YFP} and BRET_{400-GFP} between a protein A tagged to Rluc and proteins B and C tagged respectively to YFP and uvGFP after addition of appropriate coelenterazine, whereas FRET between proteins B and C is measured following photonic excitation of the uvGFP. Fig. 1A describes the spectral properties and filters set used to monitor BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP} while Fig. 1B illustrates that norepinephrine-promoted recruitment of GRK2 to the α_2A AR can be similarly monitored by each type of RET measurements. It follows that possible interactions between different partners could also be monitored in cells expressing three distinct fusion proteins. Successive iterations of three way interaction assessment using multiple partners could therefore offer a view of the dynamic regulation within multi-protein complexes in living cells.

To combine three RET in the same cells, the possible occurrence of signal contamination needs to be adequately evaluated. To this end, the extent of energy transfer from Rluc to each fluorophore YFP and uvGFP, was assessed following independent addition of Coel-h and Coel-400a, respectively. The possible cross-over between BRET systems was controlled for three distinct interacting protein pairs to make sure that the signal overflow is independent of the protein system considered (Supplemental Fig. 1). BRET_{480-YFP} was monitored in presence of both YFP and uvGFP with no meaningful (less than 5%) signal contamination originating from an energy transfer between Rluc-Coel-h and uvGFP. In contrast, contamination originating from energy transfer between Rluc-Coel-400a and YFP was detected upon BRET_{400-GFP} measurements. The YFP signal observed in the BRET_{400-GFP} channels represented $31 \pm 5\%$ of the BRET_{480-YFP} signal observed upon Coel-h addition thus defining the correction factor needed for RET combination experiments. When reported to the BRET_{400-GFP} signals this represent a correction factor of approximately 15%. Another potential source of contamination could originate from sequential resonance energy transfer (SRET) involving BRET from Rluc to uvGFP followed by a FRET between uvGFP and YFP (22); however, no SRET was observed in any of the condition tested (Supplemental Fig. 2).

RET combination to monitor receptor/G-protein interactions

Previous studies have used either BRET_{480-YFP} (23), BRET_{400-GFP} (24) or FRET_{GFP-YFP} (25) independently to monitor interactions between GPCR and their cognate G-protein partners.

Here, we combined the three detection methods to follow the multiple interactions between the receptor and G protein subunits in the same cells. Cells were co-transfected with α_{2A} AR-YFP, $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, uvGFP- $G\gamma_2$ and untagged $G\beta_1$. RET was then measured in absence or presence of increasing concentrations of the α_{2A} AR agonist, norepinephrine. Basal RET signals could be observed for α_{2A} AR-YFP/ $G\alpha_{i1}$ -91Rluc (BRET_{480-YFP}), $G\alpha_{i1}$ -91Rluc/uvGFP- $G\gamma_2$ (BRET_{400-GFP}) and α_{2A} AR-YFP/uvGFP- $G\gamma_2$ (FRET_{GFP-YFP}) (Fig. 2), reflecting the previously reported receptor pre-coupling to the pre-assembled $G\alpha\beta\gamma$ (15, 16, 26). When considering the interaction dynamics, norepinephrine stimulation led to a concomitant concentration-dependent increase in BRET_{480-YFP} signal between receptor and $G\alpha_{i1}$ (Fig. 2A) and decrease in BRET_{400-GFP} between $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$ (Fig. 2C). The treatment did not promote any detectable change in FRET_{GFP-YFP} between α_{2A} AR and $G\gamma_2$ (Fig. 2B) consistent with the notion that receptor activation induces a conformational rearrangement of receptor/G-protein complex without a complete dissociation (16, 27, 28). Given previous results obtained by BRET (15, 16), it is somewhat surprising that no agonist-promoted change in FRET_{GFP-YFP} could be observed between α_{2A} AR and $G\gamma_2$. In independent experiments, significant agonist-promoted increase in BRET_{480-YFP} was detected between α_{2A} AR-YFP and Rluc- $G\gamma_2$ (Fig. 2D), indicating that BRET may be more permissive to detection of conformational changes than FRET_{GFP-YFP}. Whether this is linked to the specific assay configurations used here or reflects more general characteristics of the FRET vs BRET assays remains to be established.

RET combination to monitor receptor/G-protein/GRK interactions

To investigate GRK2 recruitment to the $\alpha_{2A}AR/ G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex, cells were co-transfected with $\alpha_{2A}AR$ -uvGFP, GRK2-YFP and either $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, Rluc- $G\gamma_2$ and the complementary untagged $G\alpha_{i1}$, $G\gamma_2$ and $G\beta_1$. Norepinephrine stimulation promoted a dose-dependent increase in $BRET_{480-YFP}$ between GRK2-YFP and Rluc- $G\gamma_2$, in $FRET_{GFP-YFP}$ between $\alpha_{2A}AR$ -uvGFP and GRK2-YFP as well as in $BRET_{400-GFP}$ between $\alpha_{2A}AR$ -uvGFP and Rluc- $G\gamma_2$ (Fig. 3A-C). These interactions occurred in the same time scale since the measurements were taken 10 min following the addition of norepinephrine. Specificity of the GRK2 recruitment is confirmed by the saturable $BRET_{480-YFP}$ signal observed between $\alpha_{2A}AR$ -Rluc or Rluc- $G\gamma_2$ and GRK2-YFP upon norepinephrine addition. In addition, no BRET was observed between GRK2-YFP and the transmembrane protein CD8-Rluc, used as a negative control (Supplemental Fig. 3).

These results are compatible with the accepted notion that GRK2 is recruited to the receptor upon activation of the G-protein as a result of an interaction between the $G\beta\gamma$ dimer and the C-terminal domain of GRK2 (7, 29). An agonist-dependent increase in $BRET_{480-YFP}$ between GRK2-YFP and $G\alpha_{i1}$ -91Rluc was also observed concomitantly with an increase in $FRET_{GFP-YFP}$ between $\alpha_{2A}AR$ -uvGFP and GRK2-YFP, and in $BRET_{400-GFP}$ between $\alpha_{2A}AR$ -uvGFP and $G\alpha_{i1}$ -91Rluc (Fig. 3D-F). These results suggest that GRK2 is recruited to the receptor while both $G\alpha_{i1}$ and $G\beta_1\gamma_2$ are still in the complex. This is somewhat discordant with the traditional notion that $G\beta\gamma$ recruits GRK2 to the receptor following dissociation of

G α from the G $\beta\gamma$ dimer. However, the results are consistent with several studies indicating that receptor engagement of the G proteins does not lead to an immediate and complete heterotrimer disassembly but rather to a conformational rearrangement of the complex (15, 16, 26). For G α_q , it has been proposed that GRK2 inserts itself as a bridge between G α and G $\beta\gamma$ upon receptor activation (6). Such interaction between GRK2 and other G α subunits has not been documented, but our data suggest that GRK2 could indeed interact with the G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex and contribute to its conformational rearrangement following receptor activation.

To test this hypothesis, we assess the influence of GRK2 on the RET changes between the G-protein subunits and receptor upon activation. Expression of GRK2 led to a significant potentiation of the agonist-promoted decrease in BRET_{480-YFP} between G α_{i1} -91Rluc and YFP-G γ_2 (Fig. 4A). The effect did not require receptor phosphorylation since expressing the kinase-deficient mutant GRK2-K220R had the same effect, suggesting that a conformational change resulting from a physical interaction between GRK2 and the receptor/G-protein complex. However, GRK5 which interact with the receptor independently of the G $\beta\gamma$ dimer (30, 31), did not mimic the effect of GRK2, illustrating the selectivity of the action. We then assessed whether the GRK2 recruitment to the receptor/G-protein complex could be detected at the level of the receptor/G-protein interaction. Over-expression of both GRK2 and GRK2-K220R potentiated the norepinephrine-stimulated increase in BRET_{480-YFP} between α_{2A} AR-YFP and Rluc-G γ_2 ,

while it did not change the agonist-promoted change between $\alpha_{2A}AR$ -YFP and $G\alpha_{i1}$ -91Rluc (Fig. 4B,C). GRK5 over-expression did not influence the $BRET_{480-YFP}$ between $\alpha_{2A}AR$ -YFP and $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, but slightly reduced then agonist-promoted BRET increase between $\alpha_{2A}AR$ -YFP and Rluc- $G\gamma_2$, thus confirming that both GRK2 and GRK5 can interact with the receptor but that only GRK2 can favor reorganization of the G-protein heterotrimer that affect the BRET between the G protein subunits. The fact that GRK2 expression did not alter the agonist-promoted BRET increase between $G\alpha_{i1}$ and the receptor, suggest that the influence of GRK2 primarily results from a movement of $G\beta\gamma$. To further assess the potential role of GRK2 in the conformational rearrangement of the $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex upon receptor activation, the kinetics of GRK recruitment and separation between $G\alpha_{i1}$ and $G\beta\gamma$, the time course of the BRET changes were monitored. As shown in Fig. 5A, the agonist-promoted increase in $BRET_{480-YFP}$ between GRK2-Rluc and either YFP- $G\gamma$ or $\alpha_{2A}R$ -YFP occurred with a kinetic almost identical to the decrease in BRET observed between $G\alpha_{i1}$ -Rluc and YFP- $G\gamma$, consistent with a possible role of the GRK2 recruitment in the structural rearrangement.

Classically, phosphorylation of the receptor by GRKs is believed to be responsible for signaling arrest. However, the observation that GRK can promote a conformational rearrangement of the receptor-G protein complex raises the possibility that such physical interaction may also contribute to the $\alpha_{2A}AR$ signaling regulation. To test this possibility, we assessed the ability of both wild-type and kinase-deficient GRK2 to regulate $\alpha_{2A}AR$ -

stimulated calcium response. Overexpression of either GRK2 or K220R-GRK2 completely abrogated the norepinephrine-stimulated increase in cytoplasmic calcium observed in cells also expressing the α_{2A} AR (Fig. 5B). Overexpression of GRK5 was without effect on the α_{2A} AR-promoted calcium response. These data indicate a phosphorylation-independent action of GRK2 which is compatible with a potential role of its physical interaction with the receptor-G protein complex. In contrast, the kinase activity of GRK2 is important to potentiate the recruitment of β arrestin to the α_{2A} AR. Indeed, over-expression of GRK2 potentiated the norepinephrine-promoted β arrestin2 recruitment to the α_{2A} AR (Fig. 5D) but this potentiating effect was greatly reduced for the kinase-deficient GRK2-K220R confirming that receptor phosphorylation is needed for β arrestin2 recruitment. As is the case for GRK2, over-expression of GRK5 also potentiated the β arrestin2 recruitment indicating that GRK5 can phosphorylate the α_{2A} AR.

Discussion:

The ability to spectrally resolve $\text{BRET}_{480\text{-YFP}}$, $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ and $\text{FRET}_{\text{GFP-YFP}}$ allows the monitoring of each of the reciprocal interactions between three partners expressed in the same cells. The pair-wise interactions within a complex could be adequately monitored because the potential cross-contamination of the different RETs can be corrected by a simple factor compensating for the YFP contamination signals in the $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ readings. The correction factor is determined by the partial overlap between the YFP emission spectrum and the band pass used to monitor uvGFP emission in the $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ configuration. Since they are intrinsic properties of the fluorophores and the filters, the correction factor is not influenced by the energy transfer efficacy and thus remains the same, independently of the protein partners being studied. This was confirmed experimentally by measuring the YFP contamination emission in the $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ signal for 3 distinct protein pairs (Supplemental Fig. 1). The capacity to independently measure each of the pair-wise interactions within a ternary complex allows to detect both increases and decreases of RET occurring simultaneously between distinct pairs. For example, we found that agonist stimulation of the $\alpha_{2A}\text{AR}$ led to an increase in $\text{BRET}_{480\text{-YFP}}$ between the receptor and $\text{G}\alpha_{i1}$ while it promoted a decrease in $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ between $\text{G}\alpha_{i1}$ and $\text{G}\gamma_2$ (Fig. 2). Such detailed analysis of the dynamics of a complex cannot be obtained when using approaches designed to specifically monitor three-way interactions such as 3-fluorophore FRET (32), SRET (22) and RET combined with bi-molecular fluorescence or luminescence

complementation assays (33-35). Combination of RET therefore represents a complementary approach to these previously developed assays.

For technical simplicity and in order to compare the kinetics of interactions, the reading of each RET mode throughout the present study were performed in different wells containing cells derived from the same population of transfected cells (see material and methods). However, the measurements of BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP} can also be performed sequentially on the same cells in a unique well (Supplemental Fig 4). Such configuration could be useful in the context of testing large number of compounds since it significantly reduces the cell culture needs and the number of manipulation associated with the readings.

Using RET combination to assess the interaction between the $\alpha_{2A}AR$, $G\gamma_2$ and GRK2 allowed to detect interactions occurring between each of the three partners. The kinetics of interaction between GRK2- $G\gamma_2$ and GRK2- $\alpha_{2A}AR$ were undistinguishable, consistent with the notion that the $G\beta\gamma$ dimer is responsible for the recruitment of the kinase at the cell surface, allowing phosphorylation of the activated receptor (7, 36, 37). Interestingly, a significant agonist-promoted BRET could also be observed between GRK2 and $G\alpha_{i1}$. Whether this BRET comes from a direct interaction between the kinase and the $G\alpha$ subunit or simply reflects that $G\alpha_{i1}$ is still part of the complex when GRK is recruited to the receptor cannot be determined by the present study. Direct contact between GRK2 and $G\alpha_q$ has previously been shown to occur via the RGS domain of the kinase (38) and the

interaction of GRK2 with both $G\alpha_q$ and $G\beta_1\gamma_2$ has been confirmed by crystallographic analysis of the complex between the three proteins(6). The fact that GRK2 inserts itself as a wedge between $G\alpha$ and the $\beta\gamma$ dimer has been proposed has a mechanism by which GRK2 directly influences the G protein activity independently of its ability to phosphorylate the receptor. However, the fact that G protein subunits other than $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ and $G\alpha_{14}$ could not be co-precipitated *in vitro* with GRK2 has led to the conclusion that such interaction is limited to the $G\alpha_q$ family members (39). Our observation of concomitant RET between GRK2 and both $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$ could indicate that the insertion of GRK2 between $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ also occurs for G_i family members in living cells. This possibility is supported by the observation that over-expression of either WT- or kinase deficient K220R-GRK2 potentiated the receptor-promoted decrease in BRET between $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$. Similarly to what has been observed for G_q family members (39), the conformational rearrangement promoted by GRK2 could contribute to the termination of some G_i mediated signaling activity. Consistent with this possibility, over-expression of GRK2 or K220R-GRK2 abrogated the $\alpha_{2A}AR$ -promoted calcium response as efficiently as the biochemical inactivation of G_i by pertussis toxin treatment. In contrast, GRK5 that could promote the recruitment of β arrestin to the $\alpha_{2A}AR$ but did not affect the receptor-induced conformational rearrangement of the $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex, did not affect the $\alpha_{2A}AR$ -stimulated calcium response clearly indicating that the two GRKs have distinct effects on the $\alpha_{2A}AR$ -signaling. The selectivity of action of different GRK on distinct signaling activities of GPCR has previously been reported. For instance, GRK2 and 3, but not GRK5 or 6, were

found to play significant roles in promoting desensitization of specific G protein-dependent signaling whereas the engagement of GRK5 and 6 but not of GRK2 or 3 were found to be essential for the β arrestin-dependent activation of ERK signaling for several GPCR (30, 40-42)

Although phosphorylation of distinct receptor sites by the different kinases has been proposed to explain the different functional roles of GRK phosphorylation-independent processes could also be involved. Indeed, phosphorylation-independent GRK promoted signal termination been proposed for many GPCR including both Gq- and Gi-coupled receptors (1, 38, 43-54). The results obtained in the present study suggest that GRK2 can regulate the $\alpha_{2A}AR-G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex both by directly promoting a phosphorylation-independent conformational rearrangement of the G protein heterotrimer and promoting the recruitment of β arrestin as a result of receptor phosphorylation. GRK5 for its part, promotes only the second regulatory process. This difference between GRK2 and GRK5 modes of action is most-likely due to the presence in GRK2 but not GRK5 of a plextrin homology domain that permits a direct interaction of the kinase with the G $\beta\gamma$ dimer (1). Taken together, the results suggest a model whereby following $\alpha_{2A}AR$ activation, GRK2 is recruited to the receptor through a direct interaction with G $\beta\gamma$ that then lead to a further conformational rearrangement of the $\alpha_{2A}AR-G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ complex. The observation that G α_{i1} is still associated to the receptor when GRK2 is recruited to the complex is consistent with previous observations indicating that a rapid dissociation of G α and G $\beta\gamma$ from one another

and from the receptor may not occur (15, 16, 27, 55-57) and is not necessary for signaling (58, 59).

The ability to combine different RET that allows kinetic monitoring of pair-wise interactions within larger protein complexes permits probing the dynamics of such complex in a way that cannot be easily achieved with recently developed methods such as 3-FRET (32, 60), sequential RET (22) and combination between RET and bi-molecular fluorescence complementation (33-35) that require the interaction between 3 proteins simultaneously to provide the signal. Here, combining $\text{BRET}_{480\text{-YFP}}$, $\text{BRET}_{400\text{-GFP}}$ and $\text{FRET}_{\text{GFP-YFP}}$ allowed proposing a new mechanism by which GRK2 can regulate of $\alpha_2\text{AR-G}\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ coupling and signaling activity. Because of its wide applicability and ease of implementation, combination of RET measurements represent an attractive addition to the currently existing methods that will most likely be widely used to gain access to the dynamic regulation of the assembly/disassembly and conformational rearrangements of individual pairs within multi-protein complexes.

Acknowledgments :

We thank H. Paris and C. Galés for the gift of the α_{2A} AR-venus plasmid, S. Laporte for the gift of GRK2-eYFP, and M. Héroux and C. Le Gouill for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from Canadian Institute for Health Research. B.B. holds a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and M.B. is the recipient of the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

References:

1. Willets, J. M., Challiss, R. A., and Nahorski, S. R. (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 626-633
2. Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* **277**, 9429-9436
3. Premont, R. T., and Gainetdinov, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 511-534
4. Pao, C. S., and Benovic, J. L. (2002) Phosphorylation-independent desensitization of g protein-coupled receptors? *Sci.STKE*. **2002**, E42
5. Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. B., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the bea2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450
6. Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., and Tesmer, J. J. (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* **310**, 1686-1690
7. Pei, G., Tiberi, M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1994) An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an in vitro-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by G beta gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3633-3636
8. DebBurman, S. K., Ptasienski, J., Boetticher, E., Lomasney, J. W., Benovic, J. L., and Hosey, M. M. (1995) Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *J Biol Chem* **270**, 5742-5747
9. Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J., and Tesmer, J. J. (2003) Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* **300**, 1256-1262
10. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**, Unit 5 23
11. Pollok, B. A., and Heim, R. (1999) Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* **9**, 57-60
12. Pflieger, K. D., Dromey, J. R., Dalrymple, M. B., Lim, E. M., Thomas, W. G., and Eidne, K. A. (2006) Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cell Signal* **18**, 1664-1670
13. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* **3**, 165-174

14. Pflieger, K. D., Seeber, R. M., and Eidne, K. A. (2006) Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**, 337-345
15. 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
16. 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
17. Hasbi, A., Devost, D., Laporte, S. A., and Zingg, H. H. (2004) Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol Endocrinol* **18**, 1277-1286
18. 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
19. Villemure, J. F., Adam, L., Bevan, N. J., Gearing, K., Chenier, S., and Bouvier, M. (2005) Subcellular distribution of GABA(B) receptor homo- and hetero-dimers. *Biochem J* **388**, 47-55
20. Hamdan, F. F., Rochdi, M. D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D. E., Charest, P. G., Laporte, S. A., and Bouvier, M. (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* **282**, 29089-29100
21. Campbell, A. K., and Dormer, R. L. (1975) Studies on free calcium inside pigeon erythrocyte 'ghosts' by using the calcium-activated luminescent protein, obelin. *Biochem Soc Trans* **3**, 709-711
22. 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
23. 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
24. Vrecl, M., Jorgensen, R., Pogacnik, A., and Heding, A. (2004) Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* **9**, 322-333
25. Zimmermann, T., Rietdorf, J., Girod, A., Georget, V., and Pepperkok, R. (2002) Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair. *FEBS Lett* **531**, 245-249
26. 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

27. Frank, M., Thumer, L., Lohse, M. J., and Bunemann, M. (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a Galpha (i)-specific region. *J Biol Chem* **280**, 24584-24590
28. Audet, N., Gales, C., Archer-Lahlou, E., Vallieres, M., Schiller, P. W., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **283**, 15078-15088
29. Boekhoff, I., Inglese, J., Schleicher, S., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., and Breer, H. (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **269**, 37-40
30. Shenoy, S. K., Drake, M. T., Nelson, C. D., Houtz, D. A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R. T., Lichtarge, O., and Lefkowitz, R. J. (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **281**, 1261-1273
31. Chuang, T. T., Paolucci, L., and De Blasi, A. (1996) Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* **271**, 28691-28696
32. Galperin, E., Verkhusha, V. V., and Sorkin, A. (2004) Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat Methods* **1**, 209-217
33. Hebert, T. E., Gales, C., and Rebois, R. V. (2006) Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys* **45**, 85-109
34. Shyu, Y. J., 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 USA* **105**, 151-156
35. Heroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., and Bouvier, M. (2007) Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J Biol Chem* **282**, 31610-31620
36. Haga, T., Haga, K., Kameyama, K., and Nakata, H. (1993) Phosphorylation of muscarinic receptors: regulation by G proteins. *Life Sci* **52**, 421-428
37. Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kontani, K., Katada, T., and Fukada, Y. (1993) Activation by G protein beta gamma subunits of beta-adrenergic and muscarinic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**, 7753-7758
38. Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G., Benovic, J. L., and Kozasa, T. (1999) Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**, 34483-34492
39. Sterne-Marr, R., Tesmer, J. J., Day, P. W., Stracquatano, R. P., Cilente, J. A., O'Connor, K. E., Pronin, A. N., Benovic, J. L., and Wedegaertner, P. B. (2003) G

- protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J Biol Chem* **278**, 6050-6058
40. Kim, J., Ahn, S., Ren, X. R., Whalen, E. J., Reiter, E., Wei, H., and Lefkowitz, R. J. (2005) Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1442-1447
 41. Kara, E., Crepieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., and Reiter, E. (2006) A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol* **20**, 3014-3026
 42. Ren, X. R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., and Lefkowitz, R. J. (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and β -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 1448-1453
 43. Iacovelli, L., Salvatore, L., Capobianco, L., Picascia, A., Barletta, E., Storto, M., Mariggio, S., Sallese, M., Porcellini, A., Nicoletti, F., and De Blasi, A. (2003) Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and beta-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **278**, 12433-12442
 44. Aiyar, N., Disa, J., Dang, K., Pronin, A. N., Benovic, J. L., and Nambi, P. (2000) Involvement of G protein-coupled receptor kinase-6 in desensitization of CGRP receptors. *Eur J Pharmacol* **403**, 1-7
 45. Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D., and De Blasi, A. (1999) Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha(1B)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol Pharmacol* **56**, 316-324
 46. Freedman, N. J., Ament, A. S., Oppermann, M., Stoffel, R. H., Exum, S. T., and Lefkowitz, R. J. (1997) Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem* **272**, 17734-17743
 47. Diviani, D., Lattion, A. L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L., and Cotecchia, S. (1996) Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**, 5049-5058
 48. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* **22**, 3816-3824
 49. Eichmann, T., Lorenz, K., Hoffmann, M., Brockmann, J., Krasel, C., Lohse, M. J., and Quitterer, U. (2003) The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J Biol Chem* **278**, 8052-8057

50. Dhami, G. K., Dale, L. B., Anborgh, P. H., O'Connor-Halligan, K. E., Sterne-Marr, R., and Ferguson, S. S. (2004) G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J Biol Chem* **279**, 16614-16620
51. Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L., and De Blasi, A. (2000) Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol* **57**, 826-831
52. Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K., and Lohse, M. J. (1999) Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 5476-5481
53. Dhami, G. K., Anborgh, P. H., Dale, L. B., Sterne-Marr, R., and Ferguson, S. S. (2002) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J.Biol.Chem* **277**, 25266-25272
54. Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K., Shibasaki, T., Zhou, J., Ishida, J., Fukamizu, A., Haga, T., Sekiya, S., and Kimura, S. (2000) RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling. *Int.J.Mol.Med.* **5**, 335-340
55. Evanko, D. S., Thiyagarajan, M. M., Takida, S., and Wedegaertner, P. B. (2005) Loss of association between activated Galpha q and Gbetagamma disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cell Signal* **17**, 1218-1228
56. Digby, G. J., Lober, R. M., Sethi, P. R., and Lambert, N. A. (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17789-17794
57. Rosenzweig, D. H., Nair, K. S., Wei, J., Wang, Q., Garwin, G., Saari, J. C., Chen, C. K., Smrcka, A. V., Swaroop, A., Lem, J., Hurley, J. B., and Slepak, V. Z. (2007) Subunit dissociation and diffusion determine the subcellular localization of rod and cone transducins. *J Neurosci* **27**, 5484-5494
58. Levitzki, A. (1986) Beta-adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol Rev* **66**, 819-854
59. Klein, S., Reuveni, H., and Levitzki, A. (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3219-3223
60. Lopez-Gimenez, J. F., 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

Figure 1: Illustration of BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP} characteristics.

(A) Rluc-, uvGFP- and YFP-fusion proteins used for BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP} experiments, and the emission spectrum of the energy donor alone (dotted lines) and of RET (full lines) in the presence of the energy acceptor. The blue and green rectangles illustrate the band-pass of the filters used to measure the emission of the energy donor and acceptor respectively, and to calculate RET. In BRET_{480-YFP} the energy donor is the Rluc-catalyzed oxidation of coel-h and the acceptor a YFP, for BRET_{400-GFP}, the energy donor is the Rluc-catalyzed oxidation of coel-400a and the acceptor a uvGFP, in FRET_{GFP-YFP}, the energy donor is the light (400±8nm) excited uvGFP and the acceptor a YFP. Energy transfer spectrum were recorded in cells expressing GRK2 tagged to the energy donor (GRK2-donor) alone or with co-expressed α_{2A} AR tagged to the energy acceptor (α_{2A} AR-acceptor) in the presence of 1mM norepinephrine. **(B)** RET titration curves for BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP} and FRET_{GFP-YFP} obtained in cells co-transfected with constant amount of GRK2-donor and increasing concentration of plasmids encoding α_{2A} AR-acceptor. Cells were treated with PBS (ctrl) or 100 μ M of norepinephrine (Nor) for 10 minutes and coel-h or Coel-400a was added 2 minutes or 1 minute before BRET_{480-YFP} and BRET_{400-GFP} measurements, respectively. RET were expressed as a function of the total amount of energy acceptor/donor ratios. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. The curves were best-fitted using nonlinear (Nor treated) or linear (ctrl) regressions with GraphPad PrismTM. Robust agonist-promoted RET signals were readily observed for the three RET configuration.

Figure 2: MRET application to monitor $\alpha_{2A}AR/G\alpha_{i1}/G\beta_1\gamma_2$ interactions

(A-C) Cells were co-transfected with GFP²-G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} -91Rluc and $\alpha_{2A}AR$ -venus and treated for 10 minutes with increasing concentrations of norepinephrine. **(A)** BRET_{480-YFP} was initiated by the addition of 5 μ M coel-h and measured using 480 \pm 10 nm (donor) and 530 \pm 10 nm (acceptor) emission filter sets. **(B)** FRET_{GFP-YFP} was measured following light excitation at 400 nm by measuring emission at 510 \pm 4 nm (donor) and 538 \pm 4 nm (acceptor) **(C)** BRET_{400-GFP} was initiated by the addition of 5 μ M Coelenterazine 400a and measured using 410 \pm 35 nm (donor) and 515 \pm 15 nm acceptor emission filter sets. **(D)** Cells were co-transfected with Rluc -G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} and $\alpha_{2A}AR$ -venus and treated for 10 minutes with increasing concentrations of norepinephrine; BRET_{480-YFP} was measured as in **(A)**. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. The curves were fitted using nonlinear regression with GraphPad PrismTM. A scheme depicting the expressed proteins in each experimental condition is also shown.

Figure 3: MRET application to monitor $\alpha_{2A}AR/G\alpha_{i1}/G\beta_1\gamma_2/GRK2$ interactions.

Cells were co-transfected with Rluc-G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} , $\alpha_{2A}AR$ - GFP² and GRK2-eYFP **(A, B, C)** or with G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} -91Rluc, $\alpha_{2A}AR$ -GFP² and GRK2-eYFP **(D, E, F)**. Cells were treated for 10 minutes with increasing concentrations of norepinephrine. BRET_{480-YFP} **(A, D)**, FRET_{GFP-YFP} **(B, E)** and BRET_{400-GFP} **(C, F)** were measured as in Fig. 2. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates.

The curves were fitted using nonlinear regression with GraphPad PrismTM. A scheme depicting the expressed proteins in each experimental condition is also shown.

Figure 4: Effects of GRK2 and GRK5 on $\alpha_{2A}AR/G\alpha_{i1}/G\beta_1\gamma_2$ interactions.

Cells were co-transfected with either GRK2-GFP², GRK2-K220R-GFP² or GRK5-GFP² in combination with venus-G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} -Rluc and $\alpha_{2A}AR$ (**A**), Rluc -G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} and $\alpha_{2A}AR$ -venus (**B**) or G γ_2 , G β_1 , G α_{i1} -91Rluc and $\alpha_{2A}AR$ -venus (**C**). Cells were treated for 10 minutes with PBS (ctrl) or 100 μ M norepinephrine (Nor) and BRET_{480-YFP} measured between (**A**) G α_{i1} -Rluc and G γ_2 -venus, (**B**) Rluc-G γ_2 and $\alpha_{2A}AR$ -venus, (**C**) G α_{i1} -91Rluc and $\alpha_{2A}AR$ -venus. Insets show the agonist-promoted BRET changes in the presence and absence of the GRK2, GRK2-K220R and GRK5. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test showed significant differences between cells expressing or not GRKs (*P < 0.01, **P < 0.01 and ***P < 0.001)

Figure 5: Kinetic of GRK2 recruitment and internal heterotrimeric G protein modulation

Cells were co-transfected with (**A**) G α_{i1} wt, G β_1 wt, Venus-G γ_2 , $\alpha_{2A}AR$ wt and Rluc-GRK2, (**B**) $\alpha_{2A}AR$ - Venus and Rluc-GRK2 or (**C**) G α_{i1} -91Rluc, G β_1 wt, Venus-G γ_2 and $\alpha_{2A}AR$ wt. For each condition 5 μ M of coelenterazin-h were added and BRET base line was measured for 30 seconds. Then, norepinephrine (final concentration of 10 μ M) was injected and BRET modulation signal was read for 2 minutes. The data shown is representative of 3

independent experiments conducted in triplicates. A scheme depicting the expressed proteins in each experimental condition is also shown.

Figure 6: Effect of GRK2 on calcium mobilization and β arrestin2 recruitment

(A) Cells were co-transfected with Obelin calcium biosensor and α_{2A} AR in the presence or absence of GRK2-GFP², GRK2-K220R-GFP² or GRK5-GFP². Ptx control was treated with *Pertussis* toxin (100 ng/ml) add 16h before experiment. Total luminescence was measured each 500 milliseconds for 20 seconds after Ctl (1X Tyrod's solution) or 10 μ M norepinephrine injection. In inset. The data shown represent the mean \pm SEM of the luminescence peak maximum of 3 independent experiments conducted in triplicates, In inset, the graph shown the luminescence measured of time of the mock condition. **(B)** Cells were treated for 10 min with PBS (ctrl) or 10 μ M norepinehrine and BRET_{480-YFP} between β arrestin2-Rluc and α_{2A} AR-venus in the presence or absence of GRK2-GFP², GRK2-K220R-GFP² or GRK5-GFP². The inset to d illustrates the agonist-promoted changes in BRET_{480-YFP} in the presence and absence of the GRKs. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test showed significant differences between cells expressing or not GRKs (**P < 0.01 and ***P < 0.001).

Figure 1

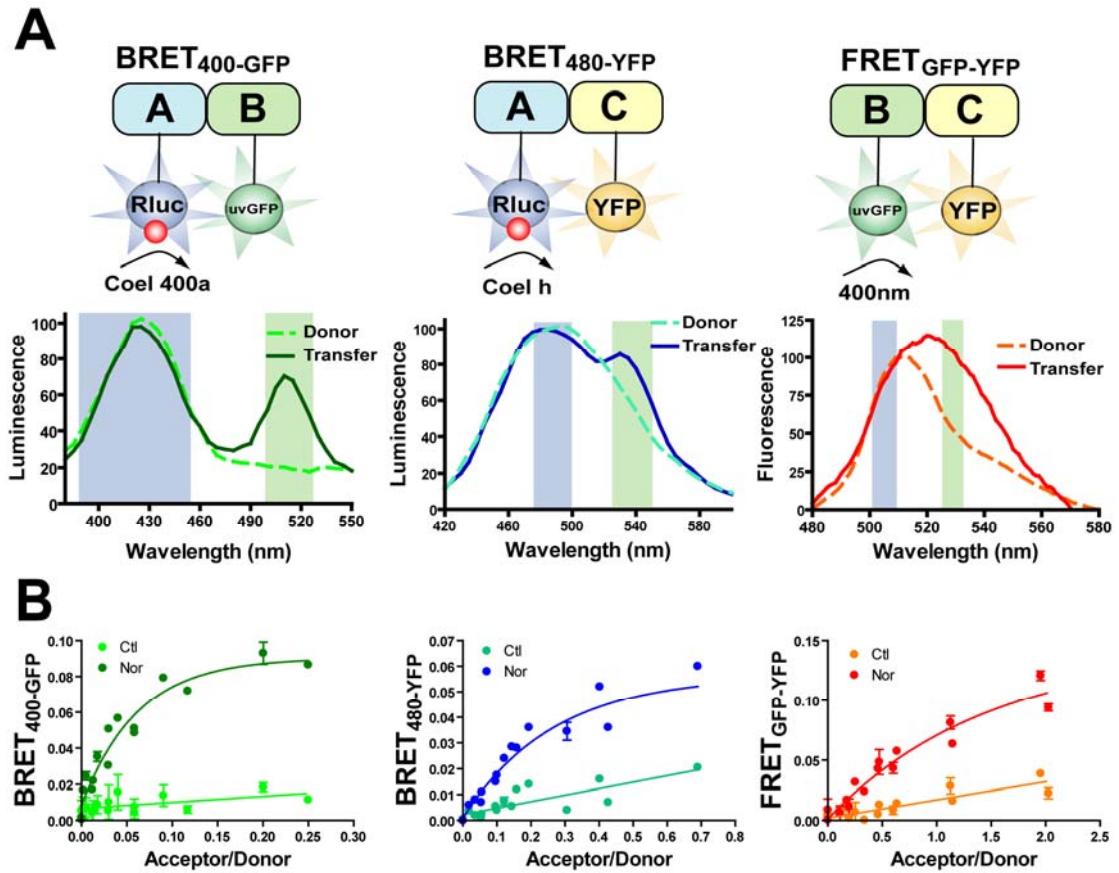


Figure 2

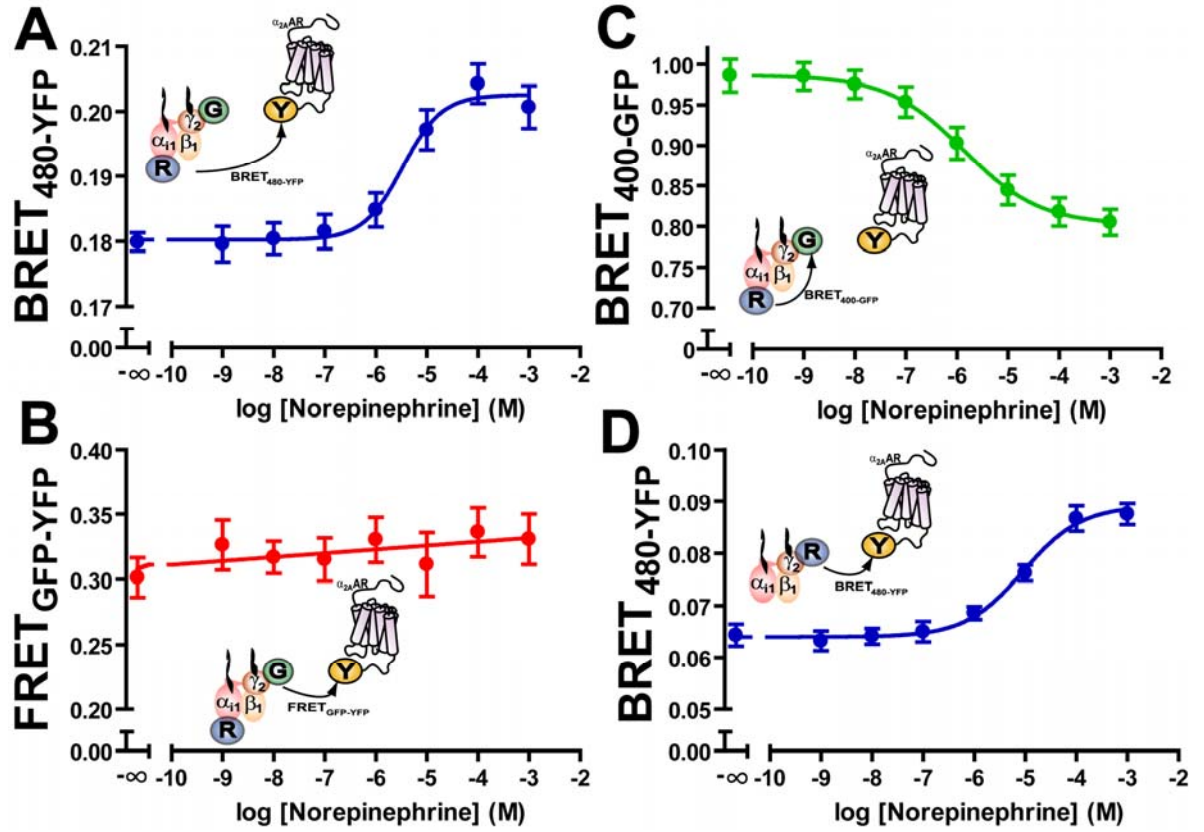


Figure 3

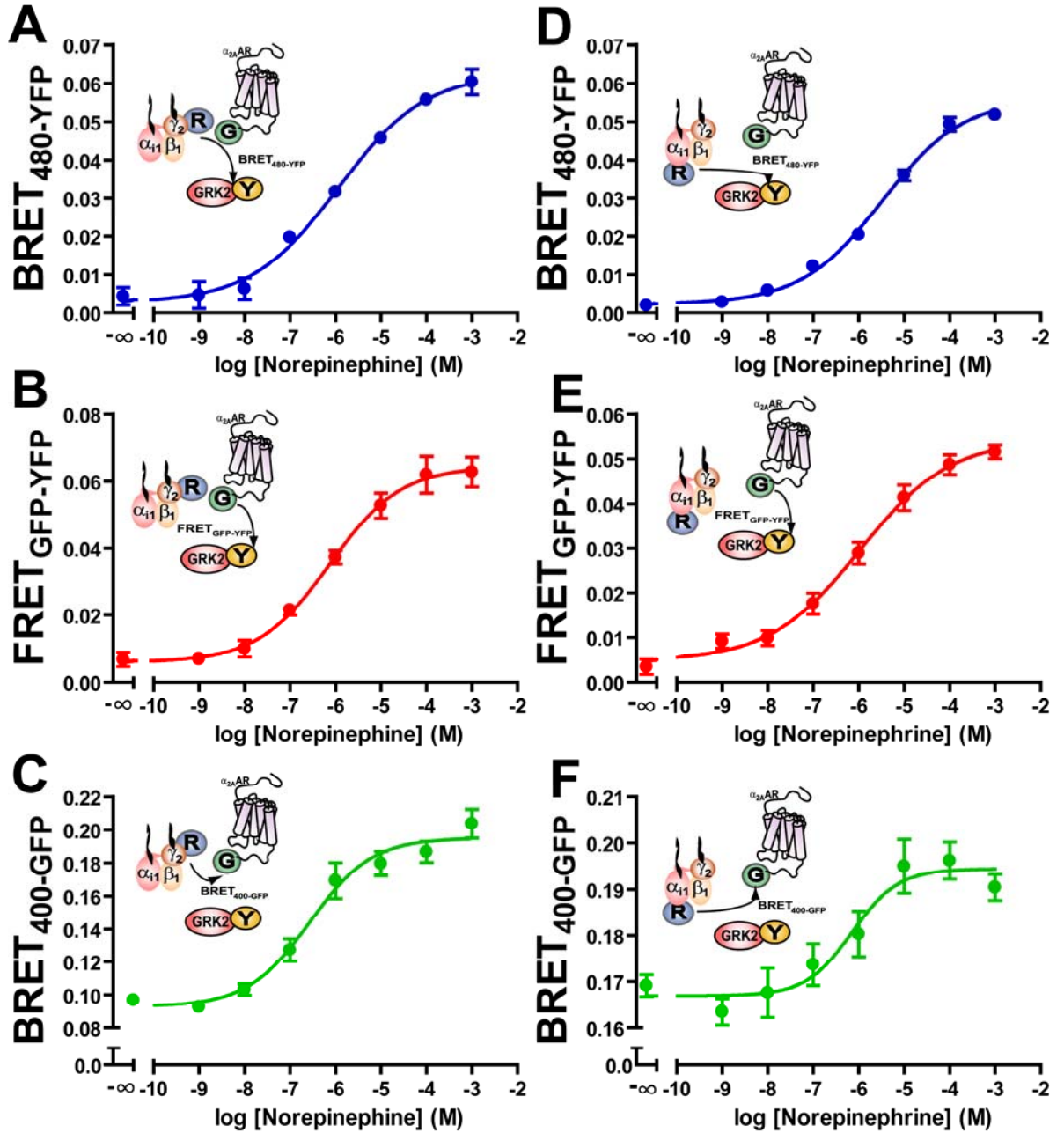


Figure 4

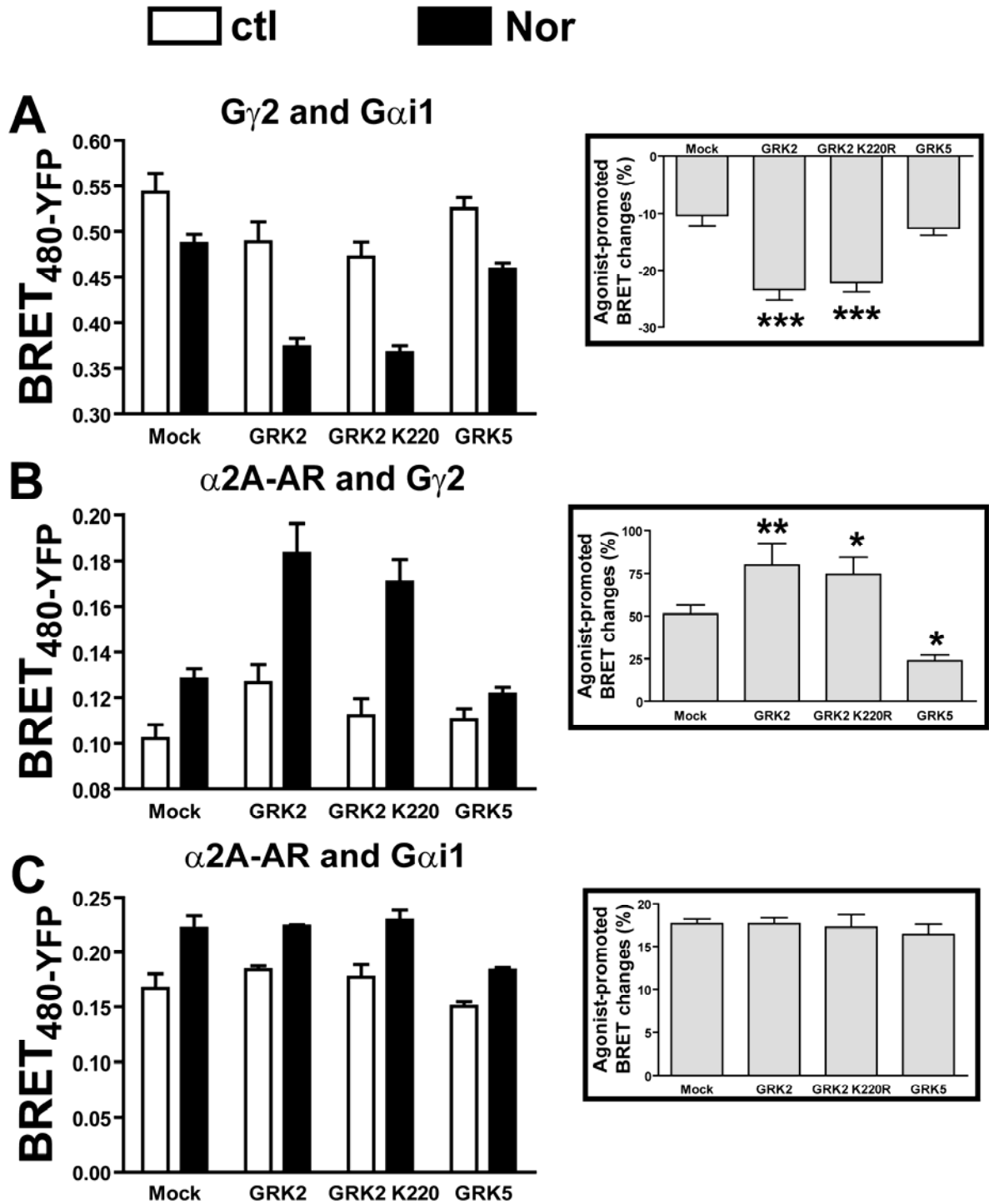


Figure 5

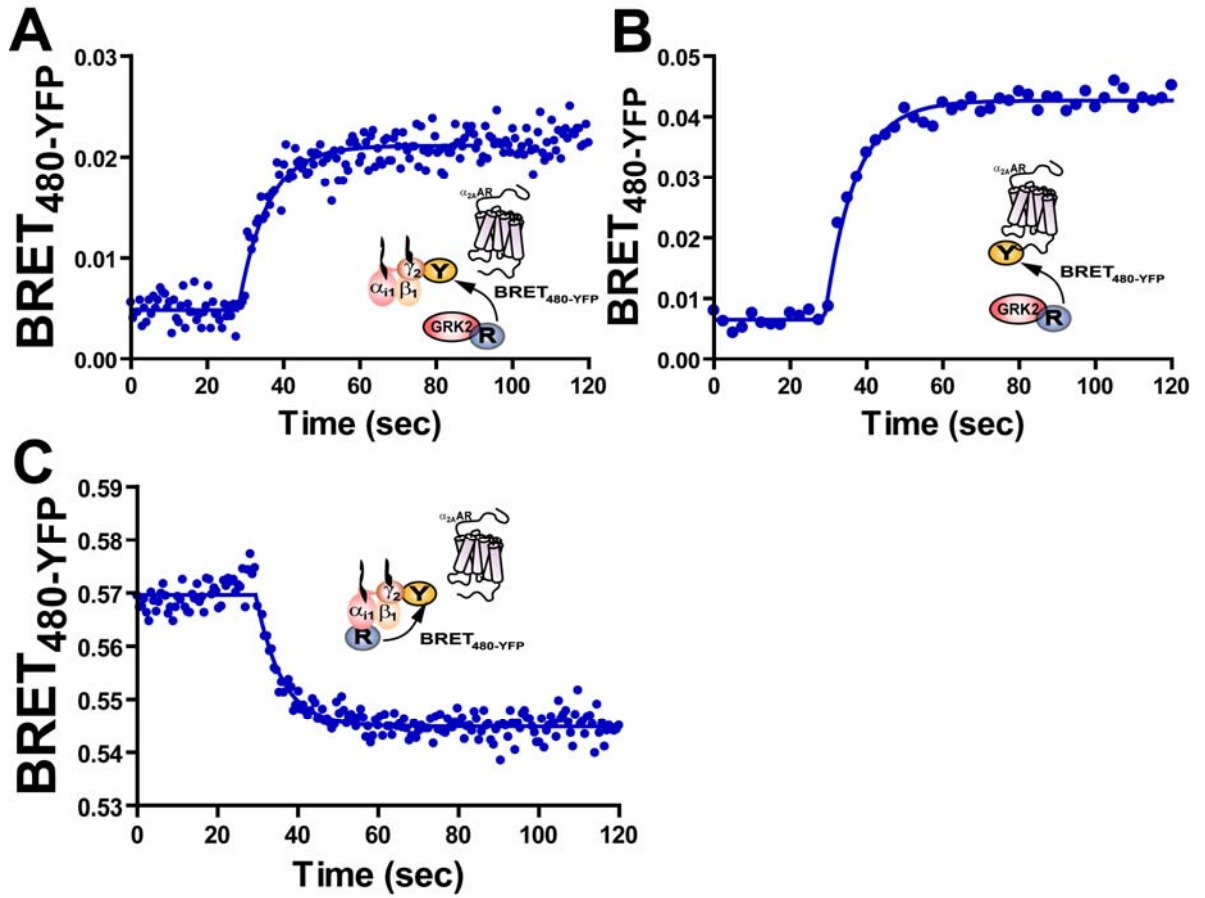
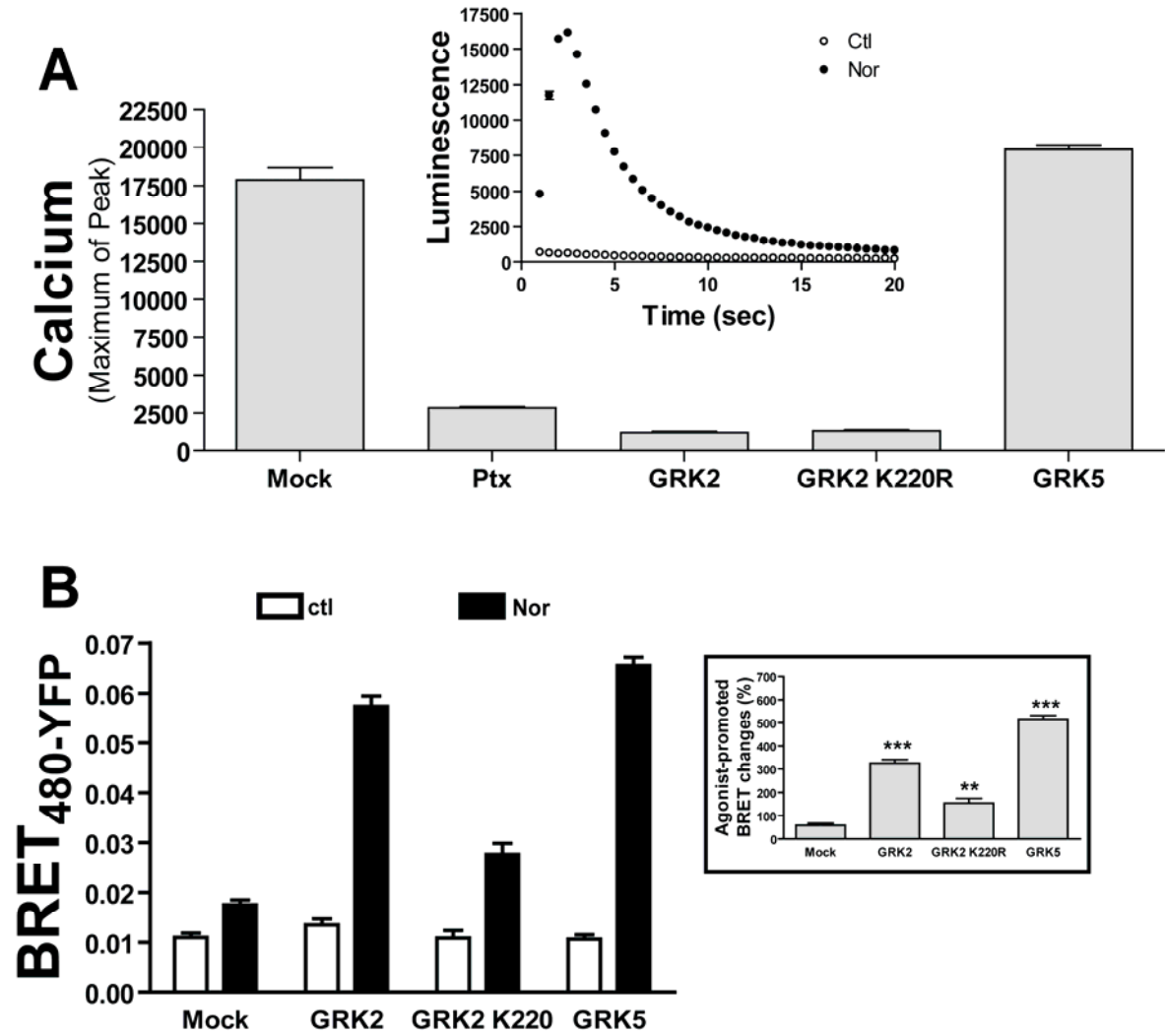
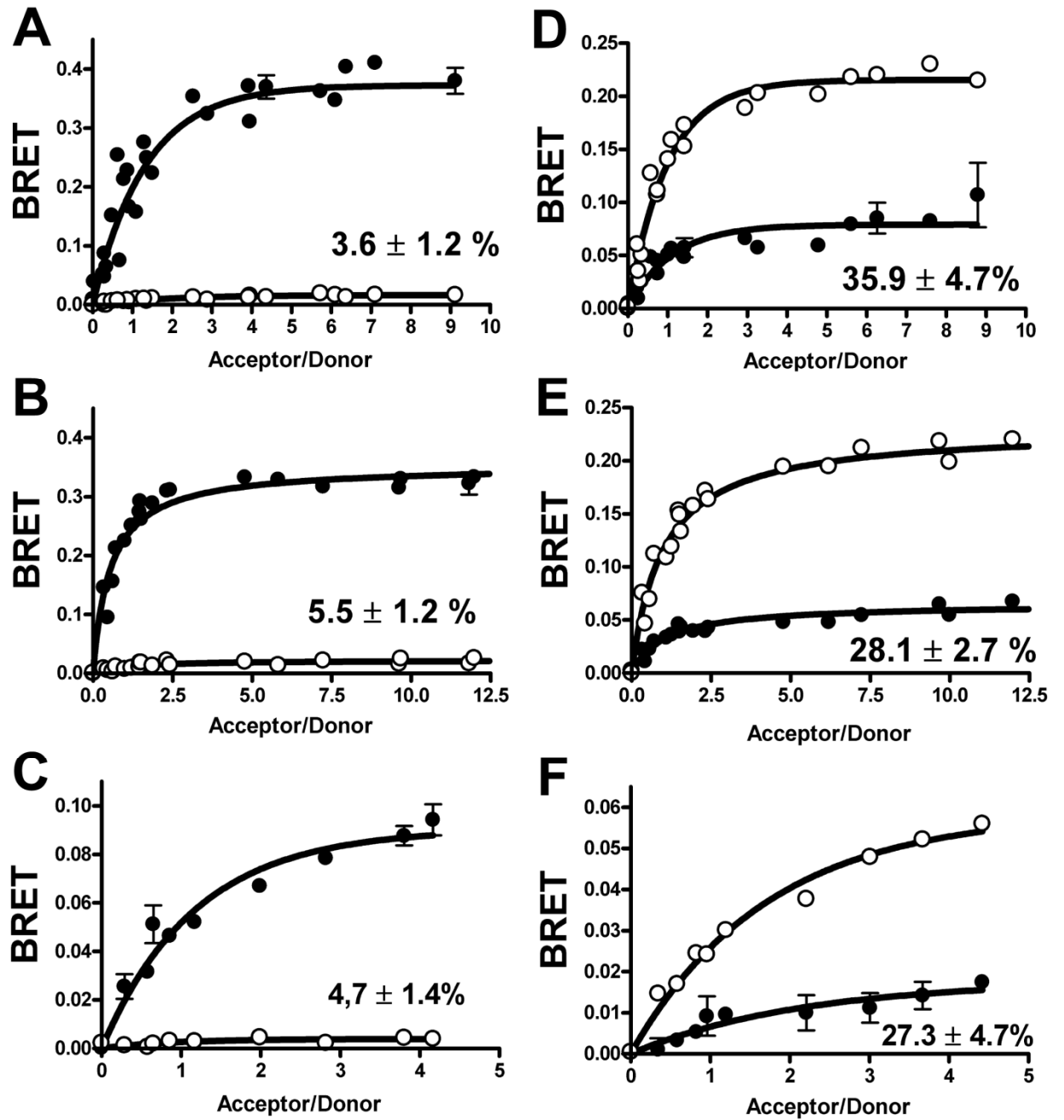


Figure 6

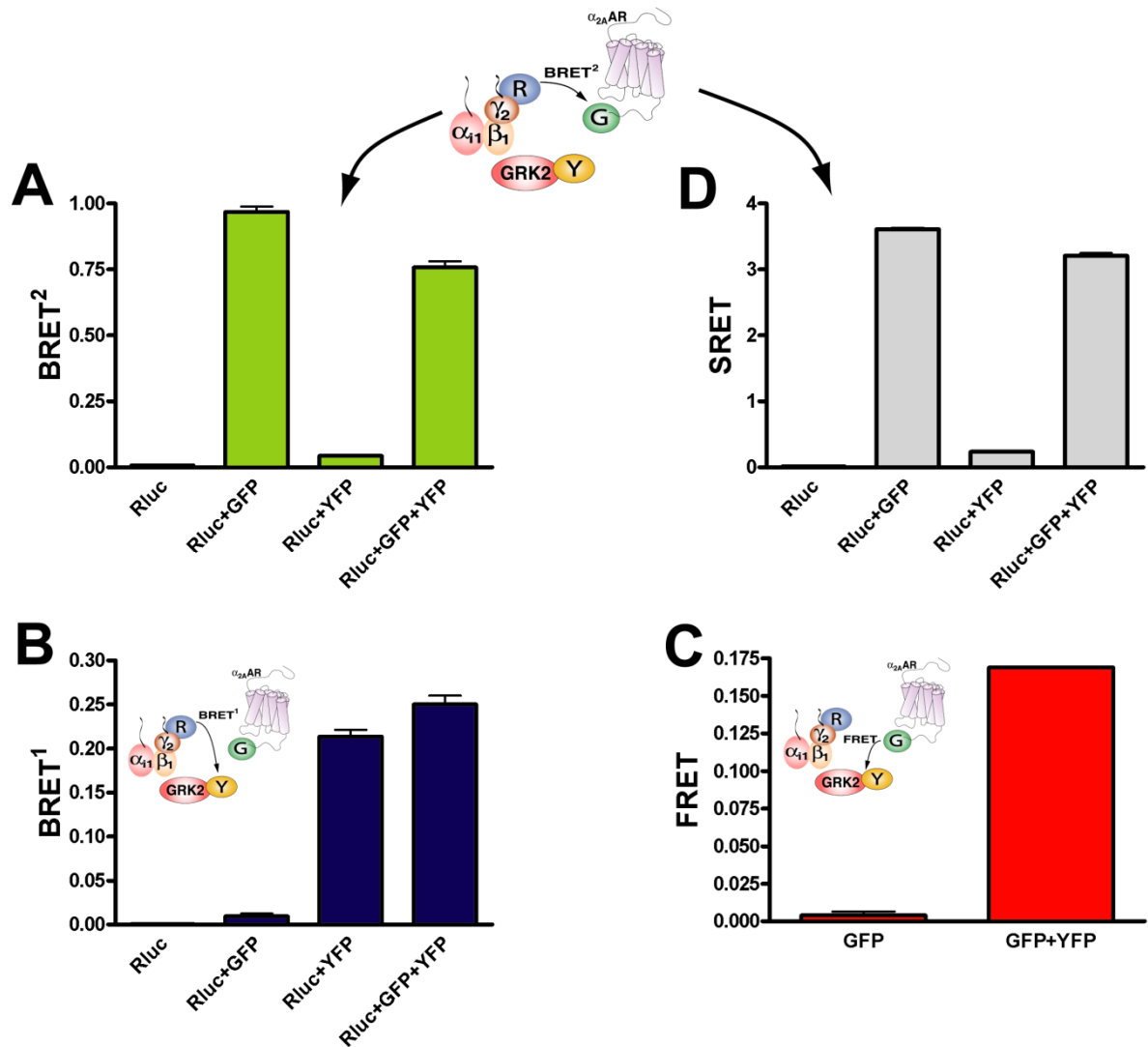


Résultats supplémentaires



Supplemental Figure 1: Assessment of cross-contamination between BRET-1 and BRET-2.

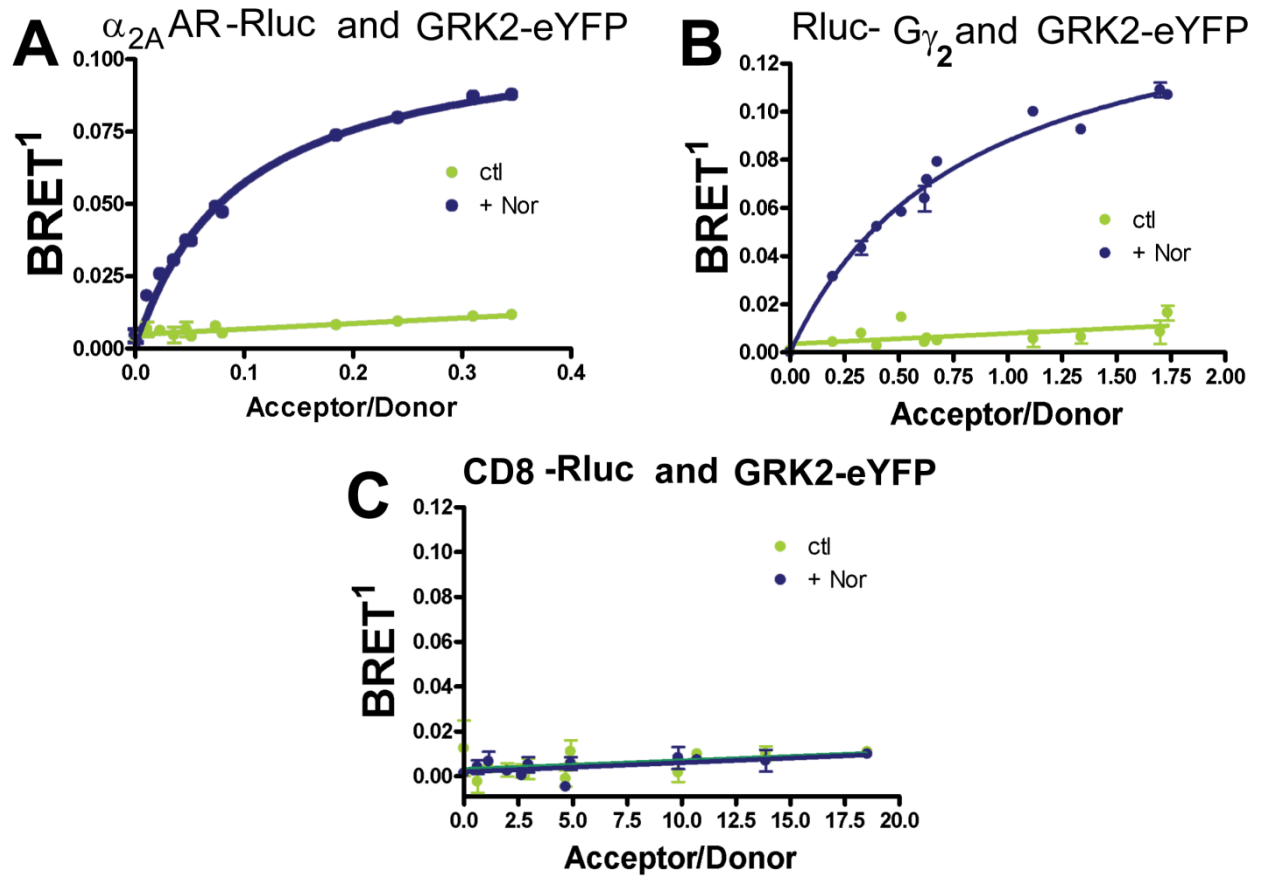
BRET titrations were performed in cells co-transfected with constant amount of Rluc-tagged protein and increasing amount of plasmids encoding the energy acceptor tagged to another protein partner. The RET was initiated by adding either coel-h (● black circle) or colenterazine 400a (○ open circle) and detected using the BRET-1 and BRET-2 filters respectively. The different protein pairs used to assess RET cross-contamination are: a) GABA_BR1b-Rluc and GABA_BR2-GFP², b) Marlin1-Rluc and GABA_BR1b-GFP², c) Rluc-Gγ₂ and V2 receptor-GFP², d) GABA_BR1b-Rluc and GABA_BR2-eYFP, e) Marlin1-Rluc and GABA_BR1b-venus, f) Rluc-Gγ₂ and V2R-venus. A robust BRET was observed between Rluc and uvGFP upon addition of Coel-400a for the three protein pairs in the BRET-2 channels. In contrast, almost no signal (averaging 5± 2% of the Coel-400a-promoted signal for the three pairs) was detected between Rluc and uvGFP in the BRET-1 channels upon addition of Coel-h. Thus, BRET-1 signal can be monitored in the presence of both YFP and uvGFP with no significant contamination of the signal originating from a transfer of energy between Rluc-Coel-h and uvGFP. When considering the reverse orientation, in addition to the strong BRET signal observed between Rluc and YFP in the BRET-1 channels upon addition of Coel-h, a non-negligible signal was also observed between Rluc and YFP in the BRET-2 channel following Coel-400a. The contamination of the YFP signal in the BRET-2 channels represented 31±5% of the BRET-1 signal observed upon Coel-h addition. This means that in cells co-expressing both YFP and uvGFP, 31±5% of the measured BRET-2 signal is from the emission of the YFP rather than the uvGFP. Since almost no contamination occurs in the BRET-1 configuration, the BRET-2 signal measured in an combining BRET-FRET configuration (ie: cells co-expressing Rluc, YFP and uvGFP) was systematically corrected by subtracting 31% of the observed BRET-1 signal to the BRET-2 measured. The basis for the cross-over of the YFP emission in the BRET-2 channel upon Coel-400a oxidation by Rluc and the lack of contamination of the uvGFP signal into the BRET-1 channel can be appreciated when considering the excitation and emission spectra of the fluorophores, and the band-pass of the filter sets used for BRET-1 and BRET-2 (**Supplemental Fig. 5**). Thus, the extent of contamination is defined by intrinsic properties of the fluorophores and the filters used, and thus the correction factor remains the same independently of the protein partners being studied. The correction factor can therefore be established once and for all for a given instrument system (detectors and filter sets) and applied to all experiments without the need of performing independent control measurements every time.



Supplemental Figure 2: Controlling for SRET contamination into combining BRET-FRET configuration.

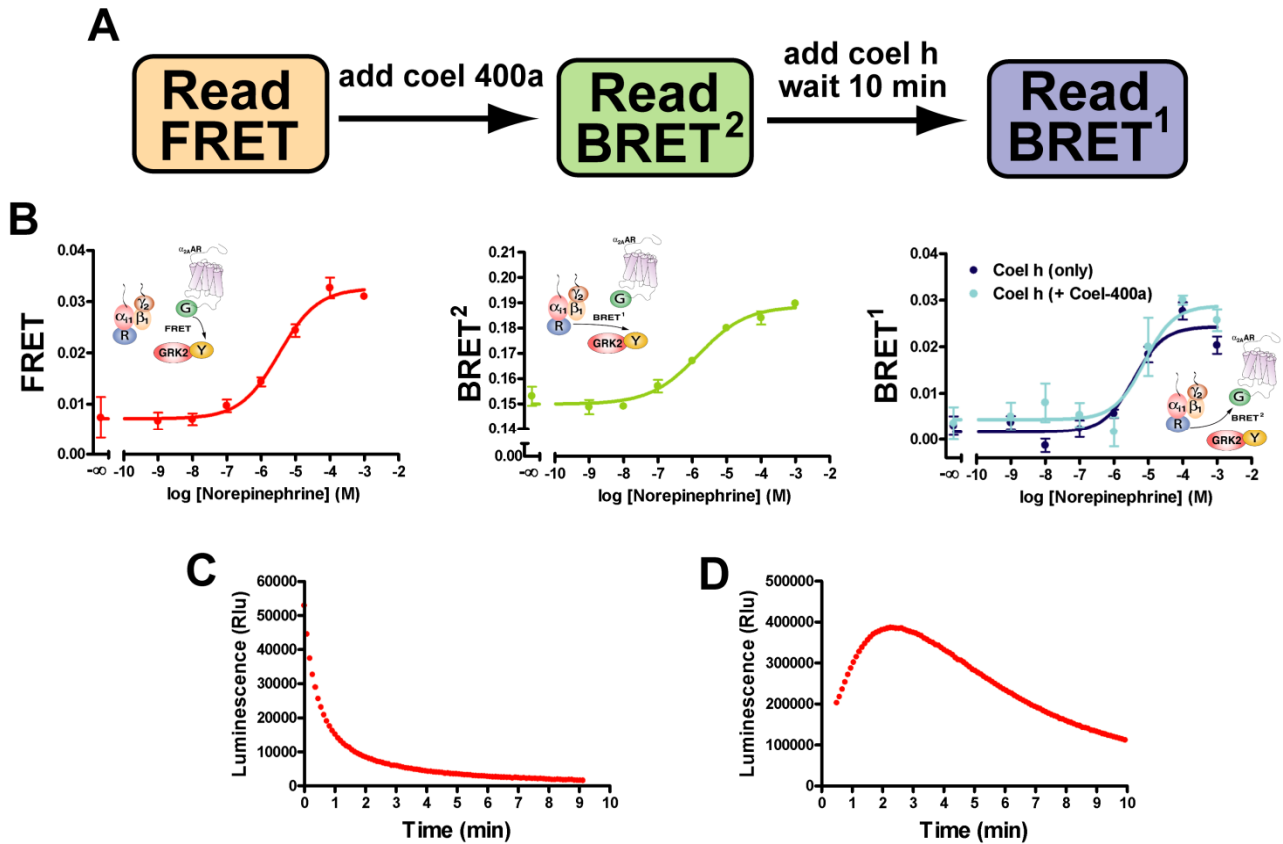
To determine whether the occurrence of SRET could contaminate the BRET-2 signal detected in an combining BRET-FRET configuration, RET were measured in cells expressing the partners pair-wise or altogether using the BRET-1, BRET-2, FRET and SRET2 filter sets. For this purpose, cells expressing $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, $G\gamma_2$, $G\beta_1$ and $\alpha_{2A}AR$ (Rluc) or $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, GFP10- $G\gamma_2$, $G\beta_1$ and $\alpha_{2A}AR$ (Rluc+GFP) or $G\alpha_{i1}$ -91Rluc, GFP10- $G\gamma_2$, $G\beta_1$, and $\alpha_{2A}AR$ -venus (Rluc+GFP+YFP) were used. a) BRET-2 was read in each cell population following injection of coelenterazin 400a ($5\mu M$) using the donor filter at 400 ± 35 nm and the acceptor filter at 510 ± 10 nm. The BRET-2 between $G\alpha_{i1}$ -91Rluc and

GFP10-G γ_2 was not increased upon co-expression of α_{2A} AR-venus indicating that no SRET contaminated the BRET-2 signal. Nevertheless, clear BRET-1 between G α_{i1} -91Rluc and α_{2A} AR-venus (b) as well as FRET between GFP10-G γ_2 and α_{2A} AR-venus (c) were observed upon addition of coel-h and light excitation at 400 nm, respectively. To more directly determine whether SRET occurred between the partner used in our study, the SRET² filters (donor : 400 \pm 35 nm; acceptor 530 \pm 10 nm) were also used (d). Upon addition of coel-400a, the RET signal observed between G α_{i1} -91Rluc and GFP10-G γ_2 was not increased upon co-expression of α_{2A} AR-venus, indicating that no sequential RET between Rluc, GFP² and YFP could be observed in these conditions. These data suggest that the capacity to detect SRET will be highly dependent of the FRET efficacy between the uvGFP and YFP-tagged partners that will need to be sufficient to overcome uvGFP emission bleed through and the direct transfer between the Rluc- and YFP-tagged partners.



Supplemental Figure 3: Specificity of the BRET-1 signal between GRK2 and its partners.

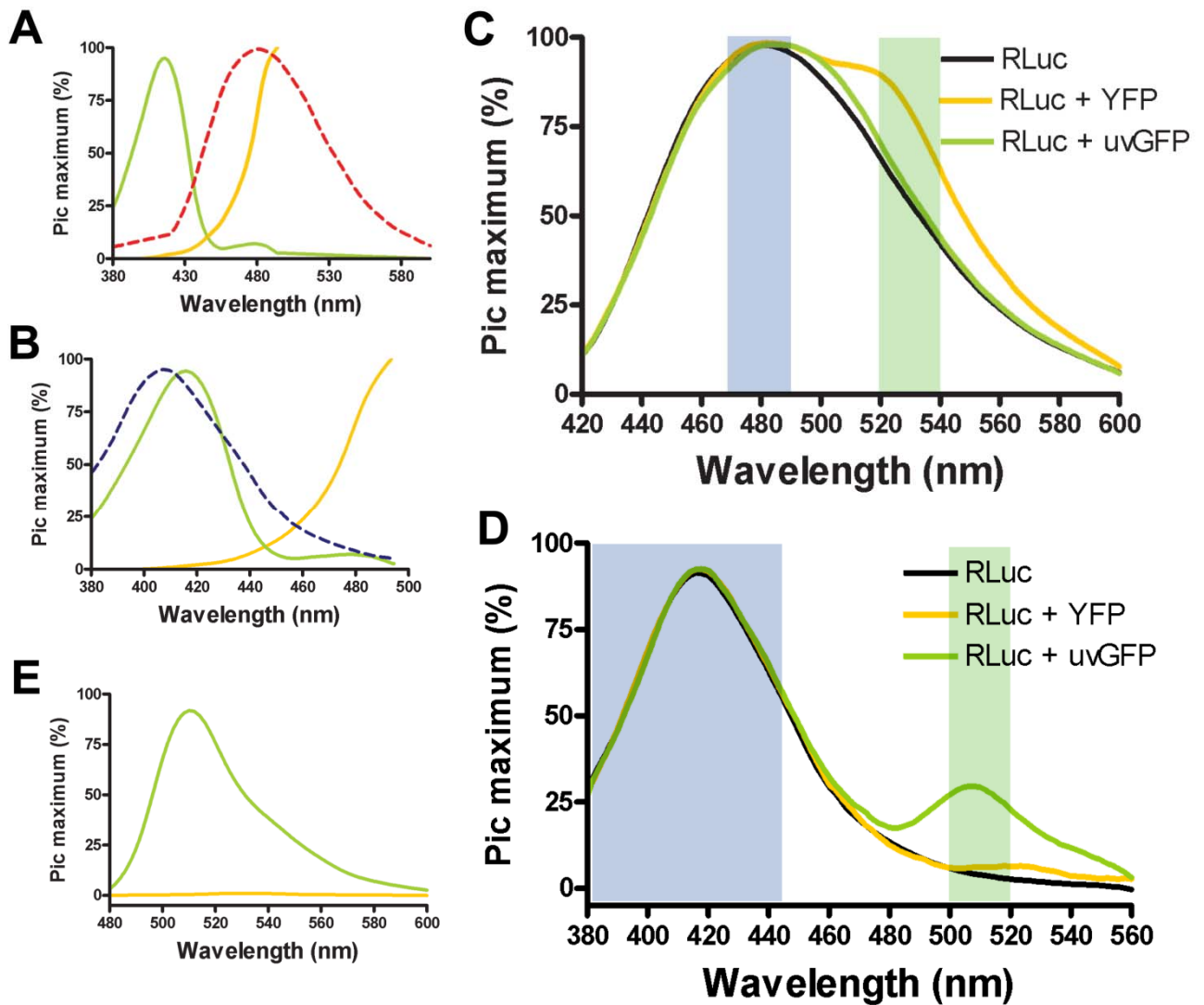
To assess the specificity of the BRET-1 signals measured between GRK2 and its partners, BRET titration curves were performed in cells expressing increasing levels of GRK2-eYFP and constant levels of either α_{2A} AR-Rluc (a), α_{2A} AR + Rluc- $G\gamma_2$ + $G\beta_1$ + $G\alpha_{i1}$ (b), α_{2A} AR + CD8-Rluc (c). BRETs were measured 10 minutes following the addition of PBS (ctl) or 10 μ M norepinephrine (Nor). Agonist-promoted hyperbolic increase in BRET-1 was observed for α_{2A} AR-Rluc, Rluc- $G\gamma$ and β arrestin2-Rluc, but not for the negative control CD8-Rluc confirming the specificity of the signals.



Supplemental Figure 4: Combining BRET-FRET measurements performed in single wells.

When the kinetics of the interactions between the different partners is not needed, combining BRET-FRET experiments can be designed to measure BRET-1, BRET-2 and FRET from the same well. For this purpose, FRET is first measured by exciting the energy donor uvGFP using an excitation wavelength (400 nm) that does not directly excite YFP (see **Supplemental Fig. 5**). Because the excitation time is very short, less than 1 sec per well, no significant photobleaching occurs during this period (data not shown). BRET-2 can then be read following addition of coel-400a (1 μ M) with reading times of 1.5 sec per well and finally, coel-h is added and BRET-1 read 10 minutes, later to allow the extinction of the coel-400a emission signal. The reading sequence is described in panel a. An example of combining BRET-FRET measured in the same well is presented in panel b using the interaction between $\alpha_{2A}AR$ -GFP², G α_{i1} -91Rluc and GRK2-eYFP. Concentration-dependent increase in FRET between $\alpha_{2A}AR$ -GFP² and GRK2-eYFP, in BRET-2 between G α_{i1} -91Rluc and $\alpha_{2A}AR$ -GFP², as well as in BRET-1 between G α_{i1} -91Rluc and GRK2-eYFP, were detected following a single addition of norepinephrine 10 minutes before the FRET reading. To confirm that BRET-1 could be measured without contaminating signal

originating from the oxidation of Coel-400a, BRET-1 between $G\alpha_{i1}$ -91Rluc and GRK2-eYFP was monitored in a well that was pre-treated or not with coel-400a, 10 minutes before the addition of coel-h. No difference in the agonist-promoted increase in BRET-1 was detected (see BRET-1 readings in panel b) indicating that no signal-contamination occurred. The lack of contamination results from the rapid decay of luminescence produced by the Rluc-promoted oxidation of coel-400a (panel c). At 10 minutes, less than 2% of the original coel-400a signal remained compared to 50% of the coel-h signal (panel d). Therefore, it is important to read BRET-2 before BRET-1 because the decay of luminescence produced by the Rluc-promoted oxidation of coel-h would interfere with BRET-2 readings for extended times.



Supplemental Figure 5: Fluorescence and bioluminescence spectrum of GFP², eYFP and RLuc.

Detailed analysis of the emission spectrum of coel-h- and coel-400a induced luminescence and of the excitation and emission spectrum of venus-GFP and GFP10 were performed to determine the potential crossover fluorescence contaminations in the BRET-1, BRET-2 and FRET configurations. a, b). The excitation spectrum of GFP10 (Green) and venus-GFP (yellow) were measured in cells expressing *Gαs-67Rluc*, GFP10-*Gγ₂* and *Gβ₁*, or *Gαs-67Rluc*, venus-*Gγ₂* and *Gβ₁*, respectively. The emission spectra of RLucII upon addition of either coel-h (a) or coel-400a (b) were measured in these cells and are illustrated by the dotted lines red and blue, respectively. The values were expressed as % of the maximal

signal obtained in each condition. The emission spectrum observed following coel-h and coel-400a overlap best with the excitation of venus-GFP and GFP10 respectively. However, a small overlap between coel-h-induced emission and GFP10 excitation occurs between 420 and 443nm, whereas overlap between coel-400a-induced emission and venus-GFP occurs between 440 and 480 nm. c,d). Emission spectrum were measured in cells expressing $G\alpha s$ -67Rluc (black lines), $G\alpha s$ -67Rluc/venus- $G\gamma_2$ (yellow lines) and $G\alpha s$ -67Rluc/GFP10- $G\gamma_2$ (green lines) upon addition of coel-h (c) or coel-400a (d). The emission values were expressed as % of the maximal donor emission. The position of the emission filter sets (indicated by the shaded blue [donor] and green [acceptor] rectangles) used for BRET-1 (a) and BRET-2 (b) clearly shows that the contaminating excitation of GFP10 by the coel-h-induced luminescence is not detected in the BRET-1 configuration (compare the black and green lines within the rectangles). However, the contaminating excitation of venus-GFP by the coel-400a-induced luminescence led to a detectable contaminating emission of the venus-GFP in the BRET-2 configuration (compare the yellow and black lines within the green rectangle). To control for the potential contamination of venus-GFP upon excitation of the GFP10 in the FRET configuration, emission spectrum were measured in cells expressing GFP10- $G\gamma_2$ or venus- $G\gamma_2$ upon excitation at 400 nm. No emission of the venus-GFP could be detected indicating that no contaminating crossover should occur in FRET between these two fluorophores.

Supplemental Table 1 : Fluorescence characteristic for different GFP variants used in this study.

	GFP variants	Mutations	Ex. (nm)	Em. (nm)	(ϵ)^a	(ϕ)^b
uvGFP	^d GFP ²	F64L, Y100F, S108T, M141L, I219V, H231L	400	510	21 000	0.45
	^e GFP10	F64L, Y100F, S108T, M141L, S147P, S202F, I219V, H231L	400	519	ND ^c	ND ^c
YFP	^f eYFP	S65G, V68L, S72A, T203Y, H231L	513	528	83 400	0.61
	^g venus	F46L, F64L S65G, V68L, S72A, M153T, V163A, S175G, T203Y, H231L	515	528	92 200	0.57

^a extinction coefficient ($M^{-1} cm^{-1}$)

^b quantum fluorescent yield

^c not determined

^d Bertnard *et al* J. Recept. Signal Transduct. Res. 22:533-541.

^e Mercier *et al* J. Biol. Chem. 277:44925-44931

^f Pflieger *et al* Biochem. J. 385:625-637

^g Hamdan *et al* J Biomol. Screen. 10:463-475

Article 3 :

Interactions Between $G\alpha$ Subunits Regulate G Protein-Coupled Receptor's Signaling Properties,

Billy Breton, Mireille Hogue, Michel Bouvier and Christian Le Gouill

De plus en plus d'exemples de dimères de RCPG importants pour certaines fonctions biologiques sont présents dans la littérature, révélant l'importance de cette formation de complexes pour certains récepteurs. De l'autre côté, le dogme concernant la stœchiométrie d'interaction RCPG/ protéine G hétérotrimérique demeure à ce jour de un pour un. Dans le contexte de la formation de dimères de récepteurs, la stœchiométrie entre récepteurs et protéines G devient une question importante pour mieux comprendre la signalisation de ces dimères de RCPG. Afin de tester la présence de plusieurs protéines $G\alpha$ dans un même complexe de récepteurs, l'effet des différentes $G\alpha$ a été mesuré sur la mobilisation du calcium par le récepteur DOR, qui est connu pour coupler et activer différents types de $G\alpha$. La surexpression des différentes $G\alpha$, seules ou en combinaisons, indique que la présence de membre de la famille $G\alpha_q$ semble importante pour la signalisation calcique du récepteur DOR, par contre cette mobilisation de calcium est inhibée par la toxine PTX montrant également une importance de l'activation des sous-unités $G\alpha_i$ pour cette voie de signalisation. En parallèle, une matrice d'interactions protéiques des $G\alpha$ a démontré qu'il est possible de retrouver plusieurs sous-unités $G\alpha$ en complexes (ou en proximité à la membrane plasmique), La formation de ces complexes entre $G\alpha$ semble être possible grâce à une région, l'hélice α_4 , précise dans leur structure, car il est possible de transposer la sélectivité d'interaction d'une $G\alpha$ à une autre, simplement en interchangeant les hélices α_4 de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{i1}$. À partir de ces résultats sur la formation de complexes entre $G\alpha$ ainsi que l'activation multiple de $G\alpha$ pour la signalisation d'un RCPG, il est possible de proposer que la formation de complexes comprenant plusieurs $G\alpha$ est importante pour la signalisation de certains récepteurs ayant la propension à former des dimères.

Interactions Between G Protein α Subunits Regulate G Protein-Coupled Receptor Signalling

Running head:

Multi G α Subunit Complex Formation

Billy Breton, Mireille Hogue, Michel Bouvier[¶] and Christian Le Guill^{¶*}

Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

[¶] These authors are joint senior authors on this work.

*Corresponding author:

Christian Le Guill


Université de Montréal

IRIC

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Qc. Canada, H3C 3J7.

Tel: (514) 343-6111 post 0304

Email: 

Abstract:

Many GPCRs such as the delta-opioid receptor (DOR) are now known to be coupled to different sets of G-proteins, Gi/o, Gz and G14/15. However, little is known on how this differential coupling could control signalling efficacy. By co-transfection of different G α subunits, we were able to influence the proportion of different G protein coupling to DOR and modify profiles of calcium mobilization and cAMP production. As expected for a Gi/o-coupled receptor, DOR-dependent calcium mobilization is *pertussis* toxin (PTX) sensitive and this even with over-expression of G α_q or G α_{14} . In contrast, in presence of Gz and G15, the calcium response becomes PTX insensitive. Different combinations of two G α subunits confer distinct calcium signalling properties, revealing a functional cross-talk between the G α_q and G α_i subfamily members. These observations suggest a cross-talk between different G α within the same receptor's complex. This hypothesis of multi-G α subunit complex formation was tested using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) to monitor interactions between G α subunits. We showed selective complex formation between different G α subunits and, identified a domain ($\alpha 4$ helix) within their structure, responsible for the assembly selectivity. These results reveal the existence of G protein complexes that dictate the signalling properties of the receptor.

Introduction:

G protein coupled receptors (GPCRs) represent the largest family of integral membrane proteins and, are found in virtually every eukaryotic cell. These receptors are involved in a variety of physiological functions such as neurotransmission, cognition, vision, olfaction, immune response and patho-physiological conditions such as asthma, cancer, schizophrenia, drug addiction, chronic pain and obesity. They are thus valuable targets for the development of therapeutic drugs.

GPCRs evolved to specifically detect extremely diverse stimuli including biogenic amine, amino acids, ions, lipids, nucleotides, peptides, proteases, mechanical stresses and photons, while still maintaining similar characteristics such as for their membrane topology, propensity to homo and hetero-oligomerize, and couple to G proteins, GRKs and arrestins.

Upon activation, a GPCR undergoes a conformational change, which promotes modulation of signalling events leading to a specific cellular response. The canonical GPCR signalling partner is a heterotrimeric G protein that senses activation and exchanges its bound-GDP for a GTP, to form activated-G α and $\beta\gamma$ subunits that modulate various effectors [1]. G proteins are grouped based on classical signalling pathways engaged or repressed through their activated-G α subunit. Gs (Gas, G α t) stimulate production of cAMP through direct activation of an adenylyl cyclase (AC) [2]. The cAMP promotes activation of a Rap GEF

(EPAC) and PKA through direct interaction with these effectors. Gi (Gai1, Gai2, Gai3, GaoA, GaoB and Gaz) has the opposite effect on cAMP levels, by inhibiting specific ACs [2]. By preventing activation, *Pertussis* toxin (PTX) has been widely used to study signalling through this group of G proteins at the exception of Gz, which is resistant [3,4]. PTX was also indirectly used to study $\beta\gamma$ subunits-dependent signalling such as PLC β s, AC and KIR activation as this toxin prevent Gi activation and thus, limit the access of different effectors to activated $\beta\gamma$ [5,6]. Gq (Gaq, Ga11, Ga14 and Ga15) activates PLC β s to produce IP3 and DAG, which are second messengers for activation of PKCs and Ca²⁺ release from the ER stores [7]. G12/13 (Ga12 and Ga13) and also Gq/11 are known to activate Rho-GEFs such as LARG, P115, TRIO and P63RhoGEF and so, have a profound influence on processes linked to cytoskeleton plasticity such as chemotaxis or neuronal morphogenesis [8,9]. GTP- γ S assays and BRET based-assays based on either change in energy transfer between a tagged-G α and either a tagged-receptor or a tagged- $\beta\gamma$, have been used to directly study G protein activation, and show the multiple G α coupling to individual receptors [10,11]. Dominant negative form of G α , chimera between different G α and, scavengers of free $\beta\gamma$ subunits have been used to study specifically G protein dependent and independent signalling events signalling, revealing the pluridimensionality of GPCR signalling [12,13]. Understanding this pluridimensionality of GPCR signalling would be invaluable for the field of drug discovery; it is, however, not a trivial task when cross-talks between pathways and all the implications of the oligomeric and scaffolding nature of GPCRs are to be considered [14,15].

It is now accepted that GPCRs form functional homodimers, heterodimers, and higher-order oligomers [16,17]. The defined properties of a GPCR oligomer is linked to the nature of each receptor, for example by their different ligand binding sites, phosphorylation sites, targeting signals, preferential coupling to different G protein and presence of scaffolding proteins such as β -arrestines, EBP50 and AGS. Distinct desensitization properties and signalling patterns from oligomers are not necessarily the simple addition of signals from individual activation of the receptors as, cooperativity for signalling as well as for ligand binding have been demonstrated for different receptors [18]. As most of the GPCRs can couple members of more than one $G\alpha$ subfamily of G proteins, it is expected that multiple G proteins would be part of signalling complexes formed GPCRs.

The delta opioid receptor (DOR) has been shown to couple to different G proteins such as G_i , G_o , G_z , G_{14} and G_{15} , and modulate cAMP-, Ca^{2+} - and DAG -dependent signalling pathways [19,20]. This receptor was thus chosen to study the effect of each $G\alpha$ subunit on the receptor signalling and verify whether they would act cooperatively or independently to define its signalling profile. The influence of modifying G protein ratios, on DOR signalling, was monitored in real-time, after agonist stimulation, using biosensors for Ca^{2+} and cAMP levels. Different tools such as a mutant $G\alpha_q$, which doesn't interact with its effectors or regulators [21] and PTX were used to study cross-talk between G proteins within a homo-oligomeric DOR complex. Bioluminescence resonance energy transfer

(BRET) was also used to verify whether some combinations of G proteins were more likely to be present within the same complex. Finally, a region within the $G\alpha$ sub-units was then identified, and shown to influence the apparent selectivity for G protein complex heteromers formation.

Results:**Influence of G α subunits on adenylyl cyclase's activity**

DOR has been shown to interact with different G proteins [22,23,24]. To study G α subunit's influence on the DOR-regulated adenylyl cyclase activity, HEK-293 cells stably expressing the human DOR were co-transfected with plasmids encoding different G α subunits and a cAMP biosensor (GFP10-EPAC-RlucII). DPDPE-stimulation and, co-expression with members of the Gi family (G α i1, G α oA and G α z), promote an inhibition of forskolin-dependent increased production of cAMP, which should reflect an adenylyl cyclase inhibition (Figure 1). Under condition without the co-expression of G α , inhibition of forskolin induced cAMP production was prevented by DOR activation and PTX pre-treatment indicating the involvement of an endogenous PTX-sensitive G protein for DOR's signalling. The co-expression of G α i members (G α i1, G α o and G α z) increased the inhibition of a forskolin-induced cAMP production, indicating a better coupling to G α i. Moreover, excepted for G α 14, co-expression of G α q members (G α q and G α 15) inhibited DOR's cAMP signalling. DOR could thus probably couple to G α q and G α 15 and impair DOR's G α i-dependent activity.

Effect of G α q/DOR on Calcium-dependent signalling

From the results shown in Figure 1, it is expected that in conditions favouring Gαq-coupling over Gαi, DOR's response will adopt a Gq-coupled receptor signalling profile. Members of Gq subfamily are known to activate PLCβ, which ultimately leads to a rapid increase in cytoplasmic Ca²⁺ levels [25,26]. Studies using PTX and βγ-scavengers have also linked Gi activation to Ca²⁺ responses [12,13]. Because of its exceptional dynamic range and sensitivity, a luminescence-based Ca²⁺ biosensor (Obelin) was selected, over classical fluorescence-based sensors, to study variations in DOR's modulation Ca²⁺ levels in presence or absence of a PTX-pretreatment (Figure S1). As shown in Figure 2, overexpression of different Gα subunits selectively influenced the amplitude as well as the kinetic of DPDPE-induced Ca²⁺ responses (Figure 2). The Ca²⁺ response, in cells overexpressing Gαi was similar to the one observed in mock-transfected cells and both were completely blocked with PTX-pretreatment (Figure 2A). The situation was different with other members of the Gi family. With GαoA, while the onset was not significantly different than with mock-transfected cells, the integrated luminescence signal was increased by more than 2.5 fold (Figure 2B) and completely block by PTX. With Gαz, the unset (12.5 seconds vs mock: 5 seconds), amplitude peak and the persistence of the calcium signal were affected compared to the mock conditions. Moreover, the response became completely insensitive to PTX pre-treatment (Figure 2C). Surprisingly, while overexpressing Gq had a drastic effect on the cAMP's response, no inhibition, nor synergy with endogenous signalling machinery was observed for DOR's Ca²⁺ response; there was only a 1 second decrease for the signal unset compared to mock-transfected cells but the response

remained completely PTX-sensitive (Figure 2D). In contrast, over-expression of other members of the Gq family lead to an increased Ca^{2+} response as measured by luminescence (8.5 times for $\text{G}\alpha_{14}$; Figure 2E and 5.6 times for $\text{G}\alpha_{15}$; Figure 2F) while not influencing the onset of the response. Ca^{2+} response in cells overexpressing Gq is completely blocked by a PTX pre-treatment; cells expressing $\text{G}\alpha_{14}$ and $\text{G}\alpha_{15}$ are less sensitive to this toxin, with a 71.8% and a 23.8% reduction in luminescence, respectively. These results indicate a crosstalk between some members of the Gq and PTX-sensitive Gi families.

From results shown in Figure 1, over expression of $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ prevented a DOR-mediated inhibition of cAMP production and from Figure 2D, it accelerates the DOR-mediated cytoplasmic Ca^{2+} influx. By increasing the ratio $\text{G}\alpha_{\text{i1}}$ over $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ through co-overexpression, DOR-mediated inhibition of cAMP production is re-established. It is thus expected that co-over-expression of $\text{G}\alpha_{\text{i1}}$ with $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ should also restore a calcium profile similar to what is observed with mock cells. However, the calcium signal is increased by 3 time in these cells co-expressing $\text{G}\alpha_{\text{i1}}$ and $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ as compared to mock or cells individually over-expressing each $\text{G}\alpha$ subunits (Figure 2G). Interestingly, these $\text{G}\alpha$ co-expression showed a fast Ca^{2+} increased as it is observed with cell over-expressing only $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ (Figure 2G). This synergy is not only observed for $\text{G}\alpha_{\text{i1}}/\text{G}\alpha_{\text{q}}$ but is also observed for $\text{G}\alpha_{\text{z}}/\text{G}\alpha_{\text{q}}$ co-expression (Figure 2H). Similarly to what was observed for the $\text{G}\alpha_{\text{i1}}/\text{G}\alpha_{\text{q}}$ co-expression, the calcium mobilization kinetic of the $\text{G}\alpha_{\text{z}}/\text{G}\alpha_{\text{q}}$ co-expression give a bigger maximum signal, but also give a new onset pattern, intermediary between the curves obtained

following expression of $G\alpha_z$ and $G\alpha_q$ alone. PTX-sensitivity of Ca^{2+} signalling on cells co-expressing different combinations of $G\alpha$ was also assessed. As shown in figure 2G-H, PTX-pretreatment completely abolished the Ca^{2+} response for the $G\alpha_{i1}/G\alpha_q$ condition, whereas the calcium responses in cells co-expressing $G\alpha_z/G\alpha_q$ were resistant to PTX (Figure 2G and 2H); this resistance was thus conferred by $G\alpha_z$ as cells over-expressing only $G\alpha_q$ are also sensitive to PTX (Figure 2D). In order to measure if the synergic effect of $G\alpha_z/G\alpha_q$ co-expression is related to a $G\alpha_q$ activity (regulators or effectors interaction), cells co-expressing two $G\alpha_q$ mutant, $G\alpha_q$ R214A or $G\alpha_q$ Y26L, and $G\alpha_z$ were used to measure the effect of the loss of $G\alpha_q$ regulators RGS and effectors binding region, respectively, on the calcium mobilisation (Figure 2I). The co-expression of $G\alpha_q$ R214A, affecting the RGS binding, increased the maximum signal produced by the presence of $G\alpha_z$ and also prolonged the luminescence signal, showing the loss of RGS interaction unregulated the DOR-DPDPE calcium mobilisation. This clearly indicates the contribution of the Gq to the signal. However, the co-expression of $G\alpha_q$ Y61L, affecting the effectors interaction, led to a reduction of the $G\alpha_z/G\alpha_q$ synergy in calcium response, clearly indicating that the increase in calcium mobilisation in the $G\alpha_z/G\alpha_q$ wt is dependent on the ability of $G\alpha_q$ to interact with these effectors.

Activation of Gq by DOR

As physical interactions between DOR and $G\alpha_q$ were previously shown [22] and expression of $G\alpha_q$ affected both cAMP and Ca^{2+} levels, BRET was used to monitor $G\alpha_q$ -

DOR interaction in our cell system. Similar hyperbolic BRET titration curves were observed for both $G\alpha_q$ and $G\alpha_i1$, tagged with *Renilla* luciferaseII ($G\alpha_q$ -RlucII & $G\alpha_i1$ -RlucII) and, a GFP2-tagged DOR (DOR-GFP2) (Figure 3A and 3B). A hyperbolic curve reflects a specific interaction or at least specificity in formation of a complex [27] with tagged-proteins located in close proximity to each other. [28]. As shown in Figure 3A and 3B, activation with DPDPE influences the BRET signal between $G\alpha_i1$ -DOR but not between $G\alpha_q$ -DOR. These results indicated the presence of $G\alpha_q$ under the DOR at the basal stat, but only BRET signal with $G\alpha_i1$ seems to affect by DOR's activation.

BRET can also be used to monitor variations in distance and orientation that occur between heterotrimeric G protein subunits during receptor activation [11]. A robust agonist promoted BRET decrease between either $G\alpha_i1$ -RlucII (Figure 3D) or $G\alpha_z$ -RlucII (Figure 3E) and GP10-tagged $G\gamma_1$ (GFP10- $G\gamma_1$) was observed upon DOR activation with DPDPE. A small but significant BRET modulation was also observed between $G\alpha_q$ -RlucII and GFP10- $G\gamma_1$ following DPDPE treatment (Figure 3C); As expected, whereas the agonist-promoted decrease in BRET was PTX sensitive for $G\alpha_i1$ -RlucII/GFP10- $G\gamma_1$ pair, it was not for the $G\alpha_z$ -RlucII/GFP10- $G\gamma_1$ pair. Somewhat surprisingly, however, DPDPE-induce reduction in BRET between $G\alpha_q$ -RlucII and GFP10- $G\gamma_1$ was PTX sensitive. Taken with the observation that DPDPE induced a BRET increase between DOR-GFP10 and $G\alpha_i1$ -RlucII but not $G\alpha_q$ -RlucII, these data may indicate that the DOR maybe activating $G\alpha_q$ in a $G\alpha_i$ -dependent manner. In contrast to Gq, $G\alpha_{15}$ is directly activated by DOR in a PTX-

insensitive manner (Figure 2F and [20,23]) demonstrating a differential cross-talk under DOR, between different members of the Gq and Gi families.

G α subunits interaction

The signalling data described above clearly indicate a cross-talk between G α i and G α q subunits upon DOR activation while the BRET data indicate that the physical engagement of the Gq may require the presence of a functional Gi protein. This raises the possibility that both Gi and Gq α subunits may be present in the same DOR signalling complex. To directly test if G α subunits can be found in close proximity to one another, possibly within unique signalling complexes, a BRET titration curve between GFP10-G α i1 and RLucII-G α i1 was carried out. As illustrated in Figure 4A, GFP10-G α i1/RLucII-G α i1 gives a hyperbolic BRET curve whereas co-expression of GFP10-G α i1 and RLucII-G α 12 leads to linear increase in BRET indicative of random collision BRET [27]. These results suggest that distinct G α subunits can selectively assemble into complexes. To explore the selectivity of these interactions, a G protein interaction matrix between 64 pairs of different members of the Gi, Gs, Gq and G12 families, was performed. These 64 titration curves were best-fitted to either a one-site binding hyperbolic curve or a first-order straight line and the results are summarized in Figure 4B. This matrix illustrates that although all tested G α subunits could be found into homogeneous complexes, heterogeneous association could be observed only for some combinations. Interestingly, G α oA and G α q were found to be more promiscuous in their association being found in close proximity to all other G α

subunits. In contrast $G_{\alpha z}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$ and $G_{\alpha 14}$ were found to be more selective being found in close proximity with less G_{α} subunit. Interestingly, all functional interaction between $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha q}$ subfamily members measured in the DOR calcium signalling is consistent with the observation that these G proteins could be found in close proximity one to each others: $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha z}$ and $G_{\alpha q}$.

Defining selectivity: $G_{\alpha i1}$ / $G_{\alpha 12}$ chimeras

In an effort to determine the molecular determinant of the selectivity of association, alignments of $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$ and $G_{\alpha 12}$ amino acid sequence were performed using M-Coffee software, which considers the amino acids sequence as well as the tridimensional structures for its analysis [29] (Figure S2). Excluding the N-terminus, two regions are more distant between these 4 G_{α} subunit families. The first regions, including the αB - αC helix of was exclude because of the interaction with Goloco motif of RGS [30], RGS domain [31] or effectors [32]. The other region corresponds to the $\alpha 4$ helix, as defined by residues: in $G_{\alpha i1}$ (²⁹⁵TYEEAAAYIQCQFEDLNKRK³¹⁴), in $G_{\alpha q}$ (³⁰⁰RDAQAAREFILKMFVDLNP³¹⁹), in $G_{\alpha 12}$ (³²²HRLEDVQRYLVQCFDRKRRN³⁴¹) and in $G_{\alpha s}$ (³²⁰TPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLRISTAS³⁵²) and has already been identified as important for the G protein mediated signal transduction [33,34]. Given that no saturable BRET was observed between $G_{\alpha i1}$ and $G_{\alpha 12}$, we generated a chimera ($G_{\alpha i1}$ -8h12) between $G_{\alpha i1}$ and $G_{\alpha 12}$ that introduces a part of the $\alpha 4$ helix from $G_{\alpha 12}$ into $G_{\alpha i1}$ to test whether this region could confer the selectivity of association. The N-terminus region of

this $\alpha 4$ helix being the least conservation among all the G proteins, the first 8 residues of the $\alpha 4$ helix were swapped between *Gai* and *G α 12As* shown in Figure 5A, a significant and saturable BRET was observed between GFP10-*Gai1-8h12* and Rluc-*G α 12*. This *Gai1-8h12* chimera is still able to interaction with GPCR and conserve the agonist-promoted BRET modulation (Figure S3). An element of selectivity was thus identified as it could be transferred to a different *G α* subunit and creates new complexes that were before not possible.

Although the substitution of the first 8 amino acids of the $\alpha 4$ helix from *G12* into *Gai1* promoted the interaction of *Gai1-8h12* with *G α 12*, it did not prevent the association with the wild-type *Gai1* (Figure 5). This suggests that the substitution did not alter the folding of *Gai1* and that the determinant of *Gai1* self-assembly lies outside of the ³²²HRLEDVQR sequence.

The 8h12 substitution also did not perturb the interaction of *Gai1* with the scaffolding protein AGS3 which is known to interact with multiple *Gai* molecules through 4 GRP motifs [35,36]. Indeed, as shown in Figure 5B, heterologous expression of AGS3 promoted large increases in BRET between two molecules of *Gai1* as well as between *Gai1* and *Gai1-8h12*, indicating that AGS3 serves as a scaffolding protein for both the wild type and *Gai1-8h12* chimera. Interestingly, AGS3 did not affect the non-selective BRET signal observed between RlucII-*G α 12* and GFP10-*Gai1*, it inhibited the specific BRET between

RlucII-G α 12 and GFP10-G α i1-8h12 indicating that AGS3 titrates G α i1-8h12 preventing its interaction with G α 12. These data clearly indicate that the assemblies of distinct G α subunits in different complexes can be dynamically regulated.

Discussion:

A large number of different GPCRs are expressed in individual cells and tissues, for example, a platelet alone expresses close to 30 different GPCRs while the cardiac tissue is expressing over 150 [37]. Consequently, considerable efforts are currently focusing on trying to understand how all the signals coming from different receptors and their multiple signalling pathways, influence each others and integrate to promote an adequate cellular response. Some of these studies have shown that a GPCR could engage multiple pathways. Other studies have also shown that the oligomeric nature of GPCRs could have a profound impact on the signalling events that follow their activation by a specific ligand. To study the influence of receptor-effector complex composition, we chose to monitor two classical signalling pathways known to be regulated by DOR, which is known to couple to members of different G protein families such as G α _i, G α _z and some of the G α _q family such as G14 and 15 [22,23,24,38].

In our cellular model, expression of different G α subunits, alone or in combination with each others, was used to reveal and study the unique signalling properties of different G protein/DOR complexes. We showed that while Calcium signalling for this receptor is

mostly dependent on activation of members of the Gi family, the presence of members of the Gαq in the receptor/G protein complex influences DOR's signalling. BRET titration curves for different combinations of Gα were then used to reveal the existence of specificity for hetero-complexes formation (Figure 4B). In the case of Gas and Gai, no interaction was virtually measured (Figure 4B). This is in agreement with the notion that β2AR switch coupling from Gas to Gai, thus affecting its signalling [39]. In this case, both Gα subunits can interact with the same receptor, but not at the same time, and the interaction of Gai depends on the Gas activation. In the present study, Gαq and Gai1 can form complexes and synergised in the DOR calcium mobilization, where both Gα subunits could interact with the receptor, indicating a possible multi-Gα complex formation under the same receptor.

GPCRs typically modulate Calcium levels through a PLC-dependent pathway, through tyrosine kinases activation [40] or via Gβγ from Gai and Gα (q/11/14/15) engagement of the enzyme [25,26,41]. Calcium levels can also be regulated in a PLC/IP₃-independent manner, through direct Gβγ interaction with IP₃ receptors or Calcium channels [42]. All these events integrate and define the cell's Calcium response to one or multiple GPCRs ligands. In our cellular model, DOR's Calcium response to DPDPE is sensitive to both PTX and U73122, a specific inhibitor of PLC (data not shown) and thus, is exclusively mediated through the Gβγ-activation of PLC and coming from Gai, which limits the possibilities of distant crosstalk between different pathways and simplify the interpretation of our results.

It is expected that variations in the nature and ratio of different G protein subunits would influence DOR-effector complexes and thus its signalling. Based on this premise, we transiently expressed G α subunits and showed that changing levels of endogenously expressed G α or introducing new ones had a significant impact on DOR's Calcium response and sensitivity to PTX. Most of our observations could be best explained by interdependence and cooperativity within multi-G proteins complexes than just simply by cross-talk between the signalling pathways independently induced by G protein protomers. For example, while G α_q expression abolishes agonist-induced inhibition of cAMP production (Figure 1), DOR's Calcium response remains mostly intact and still completely PTX-sensitive (Figure 2B). However, a Gq (Y261L) with substitution in its effectors interaction domain is significantly reducing DOR's Calcium response, revealing Gq participation in an otherwise PTX-sensitive response (Figure 2I). A PTX-sensitive synergy for DOR's Calcium response was also observed between endogenous G proteins and co-expressed G α_{14} (Figure 2E) while its expression had no significant impact on DOR's cAMP response (Figure 1A). Synergy for DOR's Calcium response is also observed between Gq/Gz (Figure 2H vs 2C) and Gq/Gi (Figure 2G vs 2A). Coexpressing G α_z with G α_q -Y261L revealed the importance of Gq's interaction with PLC for this synergy. If G proteins were to act independently, we would have expected either: a) no effect on cAMP or Calcium response following an increase in Gq level, if DOR were not capable of Gq coupling, or b) that coupling to Gq would decrease DOR's cAMP response by displacing

proteins of the Gi family with a concomitant apparition of a PTX-resistant Calcium response. If this receptor was able to couple Gq without being able to use it, a decrease in both DOR's cAMP and Calcium responses would have been observed, but it was not the case, so the effect of Gαq on the DOR cAMP signalling seems independent of a Gαi displacement. These results suggest a possible interaction between Gαq and DOR receptor.

Using BRET to monitor early events in G protein activation [11,43], we confirmed that DOR can selectively engage both Gαi1 and Gαq (Figure 3A and 3B). Only the DOR/Gi complex and, not DOR/Gαq, showed a significant change in BRET upon agonist stimulation. However, DPDPE-dependent BRET modulation between Gα and Gγ1 was observed for Gαq, Gαi and Gαz. Gα/Gγ1 BRET modulation was PTX-sensitive for both Gαq and Gαi but not Gαz (Figure 3C-3E). These results are in line with the observations in figure 2B that expression of Gαq didn't lead to an induce PTX-resistance or an increase of DOR's Calcium response. These results suggest that Gq is maybe not directly activated by DOR and that the BRET modulation was measured between Gαq and the Gγ1 associated to a PTX-sensitive G protein, within the same complex. Gαq has been shown to constitutively interact with PLC even in a GDP-bound form [44]; in this context, Gq could be acting as a scaffolding protein within the receptor/effectors complex, and be important for DOR's response by bringing and keeping a PLCβ in the vicinity of an activated PTX-sensitive G protein. To further support this hypothesis, we observed that expressing Gαq-Y261L is affecting a response that is otherwise not affected by overexpressing a WT Gαq (figure 2).

This indicates that a PTX-sensitive G protein is driving signal transduction leading to DOR's Calcium response even if Gq were to be present in this complex. We don't know however, if the presence of Gαq is essential for Gαi-mediated DOR's Calcium response. But, a synergy was observed with Gαi1/Gαq co-expression while overexpressing only Gαi1 didn't lead to an increase in Calcium response. These results suggest a possible complex formation between different Gα in the GPCR signalization.

Cooperativity between G proteins for signal transduction has also been demonstrated for other receptors, through differential injections of neutralizing antibodies against specific Gα subunits. Using this approach, Gαq/11 and Gα12 were shown to act in synergy for the modulation of phospholipase C-β1 activity, in response to AT1aR activation [45]. In our study, BRET titration curves were used *to reveal specificity for hetero-complexes formation, as summarized in a matrix representation (Figure 4B), and a complex formation between Gαq and Gα12 was measured. Not all possible pairs could be tested because expression of some constructs couldn't reach the level necessary for this type of experiments. However, our BRET results still clearly indicate that there is selectivity for the presence of G proteins within the same complex and this even under the Gα-overexpression imposed by the titration curves. These results are compatible with our observations on the cross-talk between Gi and Gq family members. Moreover, our results indicate that selectivity exists and that BRET could be used to reveal and study elements influencing G protein complex formation and cooperatively for signal transduction.*

Oligomerization is a recurrent phenomenon in biology for controlling the distribution and function of diverse classes of proteins such as scaffolding proteins, enzymes, ligands and receptors. GPCRs are known to homo and hetero-oligomerize [46,47]. Through oligomerisation, GPCRs could be bringing their cognate G protein in close proximity and, it is thus possible that G proteins adapted to productively and selectively co-exist as oligomers within this complex. To identify a putative region within the $G\alpha$ that could be involved in oligomeric assembly or at least in the selectivity association presented in figure 4B, the sequences of different $G\alpha$ were aligned, based on structure and primary sequence (Figure S2). From this alignment, we identified a divergent region between the $G\alpha$, composed of 15-20 residues within an α -helical structure. A $G\alpha 1/G\alpha 12$ ($G\alpha 1-8h12$) chimera was then created for which the first 8 residues of the $\alpha 4$ helix of $G\alpha i$ were exchanged for the corresponding residues of $G\alpha 12$. As shown in Figure 4A and 5A, $G\alpha 1$ and $G\alpha 12$ did not produce a specific BRET signal, whereas the chimera $G\alpha 1-8h12$ did with $G\alpha 12$. AGS3, a protein known to specifically interact with $G\alpha i$, did promote a BRET increase for the interaction of $G\alpha i$ with itself as well as for the interaction between $G\alpha i$ and the chimera $G\alpha 1-8h12$ (Figure 4B), indicating that this region of the $\alpha 4$ helix is not part or do not influence the $G\alpha i$'s interacting domain for AGS3. In fact, the $G\alpha$ interacting interface for GPR motif of AGS and Goloco motif of RGS has been mapped at the junction of helix αB and αC , which is in the vicinity of the $G\beta\gamma$ interaction site [46]. In previous studies, it was predicted through evolutionary trace, and shown through mutational analysis using competing peptides, that a region overlapping the 8 residues used for the chimera and

thus part of $\alpha 4$ helix, can selectively influence signal transduction [33,34,48,49]. Based on $G\alpha$ crystal structure (Figure 5), our results with AGS3 (Figure 5B) and the selectivity profile (Figure 5A), it appears that the $\alpha 4$ helix represents an independent functional domain and could well be a $G\alpha$ - $G\alpha$ interface for selectivity and G protein crosstalk. This interface could be involved in $G\alpha$ complex formation through a direct or indirect interaction involving an accessory protein. However, in order to distinguish between those two possibilities, additional experiments would be needed.

Cooperativity and interaction have also been shown for the other GTPase. For example, direct oligomerization of Ras has been shown to be essential for Raf activation [52]. More recently, the Arf6, a small G-protein implicated in membrane ruffling, and the JIP4, a scaffold protein implicated in the regulation of mitogen-activated protein kinase, co-crystal was resolved to a complex of two Arf6 and two JIP4 protomers where, Arf6 is interacting on both sides of the coil-coil JIP4 interface (ARF6-(JIP4)₂-ARF6) [53]. Similar complexes were shown for members of the Rab and Arl1 family with Rab7:RILP [54], Rab11:FIP2/FIP3 [55,56], Rab6:GCC185 [57] and ARL1:Golgin245 [58] with an accessory protein bridging the GTPases. Moreover, for members of the GAD (G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization) family, such as GBP1 and septin, GTP-binding control their oligomerization through interaction between their G domains [59]. Oligomerization of large G proteins such as Dynamin is also important for their activity; one of the interfaces involves the participation of a helix-structured domain [60,61]. Complex formation seems to be universal for this class of proteins with either a direct

interaction such as with Ras/GAD or involving other partners such as observed with Rab/Arl1 GTPases.

In this study, DOR was used as a model to study and characterize the nature of the receptor-effectors' complex and cross-talk between G proteins, using classical signalling events such as cAMP and Calcium-dependent pathways. We showed that selectivity exists for G protein complex formation and that a region within a $\alpha 4$ helical structure of the $G\alpha$ subunit could be involved in this selectivity maybe through protein-protein interaction. Studying the structural basis for the selective G protein complex formation could potentially reveal the importance of an oligomerisation interface for signal transduction. On these bases, further experiments could be designed to better understand the implication of multi-G protein α in the early events in signal integration leading to GPCR-specific cellular responses.

Materials and Methods:

Molecular cloning and plasmids

pcDNA3.1-Zeo vectors encoding G protein subunits ($G\alpha$, $G\gamma$) were obtained from Missouri University of Science and Technology. Fusion proteins were also cloned in pcDNA3.1-Zeo (Invitrogen). GFP10- $G\gamma 1$ and all GFP10- $G\alpha$ subunit was generated by subcloned G protein will-type in GFP10- $G\gamma 2$ [11] by removing $G\gamma 2$ with Acc65I-XbaI. RlucII was derived from *Renillia* luciferase introducing two punctuated mutation (C124A and M185V) by side change PCR and GFP10, from GFP10- $G\alpha$, was replace by this RlucII with NheI-BamHI

site to create all RLucII-G α fusion protein. To generate, G α i1-91RLuc 8h-12 and G α i1-91RLuc 20h-12 chimeras PCR site mutagenesis was made with G α i1 specific primer containing the 8 or 20 amino acids from G α 12, respectively, on G α i1-91RLuc [43]. By PCR overlap, the RLucII was introduced in position 91 for G α z (G α z-91RLucII) or in position 122 for G α q (G α q-122RLucII) where the NAAIRS amino acids were used as linker between the G α subunits and RLucII in both sides. To produce G α q(i5) and G α q(i5)-122RLucII, PCR with specific G α q N-terminal primer and a chimera G α q C-terminal primer with the last five amino acids of G α i1. GFP10-EPAC-RLucII was used as cAMP biosensor and was described in Leduc et al [47]. The AGS3 wild-type (AGS3 wt) and AGS3 where all four GRP domain was mutated to lost G α i interaction (AGS3 Q/A) was generously given by Dr. Steve Lanier [48].

Cell culture and transfection

HEK293s cells stably transfected with delta opioide receptor fused to FLAG-DOR in its N-terminal (FLAG- DOR cells) [49] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine and 300 μ g/mL G418 (Wisent, Qc, Canada) and incubated at 37°C in 5% CO₂. Two days before the experiments, 2.5 μ g total DNA was transfected for 400 000 cell/ml in 6-well plates using polyethylenimine 25 kD linear (PEI; Polysciences) as transfecting agent [50] (3:1 PEI/DNA ratio). Ten to 500 ng of each of the

expression vectors was diluted in 150 mM NaCl and the total quantity of DNA was completed at 2.5 µg with Salmon Sperm DNA (Invitrogen).

Total fluorescence and bioluminescence measurements:

Total fluorescence and bioluminescence were evaluated for each well (96-well plate, 100 000 cells/well) using a FlexStation2 and Mithras LB 940, respectively. GFP10 fluorescence was excited at 400nm and read at 515nm, whereas YFP was excited at 485nm and read at 538nm. Fluorescence values were corrected by subtracting the autofluorescence of cells not expressing uvGFP or YFP. Bioluminescence was evaluated for each well after addition of 5 µM coelenterazine-400a (Biotium) or 1 µM coelenterazine-h (Nanolight technology).

BRET

Transfected cells were washed twice, detached and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). For BRET¹ and BRET² experiment, 100 000 cells per well were distributed in 96-well microplates (Optiplate, PerkinElmer). BRET¹ was read 10 minutes after exposing cells to 1 µM coelenterazine h or BRET² 2 minute after exposing cells to 5 µM of coelenterazine 400a using the Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies) equipped with acceptor (530±20 nm) and donor (480±20 nm) filters. BRET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter sets divided by the emission detected with the energy donor filter sets. BRET ratios were corrected by

subtracting the background ratio obtained from cells expressing only the energy donor. BRET titration curves were generated by maintaining the amount energy donor construct constant and transfecting increasing amounts of energy acceptor constructs. The obtained BRET was expressed as a function of the total fluorescence over the total bioluminescence detected for each transfection condition.

cAMP measurement

To follow cellular cAMP level, BRET² cAMP-EPAC biosensor was use. This biosensor was modified by changing YFP to GFP10 from the BRET¹ generation [51]. Basically, transfected cells were washed twice, detached and resuspended in PBS and 100 000 cells were distributed per well in 96-well microplates (Optiplate, PerkinElmer). The cells were treated 5 minutes with 30 uM forskoline (List Biological Laboratories Inc.). After that, the cells were treated 10 minutes with 100 nM DPDPE (Sigma) and finally 5µM coelenterazine 400a was added for 5 minutes. BRET ratio was measurement with Mithras LB 940 microplate reader.

Calcium measurement

Obelin biosensor was used as cellular calcium reporter [52]. Basically, cells transiently expressing Obelin plasmids was washed twice, detached and resuspended in Tyrode's buffer (137mM NaCl, 2.8mM KCl, 12mM NaHCO₃, 5.5mM glucose, 0.4mM NaH₂PO₄ and 10mM Hepes, pH7.4). The cells was treated 4 hours with 2 uM coelenterazine-h. In 96-

well microplates (Optiplate, PerkinElmer), 100 000 cells was added per well and 100 nM DPDPE was injected. Luminescence was measured each 500 milliseconds for 30 to 45 seconds using Mithras LB 940 microplate reader or Veritas (Turner BioSystems) without filter.

Statistical analysis:

Statistical significances of the differences between conditions were assessed by ANOVA followed by a post priory Dennett test with the Prism 4.0 software (GraphPad PrismTM).

Abbreviations:

AGS, Receptor-independent activators of G protein signaling; BRET, Bioluminescence resonance energie transfor; DAG, Diacylglycerol; DOR, delta opioid receptor; DPDPE, [D-Pen₂,D-Pen₅]-Enkephalin; ER, Endoplasmic reticulum; GAD, G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization; GFP, Green fluorescent protein; GPCR, G-proein coupled reactor; GRP, G protein regulator motif; IP₃, Inositol triphosphate; PLC, Phospholipase C; PTX, Pertussis toxin; Rluc, Renilla luciferase ; VIP, Vasoactive intestinal polypeptide

References:

1. Weiss ER, Kelleher DJ, Woon CW, Soparkar S, Osawa S, et al. (1988) Receptor activation of G proteins. *FASEB J* 2: 2841-2848.
2. Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 383-387.
3. Kaneko S, Kato K, Yamagishi S, Sugiyama H, Nomura Y (1987) GTP-binding proteins Gi and Go transplanted onto *Xenopus* oocyte by rat brain messenger RNA. *Brain Res* 427: 11-19.
4. Fields TA, Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321 (Pt 3): 561-571.
5. Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Smrcka A, Simon MI, et al. (1996) Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J Biol Chem* 271: 13430-13434.
6. Uezono Y, Kaibara M, Murasaki O, Taniyama K (2004) Involvement of G protein betagamma-subunits in diverse signaling induced by G(i/o)-coupled receptors: study using the *Xenopus* oocyte expression system. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C885-894.
7. Peavy RD, Hubbard KB, Lau A, Fields RB, Xu K, et al. (2005) Differential effects of Gq alpha, G14 alpha, and G15 alpha on vascular smooth muscle cell survival and gene expression profiles. *Mol Pharmacol* 67: 2102-2114.
8. Kuner R, Swiercz JM, Zywiets A, Tappe A, Offermanns S (2002) Characterization of the expression of PDZ-RhoGEF, LARG and G(alpha)12/G(alpha)13 proteins in the murine nervous system. *Eur J Neurosci* 16: 2333-2341.
9. Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, et al. (2007) Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 282: 29201-29210.
10. Cerione RA, Ross EM (1991) Reconstitution of receptors and G proteins in phospholipid vesicles. *Methods Enzymol* 195: 329-342.

11. Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, et al. (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2: 177-184.
12. Barren B, Artemyev NO (2007) Mechanisms of dominant negative G-protein alpha subunits. *J Neurosci Res* 85: 3505-3514.
13. Zeng W, Xu X, Muallem S (1996) Gbetagamma transduces $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and Galphaq a sustained response during stimulation of pancreatic acinar cells with $[Ca^{2+}]_i$ -mobilizing agonists. *J Biol Chem* 271: 18520-18526.
14. Kenakin T (2005) New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4: 919-927.
15. Leach K, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 28: 382-389.
16. Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 409-435.
17. Milligan G (2006) G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov Today* 11: 541-549.
18. Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, et al. (2007) Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 116: 343-354.
19. Cvejic S, Devi LA (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272: 26959-26964.
20. Connor M, Christie MD (1999) Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 493-499.
21. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* 310: 1686-1690.

22. Law SF, Reisine T (1997) Changes in the association of G protein subunits with the cloned mouse delta opioid receptor on agonist stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 1476-1486.
23. Lee JW, Joshi S, Chan JS, Wong YH (1998) Differential coupling of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors to G alpha16-mediated stimulation of phospholipase C. *J Neurochem* 70: 2203-2211.
24. Lo RK, Wong YH (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 activation by the delta-opioid receptor via Galpha14 involves multiple intermediates. *Mol Pharmacol* 65: 1427-1439.
25. Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807.
26. Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 350: 516-518.
27. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, 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.
28. Dacres H, Wang J, Dumancic MM, Trowell SC Experimental determination of the Forster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs. *Anal Chem* 82: 432-435.
29. Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel CV, et al. (2007) The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Res* 35: W645-648.
30. Cherfils J, Chabre M (2003) Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions. *Trends Biochem Sci* 28: 13-17.

31. Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997) Structure of RGS4 bound to AlF₄--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89: 251-261.
32. Slep KC, Kercher MA, He W, Cowan CW, Wensel TG, et al. (2001) Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 Å. *Nature* 409: 1071-1077.
33. Berlot CH, Bourne HR (1992) Identification of effector-activating residues of Gs alpha. *Cell* 68: 911-922.
34. Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE (1996) Evolutionarily conserved Galphabeta gamma binding surfaces support a model of the G protein-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7507-7511.
35. Natochin M, Lester B, Peterson YK, Bernard ML, Lanier SM, et al. (2000) AGS3 inhibits GDP dissociation from galpha subunits of the Gi family and rhodopsin-dependent activation of transducin. *J Biol Chem* 275: 40981-40985.
36. Peterson YK, Bernard ML, Ma H, Hazard S, 3rd, Graber SG, et al. (2000) Stabilization of the GDP-bound conformation of Gialpha by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3. *J Biol Chem* 275: 33193-33196.
37. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR (2008) Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 135: 561-571.
38. Suzuki T, Funada M, Narita M, Misawa M, Nagase H (1991) Pertussis toxin abolishes mu- and delta-opioid agonist-induced place preference. *Eur J Pharmacol* 205: 85-88.
39. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91.
40. Laglia G, Zeiger MA, Leiprecht A, Caturegli P, Levine MA, et al. (1996) Increased cyclic adenosine 3',5'-monophosphate inhibits G protein-coupled activation of phospholipase C in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* 137: 3170-3176.

41. Wu D, Katz A, Simon MI (1993) Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5297-5301.
42. Zeng W, Mak DO, Li Q, Shin DM, Foskett JK, et al. (2003) A new mode of Ca²⁺ signaling by G protein-coupled receptors: gating of IP₃ receptor Ca²⁺ release channels by Gbetagamma. *Curr Biol* 13: 872-876.
43. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, et al. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13: 778-786.
44. Dowal L, Provitera P, Scarlata S (2006) Stable association between G alpha(q) and phospholipase C beta 1 in living cells. *J Biol Chem* 281: 23999-24014.
45. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* 273: 19772-19777.
46. Kimple RJ, Willard FS, Siderovski DP (2002) The GoLoco motif: heralding a new tango between G protein signaling and cell division. *Mol Interv* 2: 88-100.
47. Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, et al. (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther*.
48. Peterson YK, Hazard S, 3rd, Graber SG, Lanier SM (2002) Identification of structural features in the G-protein regulatory motif required for regulation of heterotrimeric G-proteins. *J Biol Chem* 277: 6767-6770.
49. Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, et al. (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J* 21: 1628-1637.
50. Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, et al. (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.

51. Barak LS, Salahpour A, Zhang X, Masri B, Sotnikova TD, et al. (2008) Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Mol Pharmacol* 74: 585-594.
52. Campbell AK, Dormer RL (1975) Studies on free calcium inside pigeon erythrocyte 'ghosts' by using the calcium-activated luminescent protein, obelin. *Biochem Soc Trans* 3: 709-711.

Figure 1 : Effect of G- α subunit on cAMP pathway

Stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was co-transfected with GFP10-EPAC-RlucII biosensor and different G- α subunits alone. Cyclase activity represented the ability of DPEPE (100 nM) to reverse the effect of Forskolin (30 μ M) on cAMP production. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences between cells expressing or not G α subunit (*P < 0.01,)

Figure 2: Effect of G- α subunit on calcium pathway

Stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was co-transfected with Obelin biosensor and different G- α subunits alone (A, B, C, D, E and F) or in combination of two G- α subunits (G and H). The cells in A, B and C expressed Gai/o subfamily member; Gai1, GaoA and Gaz respectively. The cells in D, E and F expressed Gaq/11 subfamily member; Gaq, Ga14 and Ga15 respectively. The cells in G co-expressed Gaq and Gai1. The cells in H and I co-expressed Gaz and Gq wt (H) or with different Gaq mutants (I): Gaq R214A (mutation in RGS binding domain) and Gaq Y261L (mutation in PLC- β binding domain). The black arrow represent the DPDPE (100 nM) injection time (green) or DPDPE (100 nM) with PTX (100 ng/ml) add 16h before experiment (red). The grey dash line represents the condition without any G α co-transfecton. Luminescence was taking each 500

milliseconds for 30 seconds after injection. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates.

Figure 3: Gαq Activation by DOR

Stably HEK293t was co-transfected with a constant amount of Gαq-122RlucII (A) or with Gαi1-91RlucII (B) in presence of increase amount of DOR-GFP2. Two minutes before BRET measurement, cells were treated with 100 nM DPDPE. Next, stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was co-transfected with GFP10-Gγ1 and Gαq-122RlucII (C), or Gαi1-91RlucII (D), or Gαz1-91RlucII (E). The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences between cells over-expressing Gα subunit or not (**P < 0.01,)

Figure 4: BRET titration curve between G-α subunit

Stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was co-transfected with a constant amount RlucII-Gα and an increase concentration of GFP10-Gα. Example of positive interaction between Gi1 and Gi1 (green curve) or negative interaction between Gi1 and G12 (red curve) (A). Table of each Gα subunit interaction combination, where green box represent positive interaction (B). The data shown represent 3 independent experiments. The curves were fitted using nonlinear regression or linear regression with GraphPad Prism™.

Figure 5: BRET titration curve between Gi1 8h12 and G12

In A, stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was co-transfected with a constant amount RlucII-G α 12 and an increase concentration of GFP10-G α i1 (green curve) or GFP10-G α i1 8h12 (red curve). The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in quadruplicate. The curves were fitted using nonlinear regression or linear regression with GraphPad PrismTM. In B and C, HEK293t co-transfected with a constant amount RlucII-G α i1 and GFP10-G α i1 or GFP10-G α i1 8h12 (B) or RlucII-G α 12 GFP10-G α i1 or GFP10-G α i1 8h12 (C) in presence or not of AGS3 wt. The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences between cells over-expressing AGS3 or not (**P < 0.01,)

Supporting information

Figure S1: Calcium Assay: Fluorescence vs Luminescence

Stably over-expressing FLAG-DOR HEK293s was transfected with Obelin biosensor alone (A, B) or with G α q(i5) subunits (C, D). For the fluorescence assay (A, C) 50 μ l of 2X FLIPR calcium 4 dye (Molecular Devices) was added on cell in clear-bottom black 96-well plate (Costar) containing 50 μ l tyrode's solution. The plate was incubated two hours at room temperature. The plate was placed in FLEXStation microplate reader set in FLEX mode to read fluorescence each 1.4 seconds for 120 seconds after injection of Carbachol (A) or of DPDPE (C) with an excitation at 485 nm and emission at 538 nm. For

luminescence assay, attach cells were wash two time with PBS 1X and leave in tyrode's solution with 2 μ M coelenterazine h for 2 hours. Then, luminescence was taking each 500 milliseconds for 120 seconds after injection of Carbachol (B) or of DPDPE (D). The data shown represent the mean \pm SEM of one experiment conducted in sixplicata.

Figure S2: M-COFFEE sequence alignment

Amino acids sequence of human $G\alpha i1$, $G\alpha q$ $G\alpha s$ long and $G\alpha 12$ was used to produce alignment sequence with M-Coffee, red color indicate good sequence homology and blue color indicate less sequence homology. The light blue box represents one of the two highly variable regions. The PDB of $G\alpha t/i1$ chimera with $G\beta\gamma t$ was introduce where the $G\alpha$ subunit was put in green, $G\beta$ in pink and $G\gamma$ in yellow. The amino acids corresponding to the light blu box in M-Coffee alignment was putted in orange.

Figure S3: Activity control of $G\alpha i1$ 8h12 chimera

Stably HEK293t was co-transfected with a constant amount $G\alpha i1$ -91RLuc (A), $G\alpha i1$ 8h12-91RLuc (B) or $G\alpha i120h12$ -91RLuc (C) in presence of increase amount of $\alpha 2A$ -adrenergic receptor-Venus. Two minutes before BRET measurement, cells were treated with 10 μ M Noradrenalin (red curve) or PBS (blue curve). The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments conducted in triplicates. The curves were fitted using nonlinear regression with GraphPad PrismTM.

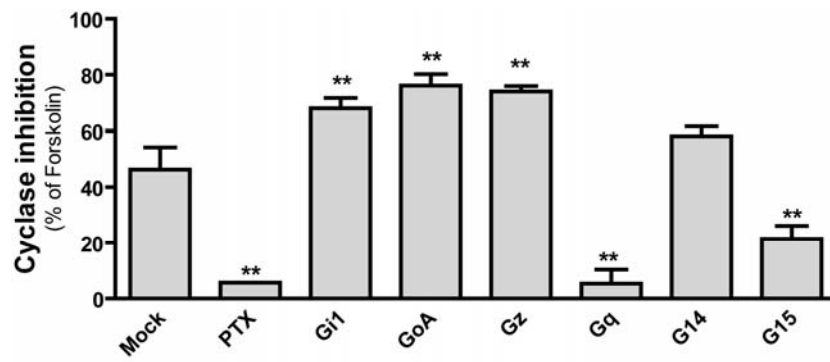
Figure 1

Figure 2

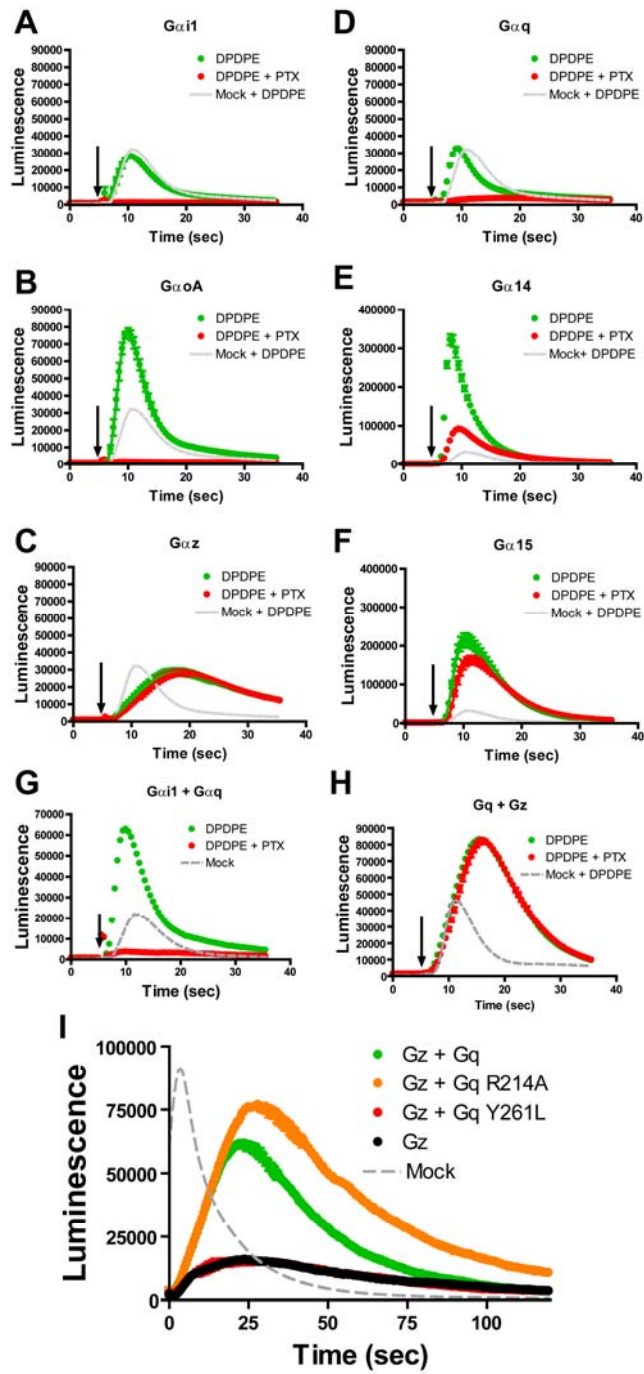


Figure 3

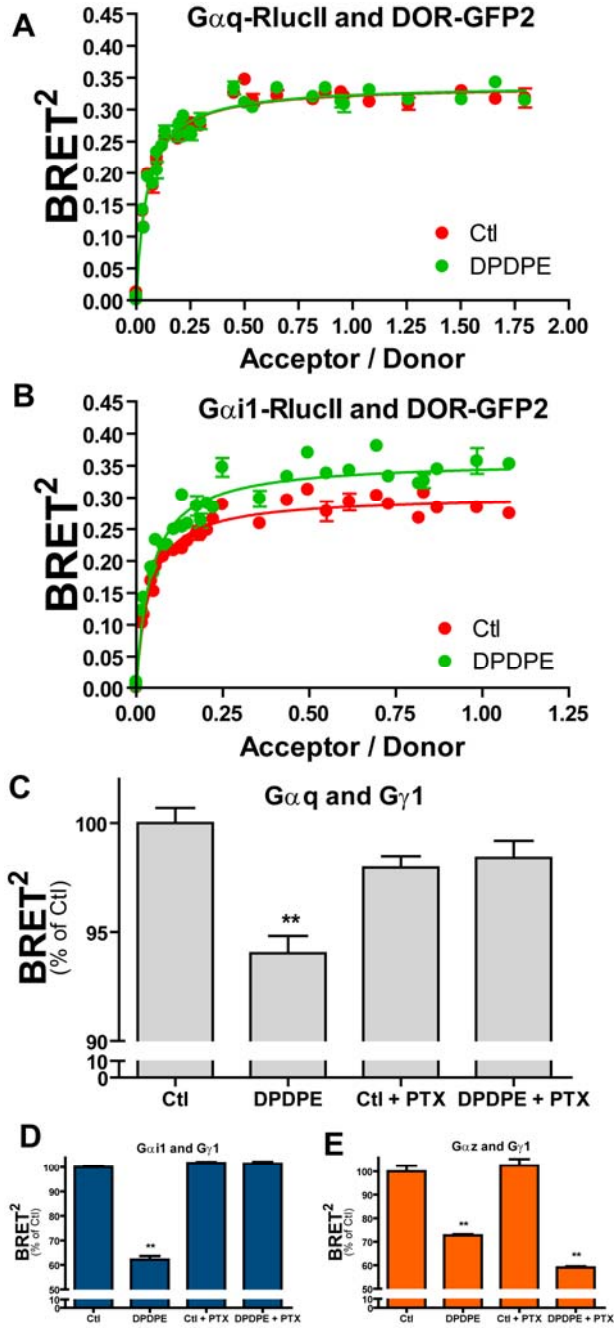


Figure 4

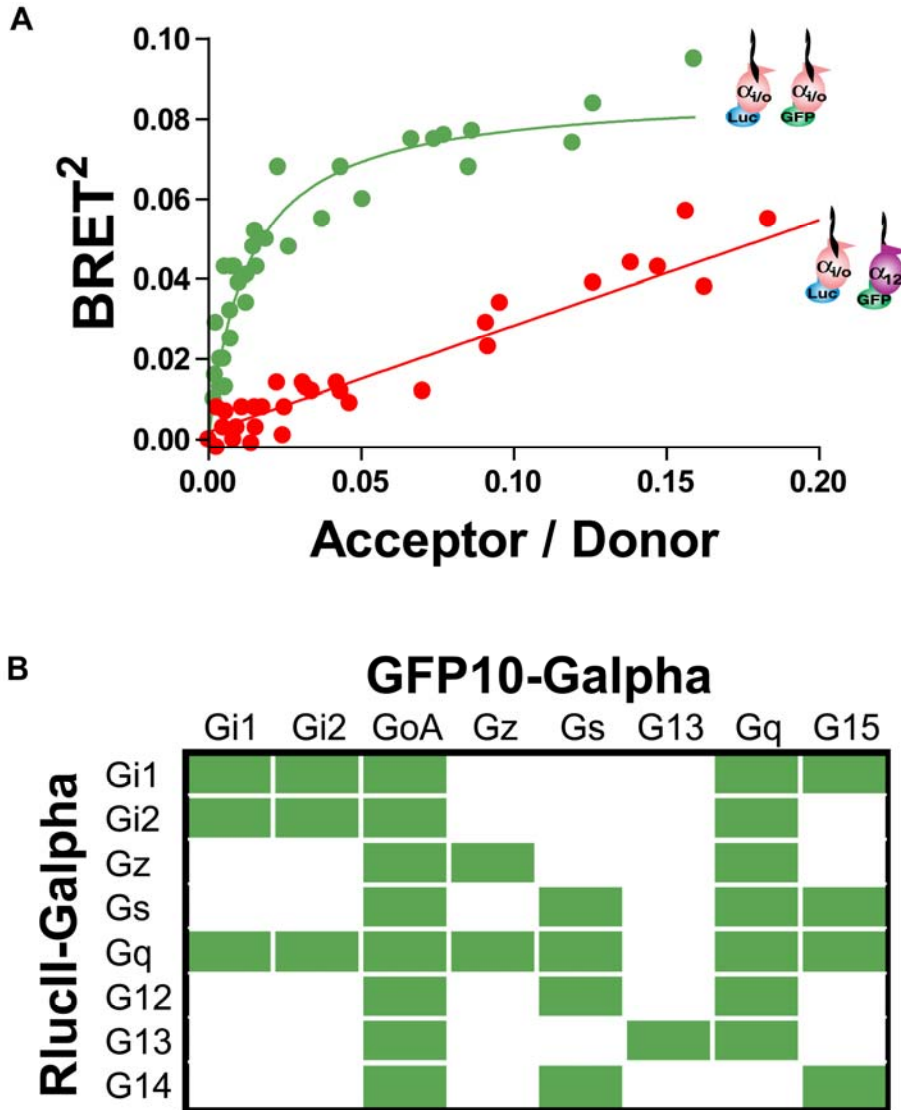
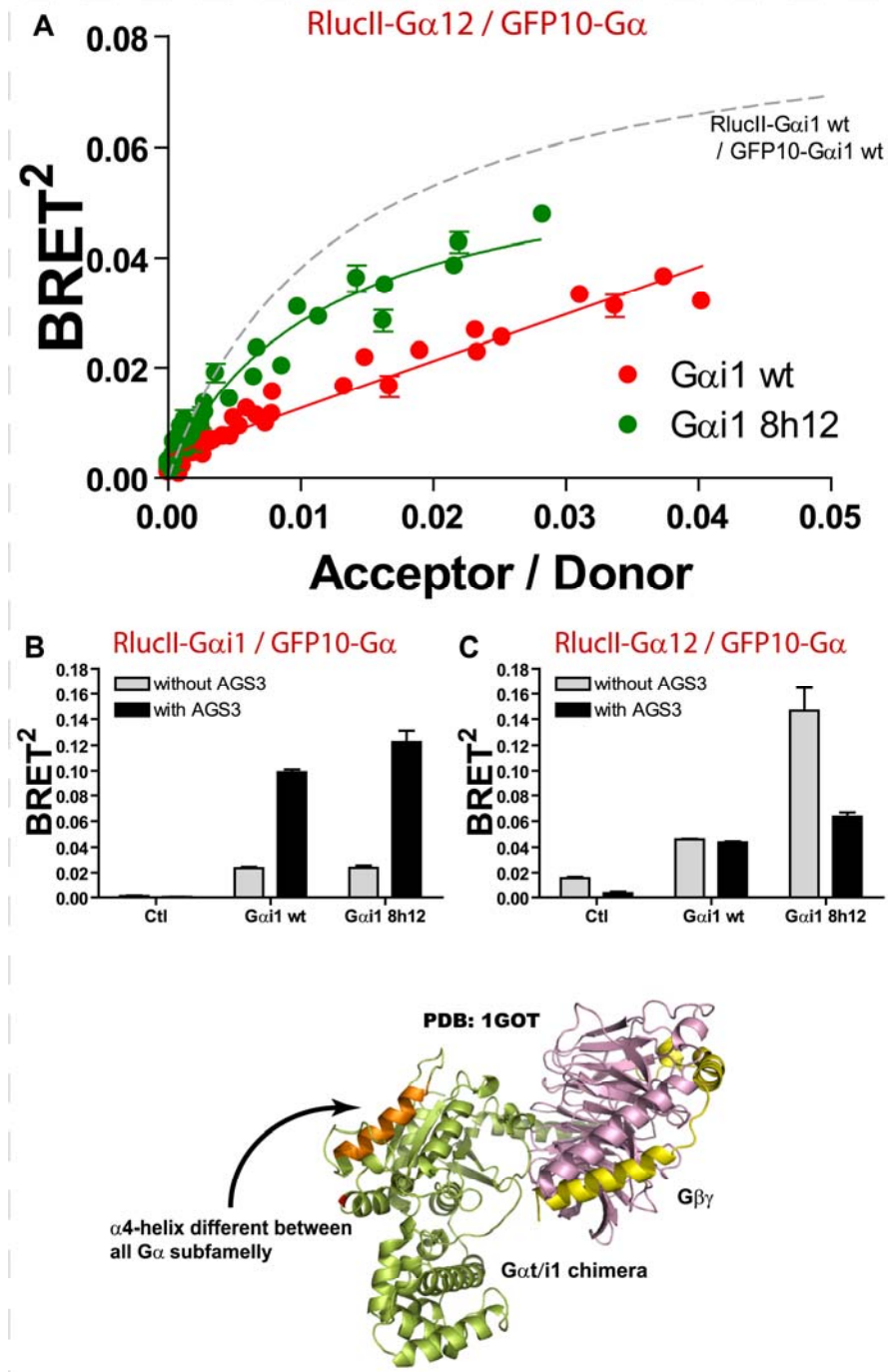


Figure 5



Résultats supplémentaires

Figure supplémentaire 1

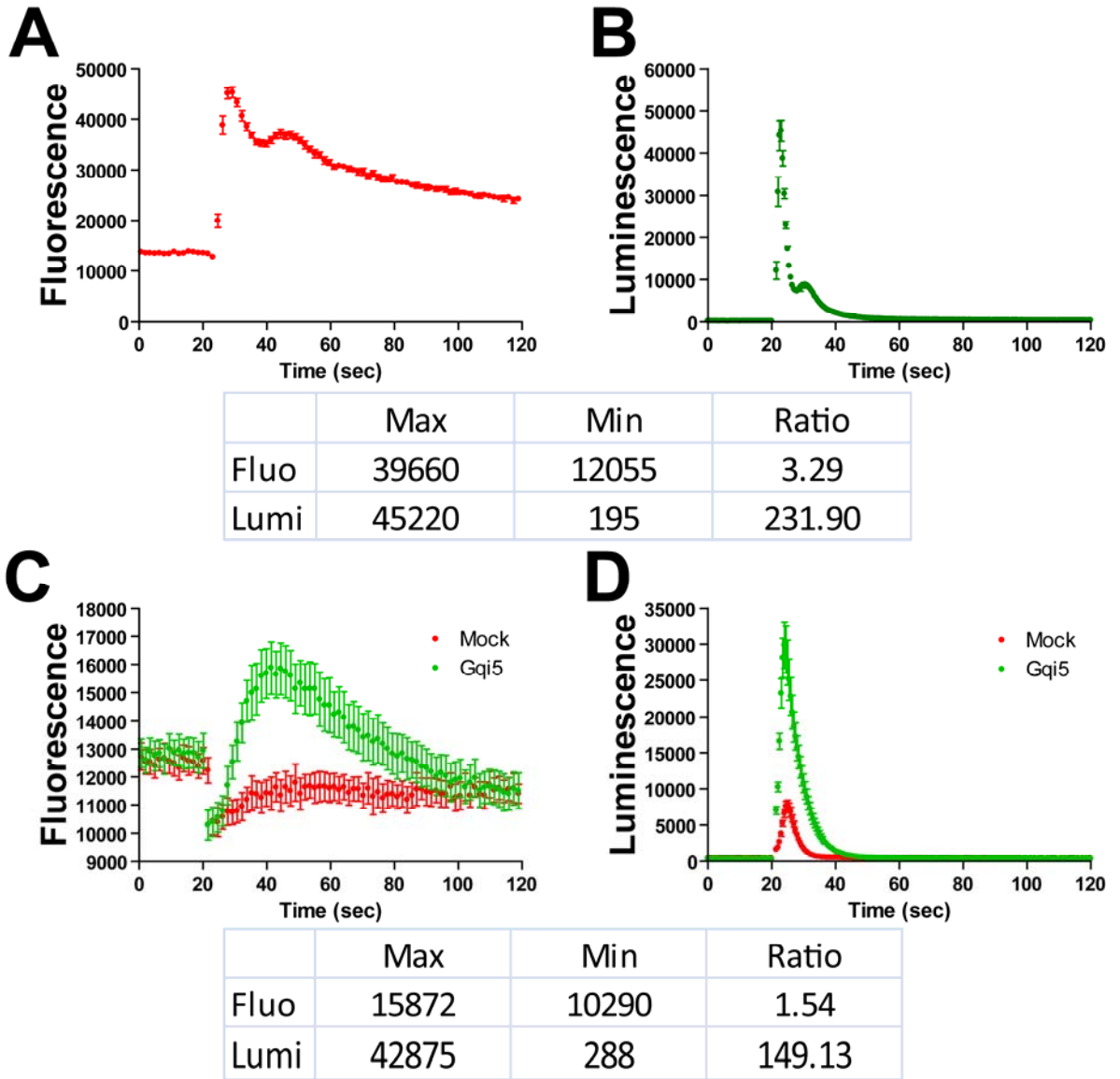


Figure supplémentaire 2

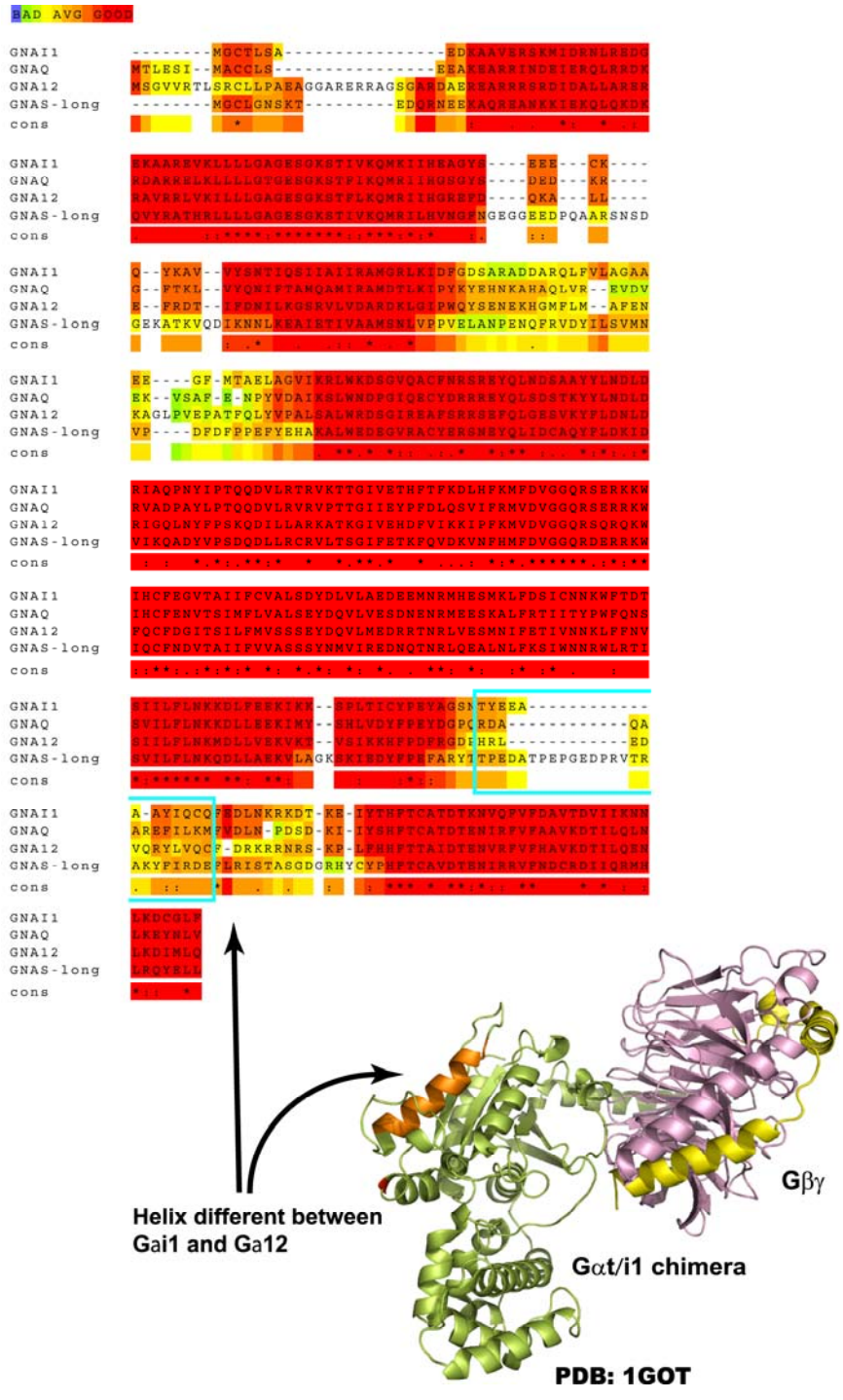
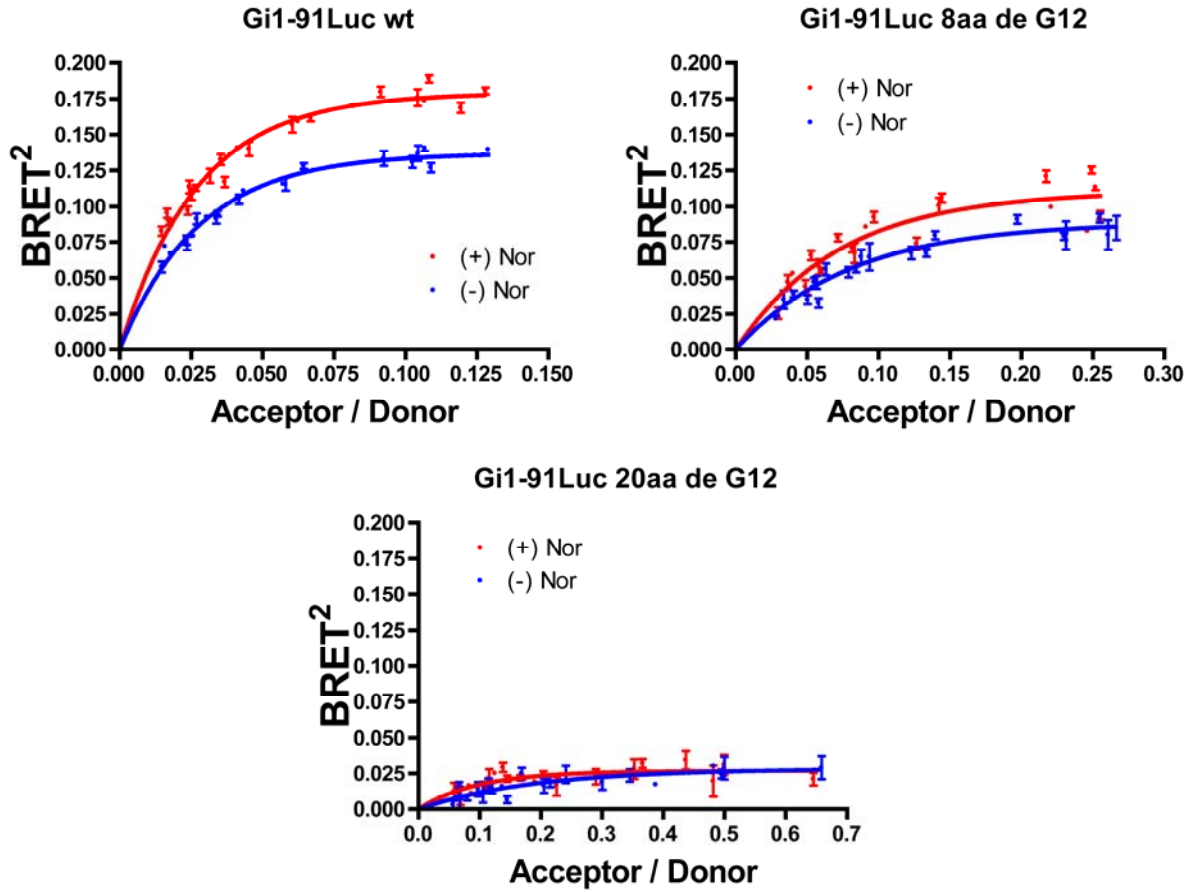


Figure supplémentaire 3



Discussion

Retour sur les techniques de mesure d'interactions protéiques

Depuis de nombreuses années, les techniques utilisées afin d'étudier la nature des molécules composées d'acides aminés ainsi que leur capacité à former des structures plus complexes sous forme de protéines, ont fortement évolué. Toujours dans le but d'acquérir une meilleure compréhension des structures moléculaires régissant les interactions protéiques, et alimenté par l'évolution dans la conception d'anticorps, plusieurs méthodes ont permis d'identifier des interactions protéine-protéine dans des conditions *in vitro*, comme c'est le cas avec la technique de 'pulldown'. Cette technique permet de mesurer dans des conditions contrôlées, hors de la cellule, une interaction directe entre deux protéines (protéine leurre et protéine proie), où les protéines sont exprimées séparément dans des bactéries, avant d'être purifiées et mises en contact l'une avec l'autre. Grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé soit contre l'une des protéines directement (dite protéine leurre), soit contre une étiquette fusionnée génétiquement à la protéine leurre (GST, myc, Flag et autres), il est possible d'isoler sélectivement la protéine leurre pour ensuite mesurer la présence de la protéine proie par immunobuvardage, s'il y a eu interaction entre les deux protéines. L'avantage de cette technique est que dans le cas d'un résultat positif, il est possible de conclure que l'interaction entre les deux protéines étudiées est directe. Par contre, cette technique étant entièrement réalisée *in vitro*, l'interaction mesurée entre les deux protéines ne tient pas compte du contexte cellulaire, qui pourrait influencer la présence de ces interactions. En parallèle de cette technique, il est possible de faire des expériences similaires, mais en exprimant les protéines leurre et proie dans les mêmes cellules eucaryotes, et d'isoler ensuite sélectivement la protéine leurre avant de suivre par immunobuvardage la présence de la protéine proie. Dans ces conditions, le contexte cellulaire est respecté. Par contre, afin d'isoler la protéine leurre, une lyse

cellulaire est nécessaire et ceci peut également influencer de façon artificielle l'interaction mesurée entre les deux protéines. De plus, l'interaction mesurée peut être indirecte, car des facteurs cellulaires (protéines, ARN, ADN et autres) pouvant lier les deux protéines en même temps peuvent servir d'intermédiaires entre celles-ci, et ainsi permettent d'isoler la protéine proie en même temps que la protéine leurre bien que celles-ci n'interagissent pas directement l'une avec l'autre. La combinaison des résultats de ces deux techniques permet d'avoir une plus grande certitude sur la possibilité d'interactions entre les protéines étudiées. À partir des méthodes énumérées ci-dessus, il est possible de suivre la formation d'interactions protéiques avec des avantages et inconvénients différents dans chaque cas. Toutefois, ces méthodes ont toutes un même point en commun, la détection des interactions protéine-protéine est réalisée à l'extérieur du contexte cellulaire, soit en mesurant directement *in vitro* les interactions, ou en lysant les cellules pour avoir accès aux protéines, comme par exemple le yeast-two-hybrid, TAP-TAG-MS, far-western, etc.

Toujours dans le but de mesurer des interactions protéiques dans des conditions cellulaires, plusieurs groupes se sont tournés vers l'utilisation de la microscopie de fluorescence combinée à un co-marquage sélectif des protéines d'intérêts, soit avec des anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines, soit par la fusion génétique entre les protéines d'intérêts et des protéines fluorescentes de type GFP/DsRed. Dans le cas de l'utilisation d'anticorps spécifiques, les images de microscopie sont généralement obtenues suite à la fixation et au marquage des cellules avec les anticorps, alors que la microscopie est réalisée directement sur les cellules vivantes dans le cas de l'utilisation de protéines de fusion avec les protéines fluorescentes. Il est possible de superposer les images obtenues à partir des différentes couleurs mesurées et ainsi de suivre visuellement la co-localisation des protéines dans la cellule. Théoriquement avec cette méthode, il est possible de suivre la co-localisation de plusieurs protéines en même temps. En pratique, il est difficile de suivre plus de trois partenaires en parallèle pour des raisons techniques. De plus, dû à la résolution spectrale de la lumière, qui est de 400 nm pour le bleu et 600 nm pour le rouge, il est

impossible d'affirmer que deux protéines sont en interaction directe à partir de cette technique de microscopie de fluorescence. En comparant cette précision de l'ordre du 100 nm, avec la taille des protéines globulaire qui varie entre 1 et 10 nm de diamètre (Erickson, 2009), tout au plus, il est possible de conclure que les protéines se retrouvent dans un rayon de 400 à 600 nm de distance l'une de l'autre.

En utilisant le transfert d'énergie de fluorescence ou de bioluminescence (FRET, BRET) entre un donneur et un accepteur d'énergie, il est possible de d'augmenter la résolution par rapport à la microscopie de fluorescence classique, et de la porter à l'ordre de grandeur de celle des protéines elles-mêmes. Le FRET et le BRET permettent d'avoir une résolution de 100Å, qui correspond à 10 nm, ce qui est dans l'intervalle de grandeur des protéines globulaires. Par contre, il est toujours possible que la mesure du signal de FRET et de BRET entre deux protéines soit le reflet d'une interaction favorisée par la présence d'un troisième partenaire, tel est le cas du BRET entre les sous-unités $G\alpha$ et $G\gamma$ de la protéine G dans l'article 2 . Pour avoir une interaction entre $G\alpha$ et $G\gamma$, la présence de $G\beta$ est essentielle pour faire le pont entre ces deux sous-unités. Néanmoins, les techniques de FRET et de BRET sont des outils puissants permettant de suivre la formation de complexes, avec de petites distances entre les différents partenaires.

Les techniques de RET (FRET et BRET) ont comme désavantage que les signaux mesurés peuvent résulter de collisions aléatoires produites suite à une agglomération des protéines dans des micro-domaines cellulaires. Afin de palier à ce désavantage, l'utilisation de contrôles négatifs mimant la localisation des protéines d'intérêts devient extrêmement importante. De plus, la localisation des interactions en BRET est difficile à mesurer en microscopie. Toutefois, les techniques de BRET sont des méthodes de choix pour mesurer des interactions protéiques et tester l'influence de contributions extérieures à ces interactions dans des essais à haut débit.

Afin de pouvoir répondre à de nouvelles questions biologiques entourant la formation de complexes à plusieurs partenaires dans les actions physiologiques des récepteurs, une partie de cette thèse a été consacrée à l'élaboration de nouvelles versions du BRET, leurs multiplexage ainsi que l'utilisation combinatoire de technologies déjà excitantes.

Développements techniques et implications dans l'élaboration de nouvelles hypothèses de travail

L'avancement technologique est au cœur même des nouvelles découvertes en science, comme en fait foi l'évolution extraordinaire des connaissances dans le domaine de la génomique, qui est intimement lié à l'augmentation de la vitesse de séquençage de l'ADN ainsi qu'aux prouesses technologiques dans le domaine de l'informatique, qui permettent de déchiffrer actuellement le génome d'un organisme entier en quelques jours. L'amélioration ainsi que l'élaboration de nouvelles techniques de mesure est nécessaire, voire même essentielle, au développement des connaissances dans le domaine des interactions protéiques. Le BRET est un outil performant pour ces études d'interactions protéiques, mais jusqu'à récemment son utilisation est limitée à la mesure de l'interaction entre deux partenaires en même temps. Plusieurs questions biologiques demandent de pouvoir suivre plusieurs interacteurs en parallèle, afin d'étudier leurs influences sur la physiologie des cellules. Tout comme l'évolution de la génomique, l'amélioration du BRET a pu bénéficier du perfectionnement de connaissances connexes, dans l'enzymologie de la luciférase de *Renilla* ainsi que dans la biophysique des GFP.

Améliorations de la Rluc

A cause de la production de lumière générée par la Rluc en présence de coelenterazine-400a (Coel-400a), le BRET_{400-GFP} utilisant ce substrat était difficile à mesurer avec des lecteurs à microplaques conventionnels, limitant ainsi son utilisation. De son côté, le BRET_{480-YFP} qui utilise la coelenterazin-h (Coel-h) comme substrat, est en mesure de générer davantage de lumière, mais la résolution spectrale de l'émission du donneur et celle de l'accepteur est plus faible, rendant plus difficile la mesure d'interactions faibles ainsi que la détection de petites modulations d'interaction comparativement au BRET_{400-GFP}. Le groupe du Dr. Gambhir a généré une série de mutants de la Rluc afin d'améliorer la stabilité de cette enzyme en milieu réducteur (Loening *et al.*, 2006). À partir de cette série de mutations, deux résidus ont été identifiés comme étant importants pour la bioluminescence de cette enzyme. Le remplacement des résidus C124 et M185 par une alanine et une valine respectivement a permis d'augmenter de 3 fois la production de lumière par la Rluc avec la Coel-h et de 52 fois avec la Coel-400a, dans leurs conditions expérimentales (Loening *et al.*, 2006). Lorsque ces mutations C124A et M185V ont été réalisées dans la Rluc native utilisée au laboratoire (appelée RlucII), une augmentation de bioluminescence a été observée pour les deux substrats, de 3 à 10 fois pour la Coel-h et de 50 à 200 fois pour la Coel-400a (voir Figure 21). De plus, une demi-vie enzymatique plus longue a été observée pour les deux substrats, permettant de mesurer des cinétiques d'interaction en BRET plus longues avec la RlucII.

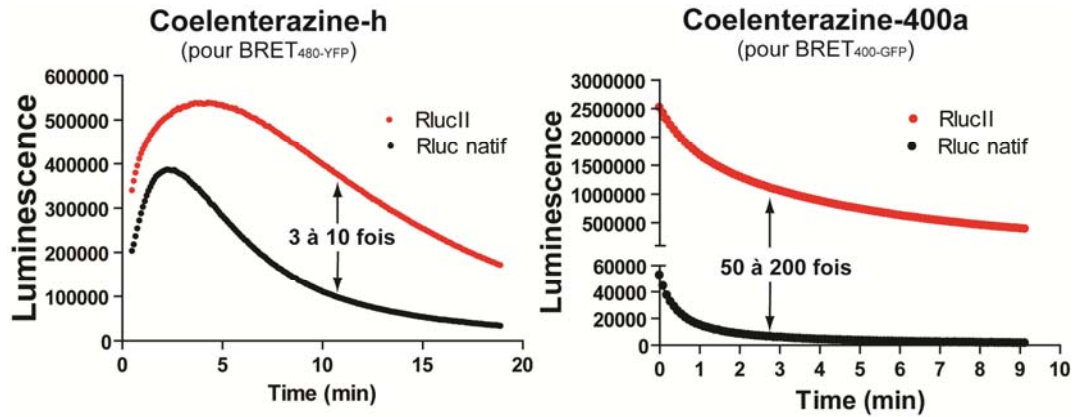


Figure 21: Comparaison entre Rluc native et Rluc II

Cellules HEK293t exprimant soit *Gas-RlucII* ou *Gas-Rluc natif* ont été mis en présence de 5 μ M des deux différentes coelenterazine (coelenterazine-h pour le BRET_{480-YFP} ou coelenterazine-400a pour le BRET_{400-GFP}) et le signal de bioluminescence a été mesuré tous les 10 secondes.

Lors d'essais utilisant la technologie BRET_{400-GFP}, des expressions plus importantes de protéines fusionnées à la Rluc native permettaient de palier en partie au manque de production de lumière. Un niveau élevé d'expression des partenaires BRET pourrait influencer les interactions observées, en forçant le rapprochement entre les partenaires ou en modifiant la biologie du système. De plus, pour des raisons de demi-vie de bioluminescence, un maximum de 8 conditions à la fois et des cinétiques d'interaction inférieures à une minute, pouvaient être lu en parallèle, ce qui limitait l'utilisation du BRET_{400-GFP}. Avec l'utilisation de la RlucII, il est maintenant possible de faire des lectures de plaques 96 puits entières, de mesurer des cinétiques d'interaction sur des temps plus long (entre 30 à 40 minutes), et il est également possible de diminuer l'expression des protéines de fusion, permettant d'utiliser des niveaux d'expression plus près des conditions physiologiques. L'amélioration des performances de bioluminescence de la RlucII permet d'avoir tous les avantages de la technologie BRET_{400-GFP} avec la facilité expérimentale du BRET_{480-YFP}. L'utilisation de la RlucII permet également de réaliser de nouvelles générations de BRET utilisant des protéines fluorescentes moins performantes que celles utilisées classiquement dans le BRET_{400-GFP} et permet également l'utilisation combinatoire de ces nouvelles générations dans un seul essai.

Nouvelles générations de BRET

Le BRET utilisant la Coel-h comme substrat peut être mesuré avec deux accepteurs différents; soit avec la EYFP (Xu *et al.*, 1999), soit avec la EGFP (Gorokhovatsky *et al.*, 2003) ou soit la mOrange (De *et al.*, 2009). Par contre, il est difficile de différencier sélectivement le signal de l'un par rapport à l'autre lorsque combinés ensemble, en raison des spectres d'émission des deux chromophores qui sont trop rapprochés pour être bien résolus. En observant les propriétés de fluorescence de plusieurs protéines (voir Tableau VI, page 57), on constate que différentes FP possèdent des excitations près de 400 nm, longueur d'onde d'émission de la Coel-400a, avec des émissions allant du bleu au jaune, ce qui a permis de générer trois nouvelles générations de BRET (voir Figure 22, page 214) utilisant soit la BFP (FP bleu), CFP (FP cyan) et mAmetrine (FP jaune).

Afin d'éviter toute confusion concernant les différentes générations de BRET, nous proposons une nouvelle nomenclature basée sur la longueur d'onde d'émission du substrat utilisé, ainsi que la couleur d'émission de l'accepteur, ce qui donne pour les générations qui utilisent la Coel-400a comme substrat; BRET_{400-BFP} (BFP et EBFP), BRET_{400-CFP} (ECFP, sCFP3A et CyPET), BRET_{400-GFP} (GFP² et GFP10, anciennement appelé BRET²) et BRET_{400-mAmetrine} (mAmetrine). Pour ce qui est des générations qui utilisent la Coel-h, la nomenclature devient la suivante; BRET_{480-GFP} (EGFP), BRET_{480-YFP} (EYFP, Venus, Citrine et YPET) et BRET_{480-orange} (mOrange et mTomato).

En plus d'augmenter le choix de fluorophores pouvant être utilisés avec la Coel-400a, ces nouvelles générations de BRET peuvent être combinées pour mesurer différentes interactions en même temps. Toutefois, l'efficacité du transfert d'énergie varie dépendamment du fluorophore utilisé, tel qu'illustré à la Figure 22 (page 214) par les différentes intensités des épaulements (pics caractéristiques d'émission des accepteurs) caractéristiques du BRET selon l'accepteur utilisé.

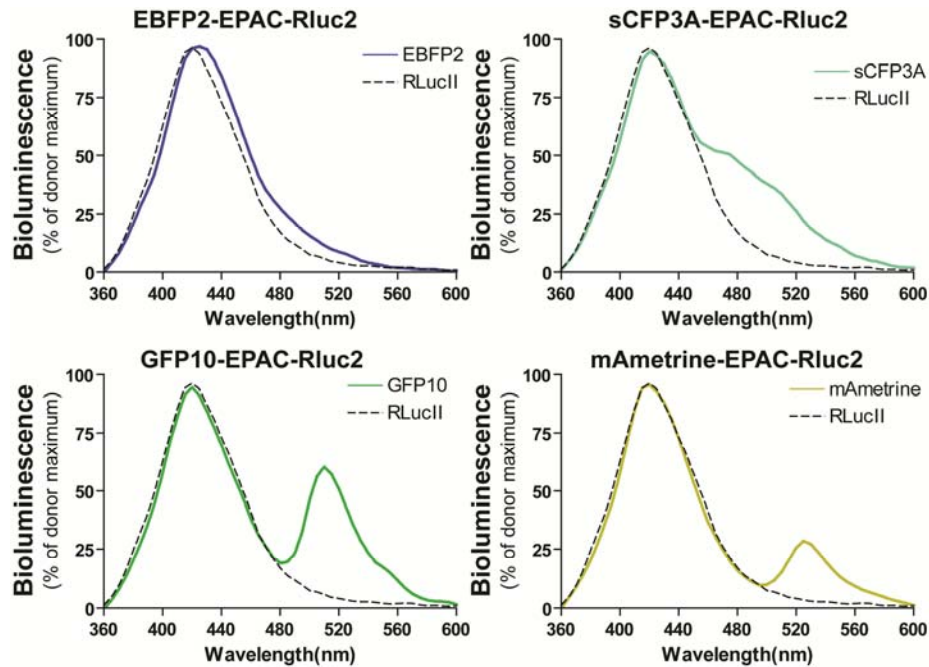


Figure 22: Spectres des différentes générations de BRET

Cellules HEK293t expriment chacun des protéines de fusion protéine fluorescente-EPAC-RlucII ont été mis en présence de 5 μ M de coelenterazine-400a puis le signal de bioluminescence a été mesuré entre 360 nm et 60 nm à tous les 5 nm.

En ce qui a trait à l'efficacité du transfert d'énergie, la GFP10, classiquement utilisée, est donc de loin le meilleur chromophore, suivi par la CFP, la mAmetrine et finalement la BFP. Par conséquent dans des conditions de mesure d'interaction entre deux partenaires protéiques, le couple RlucII/Coel-400a (comme donneur) et GFP10 (comme accepteur) devrait toujours être privilégié. Néanmoins, il est possible de mesurer un transfert d'énergie avec les trois autres FPs. Bien que la GFP10 soit le partenaire le plus approprié à utiliser pour mesurer des interactions à deux partenaires, il est difficile de combiner cette GFP10 avec d'autres FPs pour mesurer simultanément plusieurs interactions. En revanche, la BFP ainsi que la mAmetrine possèdent des spectres complémentaires et facilement séparables, permettant ainsi leur combinaison.

Multiplexage des BRET

La mesure simultanée de plusieurs événements cellulaires dans un seul essai représente un défi technologique important et intéressant à combler. Il existe présentement peu de techniques permettant la mesure de plusieurs interactions protéiques en même temps, c'est pourquoi certains groupes ont mis au point l'utilisation combinatoire de deux transferts d'énergie de FRET. Pour avoir un transfert d'énergie de FRET entre deux FPs, il faut premièrement avoir un recouvrement entre l'émission du donneur et l'excitation de l'accepteur d'énergie, qui doit être suffisante pour permettre un rayon de Förster (R_0) au minimum de 40Å, distance minimum entre les deux chromophores des protéines fluorescentes dû à leur diamètre. Deuxièmement, l'excitation de l'accepteur directement par les longueurs d'onde utilisées pour exciter le donneur doit être limité. Finalement, une séparation suffisante entre l'émission du donneur et de l'accepteur doit être présente afin de permettre un calcul ratiométrique de l'efficacité du FRET (Carlson et Campbell, 2009). Pour l'utilisation combinatoire du FRET, non seulement il faut respecter les trois principes de base énoncés ci-dessus, mais en plus l'excitation de chacune des paires de FRET doit préférentiellement avoir lieu à des longueurs d'onde différentes. Dans le cas où les deux donneurs sont simultanément excités, la mesure des émissions de chacun des accepteurs doit être réalisée à des longueurs d'onde pour lesquels l'autre accepteur de FRET n'émet pas de fluorescence (Carlson et Campbell, 2009). Avec toutes ces contraintes, seul un nombre restreint de FPs peuvent être utilisées pour des mesures simultanées de FRET. Le groupe du Dr. Schultz a utilisé des biocapteurs basés sur deux paires de FRET, CFP-YFP et mOrange-mCherry, pour mesurer l'entrée du calcium ainsi que la translocation du biocapteur annexin A4 (Piljic et Schultz, 2008). La séparation aux extrémités du spectre de la lumière visible de cette combinaison de FPs répond à tous les critères énumérés plus tôt. Toutefois, la YFP ainsi que la mCherry sont légèrement excitées de façon directe suite à l'excitation de leurs donneurs respectifs, ce qui demande des corrections mathématiques supplémentaires. Cette configuration de FRET est limitée à la mesure de deux biocapteurs unimoléculaires en même temps. Pour mesurer l'interaction de protéines dans un complexe,

une stratégie basée sur l'utilisation d'un donneur avec plusieurs accepteurs, ou alors plusieurs donneurs avec un accepteur, est préférable. En FRET, les partenaires possibles pour réaliser ce type d'expérience sont limités. De plus, la sensibilité du FRET est inférieure celle du BRET lorsque les expériences sont effectuées dans des microplaques (voire section biocapteur pour plus de détaille). C'est pour ces raisons que nous avons mis au point le multiplexage en BRET.

Comme il a été présenté dans l'article 1, il est possible de mesurer simultanément le changement conformationnel d'un complexe (V2R et G γ 2), en même temps que la production d'un second messenger (AMPC), en utilisant les FPs BFP et mAmetrine. Cette configuration fait appel à deux systèmes indépendants de mesure de BRET; V2/G γ 2 pour le changement de conformation et le biocapteur unimoléculaire EPAC pour la production d'AMPC. Il serait également possible de mesurer du BRET entre soit la BFP, soit la mAmetrine en fusion avec deux protéines différentes, et une troisième protéine fusionnée à la RlucII, pour ainsi suivre la formation de complexes et les cinétiques d'interaction de trois protéines indépendantes. La nouveauté ici est la possibilité de mesurer des interactions multiples et indépendantes, ce qui n'est pas le cas avec les autres techniques de reconstitution de signal; transfert d'énergie d'un donneur à une GFP reconstituée (BiFC-BRET/FRET), transfert d'énergie entre trois FP (3-FRET) et transfert séquentiel d'énergie BRET/FRET (SRET), où la détection d'un transfert d'énergie implique nécessairement une interaction simultanée entre tous les partenaires en même temps. En revanche, les techniques de reconstitution de signal permettent de confirmer la présence de plusieurs protéines dans un même complexe, ce qui n'est pas le cas pour le multiplexage BFP/mAmetrine. Selon les besoins, l'une ou l'autre des approches complémentaires peuvent être utilisées.

Le multiplexage de différentes générations de BRET a également été réalisé dans l'article 2 où cette fois c'est plutôt la GFP10 et la YFP qui ont été utilisées et excitées par deux substrats différents, la coelenterazine-400a et la coelenterazine-h respectivement. Le

principal avantage de cette configuration de multiplexage est que toutes les interactions peuvent être suivies en parallèle en mesurant le $BRET_{400-GFP}$ entre la Rluc et la GFP (GFP² ou GFP10), le $BRET_{480-YFP}$ entre la Rluc et la YFP (EYFP, Venus, Citrine et YPET), et finalement le FRET entre la GFP et la YFP (voir Figure 23, page 217). Par contre, il n'est pas possible, comme avec BFP/mAmetrine, de suivre les différentes interactions en même temps dans les mêmes cellules, car les différentes mesures se font séquentiellement; le FRET demande une excitation avec de la lumière à 400 nm, le $BRET_{400-GFP}$ a besoin de Coel-400a et finalement le $BRET_{480-YFP}$ utilise plutôt de la Coel-h comme substrat. Malgré ces différentes sources d'excitation, il est possible de mesurer séquentiellement ces trois RET sur le même échantillon de cellules en mesurant en premier le FRET, suivi du $BRET_{400-GFP}$ suite à l'addition de Coel-400a et finalement l'ajout de Coel-h permet la mesure du $BRET_{480-YFP}$, à condition que la luciférase utilisée soit la Rluc native et non pas la RlucII. En effet, pour permettre une mesure de luciférase/Coel-h sans contamination de signal provenant de l'excitation de la Rluc par la Coel-400a, l'émission de la luciférase/Coel-400a doit être négligeable et dans le cas la RlucII, la demie vie de réaction est trop longue (30 secondes pour la Rluc native et 120 secondes pour la RlucII) pour permettre une lecture séquentielle de Coel-400a suivi par la Coel-h.

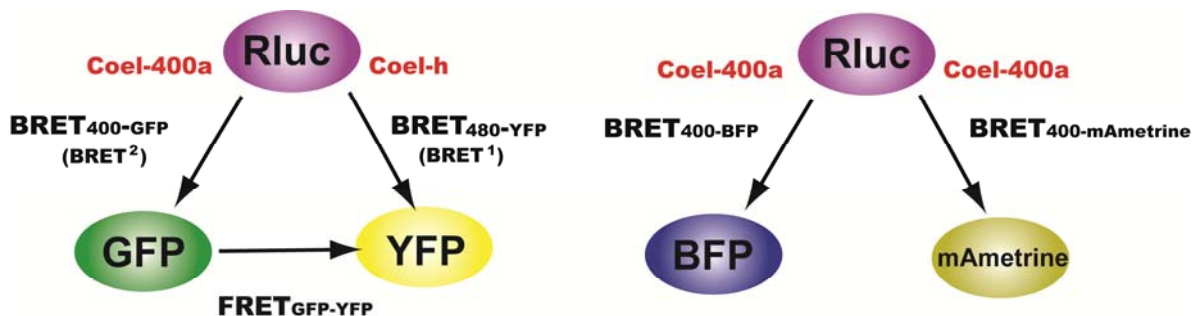


Figure 23: Différence entre les deux méthodes de BRET multiplexage

L'utilisation simultanée du BRET_{480-YFP} et du BRET_{400-GFP} a permis de suivre en parallèle le recrutement de la β -arrestine2 au récepteur V2 ainsi que le recrutement de β 2-adaptine à la β -arrestine2 (Hamdan *et al.*, 2007) (voir article 4, annexe page IV). Le fait de suivre toutes les interactions dans le même cadre cellulaire, même population cellulaire qui est lu soit avec la coel-h ou la coel-400a en parallèle, a permis de réellement comparer les cinétiques de chacune des interactions, par opposition au même type d'expériences réalisées individuellement dans des cellules différentes. Le fait que les différentes cinétiques sont mesurées dans des conditions identiques d'expression des protéines, le ratio de chacune de ces protéines est le même, car les cinétiques d'interaction entre deux partenaires sont fortement influencées par la concentration de ces partenaires.

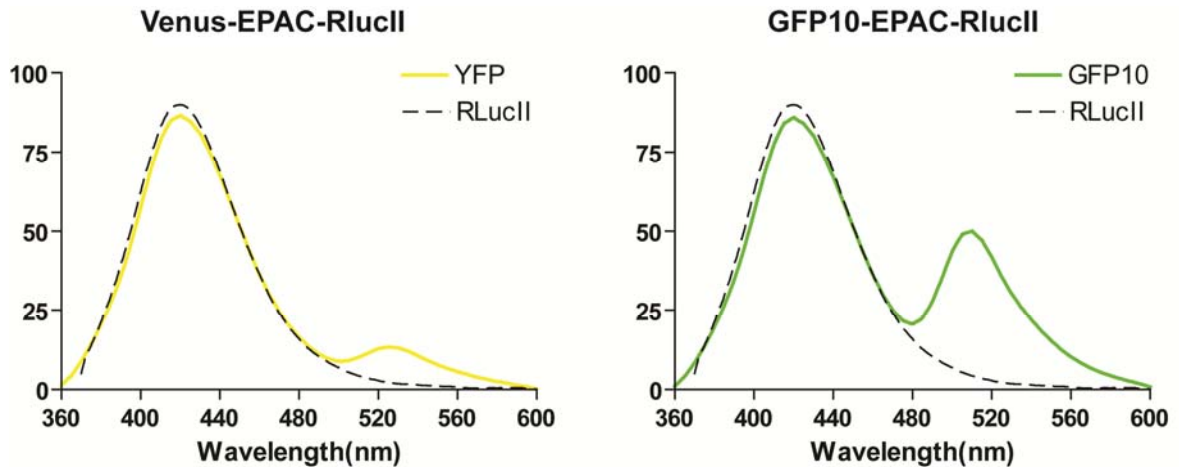


Figure 24: Spectre de bioluminescence de la YFP vs la GFP10 en présence de coelenterazine-400a

Cellules HEK293t expriment chacun des protéines de fusion protéine fluorescente-EPAC-RlucII ont été mis en présence de 5 μ M de coelenterazine-400a puis le signal de bioluminescence a été mesuré entre 360 nm et 60 nm à tous les 5 nm.

Le multiplexage de la GFP (GFP² ou GFP10) avec la YFP (EYFP, Venus, Citrine et YPET) a comme principal désavantage que les YFP sont légèrement excitées directement par la Coel-400a, tel qu'illustré dans le spectre du biocapteur Venus-EPAC-RlucII (voir Figure 24, page 218 et Figure 25, page 219). Par conséquent, le signal mesuré du transfert

d'énergie vers la GFP est contaminé par le transfert d'énergie de la YFP, lorsque co-exprimés dans les mêmes cellules. Néanmoins, il est possible de soustraire la contribution de la YFP dans le filtre de la GFP par une correction mathématique en utilisant le BRET_{480-YFP} avec la Coel-h, qui n'excite pas directement la GFP, comme valeur de référence (voir article 2). Suite au développement du BRET_{400-CFP}, afin d'éviter ce type de correction mathématique, il est possible de remplacer la GFP² par une CFP (ECFP, sCFP3A et CyPET), ce qui permet de suivre séparément le signal de transfert d'énergie de la Coel-400a vers la CFP sans être contaminé par le transfert d'énergie à la YFP, en utilisant des filtres qui excluent les longueurs d'ondes d'émission de la YFP (voir Figure 26, page 220).

En résumé, les deux méthodes de multiplexage développées dans cette thèse permettent de suivre dans les mêmes conditions cellulaires, différentes interactions protéine-protéine. Par contre, chacune de ces approches possèdent différents avantages et inconvénients, ce qui permet de sélectionner le type de multiplexage approprié selon les besoins.

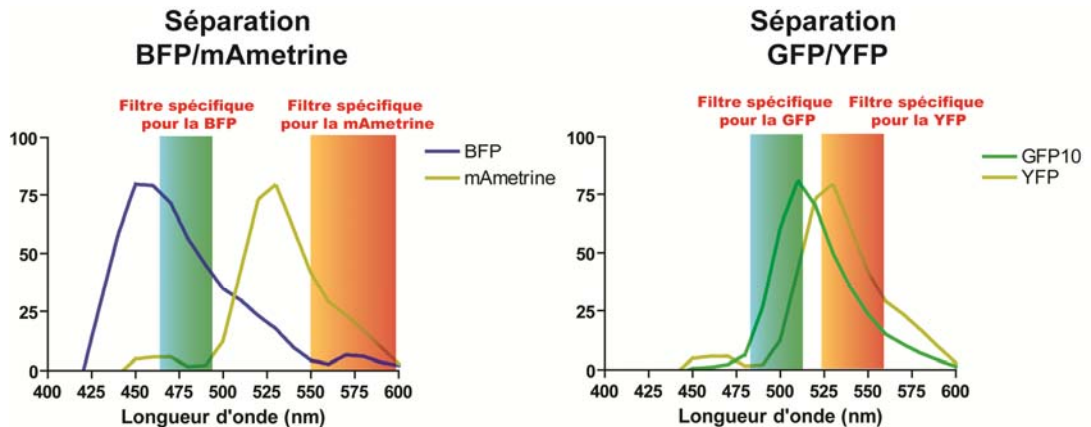


Figure 25: Séparation des émissions des protéines fluorescentes

Comparaison des spectres d'émissions de la BFP et mAmetrine ou entre GFP10 et YFP afin de démontrer que la séparation des signaux de fluorescence est plus facile pour le couple BFP/mAmetrine.

Mesure séquentiel BRET/FRET (SRET)

La combinaison de la GFP² et de la YFP permet théoriquement de mesurer un transfert d'énergie à trois partenaires avec un BRET entre Rluc/Coel-400a (donneur) et GFP² (accepteur), suivi d'un transfert d'énergie FRET entre la GFP² (donneur) et la YFP (accepteur), car l'émission de la GFP² permet d'exciter la YFP qui va à son tour émettre de la fluorescence. En 2008, un groupe a publié un article qui décrit ce type d'essai (Carriba *et al.*, 2008). Cependant, la méthodologie présentée dans cet article ne tient pas compte de la stimulation directe de la YFP par l'émission de Rluc-Coel-400a, ni de l'énergie émise par la GFP² dans le filtre de la YFP (voir Figure 25, page 219). Ainsi, en plus de mesurer le transfert séquentiel Rluc-GFP²-YFP (contribution mineure), les auteurs détectent également une contamination du signal provenant du transfert d'énergie entre Rluc-GFP² ainsi qu'entre Rluc-YFP (voir figure supplémentaire 5 de l'article 2)

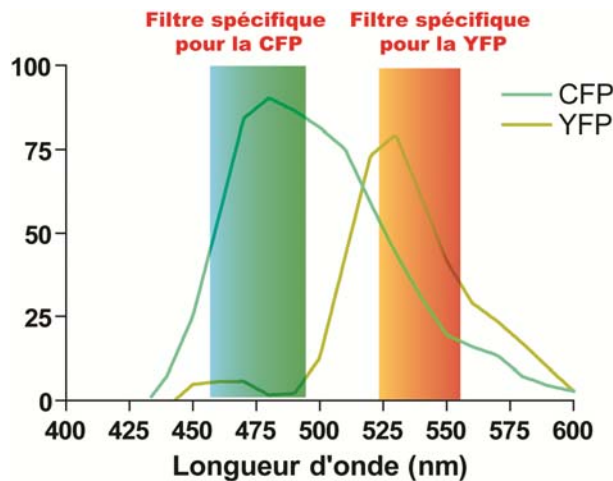


Figure 26: SRET entre RlucII-CFP-YFP

Comparaion des spectres d'émissions de la CFP et YFP afin de démontrer que la séparation des signaux de fluorescence est meilleur.

Présentement au laboratoire, nous travaillons à l'élaboration d'une méthode de SRET qui tient compte de tous les facteurs affectant le transfert d'énergie et qui permet d'appliquer les corrections mathématiques appropriées. L'utilisation du BRET_{400-CFP} avec la CFP, ainsi

que du BRET_{480-YFP} avec la YFP, sera privilégiée plutôt que l'utilisation du BRET_{400-GFP} et BRET_{480-YFP}, afin de minimiser les corrections mathématiques.

L'utilisation du BRET a permis de proposer de nouvelles hypothèses sur le mode de fonctionnement des RCPG au cours de cette thèse. En plus de mesurer pour la première fois l'interaction entre les sous-unités $G\alpha$ de la protéine G et GRK2, il a également été possible de suivre la formation de complexes entre GRK2 et la β -arrestine (résultats non présenté). Outre ces nouvelles découvertes, les développements technologiques basés sur le BRET ont permis de mesurer une interaction protéine-ARN en cellules vivantes. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Desgroseillers, la mesure d'interactions entre Staufen-1, une protéine impliquée dans le transport axonal des ARNm, et l'ARN a été réalisée pour la première fois (voir Article 5 page XVII). Staufen-1 fusionné à la Rluc et un colorant fluorescent d'ARN, le SYTO14 qui entre dans les cellules et se fixe aux ARN pour devenir fluorescent, ont été utilisés comme donneur et accepteur d'énergie respectivement, afin de suivre cette interaction protéine-ARN en cellules vivantes. En plus de mesurer l'interaction entre une protéine et l'ARN, cette étude a démontré qu'un dimère de Staufen-1 lie l'ARN. Ceci a été mesuré par la combinaison du BiLC (complémentation de la RLuc) avec le BRET-ARN (voir Article 5 page XVII). Ces expériences semblent indiquer que la formation de complexes Staufen-1/ARN implique la présence de plusieurs monomères de Staufen-1 en même temps.

L'innovation dans le domaine du BRET avec les différentes couleurs, le multiplexage des BRET, ainsi que le BRET avec de petites molécules, tel que le SYTO14, ont permis la détection de nouveaux complexes. Ces résultats démontrent ainsi l'importance du développement technologique afin de répondre adéquatement à de nombreuses questions biologiques et ouvrent la porte à de nouvelles interrogations sur les rôles précis de ces différents complexes dans la biologie des cellules.

Biocapteurs et leurs implications dans l'étude des RCPG

Par définition, un biocapteur, normalement composé d'une cible biologique et d'un rapporteur de cette activité, est un outil qui permet de suivre un phénomène biologique. Plusieurs types de biocapteurs sont présentement disponibles pour mesurer l'activité des RCPG, allant d'enzymes bioluminescentes sous contrôles de promoteurs spécifiques (gènes rapporteurs), aux petites molécules fluorescentes, ainsi qu'aux rapporteurs basés sur des changements de conformations protéiques (FRET ou BRET).

Nouvelle génération de biocapteurs BRET

Dans les dernières années, une série de nouveaux biocapteurs basés sur le FRET ont vu le jour, allant d'interactions biomoléculaires comme dans le cas du recrutement de grb2 au récepteur EGF (Sorkin *et al.*, 2000), au changement de conformation au sein d'une même molécule, comme dans le cas du biocapteur d'AMPc basé sur EPAC (DiPilato *et al.*, 2004). Par contre, dans le cas du BRET, peu de biocapteurs ont été décrits dans la littérature, et ce malgré sa plus grande sensibilité comparativement au FRET. Ceci est grandement dû au fait que le FRET, lorsque couplé à la microscopie, permet de suivre les interactions au sein d'une cellule, donnant ainsi une localisation dans l'espace en plus de suivre dans le temps l'évolution de ces interactions. Néanmoins, les images de FRET sont souvent imparfaites et difficiles à interpréter dû aux problèmes techniques inhérents à la méthode elle-même. Une amélioration des détecteurs utilisés en microscopie permet actuellement de mesurer du BRET sur une seule cellule, mais avec des temps d'exposition relativement long, de l'ordre de la minute (Coulon *et al.*, 2008). En couplant les nouvelles générations de détecteurs plus sensibles avec les nouvelles luciférases Rluc8 et RlucII plus brillantes, il sera éventuellement possible de diminuer le temps d'exposition, permettant ainsi de d'augmenter la versatilité de cette technique de mesure d'interaction protéique par

microscopie. Finalement, nous pourrions également envisager coupler ce BRET en microscopie avec les nouvelles générations de BRET présentées précédemment, afin de suivre visuellement plusieurs interactions en parallèle.

Un des avantages incontestables du BRET par rapport au FRET, est sa plus grande sensibilité de lecture lorsque mesuré en lecteur de microplaque. Pour un même biocapteur, la version BRET requiert des niveaux d'expression de donneurs et accepteurs d'énergies de 10 à 100 fois moins que ceux nécessaires pour obtenir des résultats reproductibles avec le FRET. Ceci est dû au problème d'auto-fluorescence des échantillons biologiques ainsi que des microplaques utilisées pour mesurer le transfert d'énergie (voir Figure 27, page 223). Par conséquent, pour avoir un signal de FRET détectable, l'expression des protéines fluorescentes doit être suffisante pour surpasser l'auto-fluorescence du système. Comme en BRET il n'y a pas d'auto-fluorescence (car pas d'utilisation de source de lumière) ni d'auto-luminescence des cellules, ni des microplaques, il n'est pas nécessaire de surexprimer les biocapteurs autant qu'en FRET, afin de détecter la lumière produite par la réaction enzymatique.

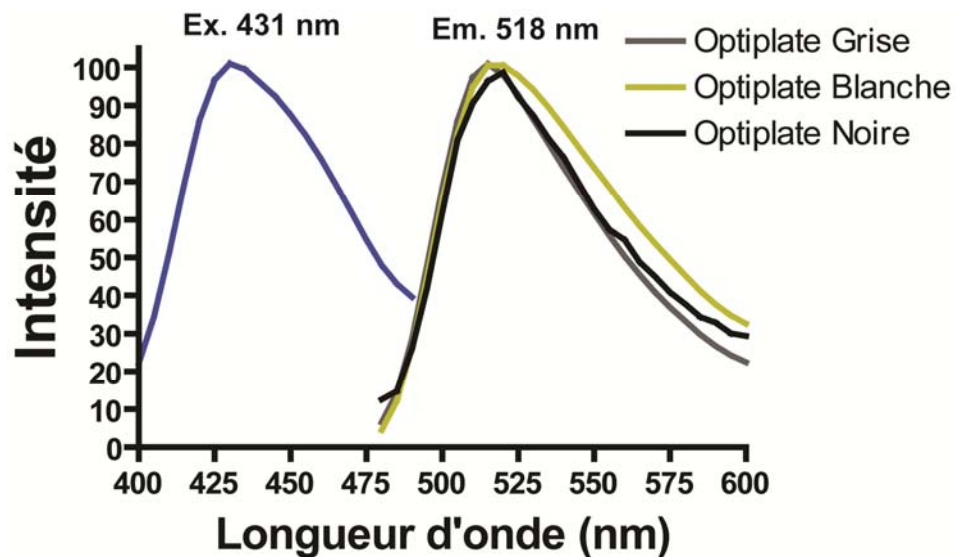


Figure 27: Auto-fluorescence des plaques 96

Le groupe de Sternweis a modifié le biocapteur d'AMPc FRET pour créer un biocapteur EPAC-BRET. Ils ont observé une sensibilité supérieure avec le biocapteur BRET comparativement à la version FRET, lorsque le signal est mesuré sur une population cellulaire (Jiang *et al.*, 2007). Dans le but d'augmenter la fenêtre dynamique de l'essai, qui est de 1.5X le bruit de fond, une permutation circulaire de la EYFP (inversion du C-terminal et du N-terminal de la protéine) a été utilisée pour générer le biocapteur EPAC-BRET. La permutation circulaire, qui n'affecte pas les propriétés spectrales des protéines fluorescentes, permet une orientation différente du chromophore de la EYFP, augmentant ainsi l'efficacité du biocapteur. De notre côté, la simple adaptation de ce biocapteur en génération BRET_{400-GFP}, a permis une augmentation de la fenêtre dynamique, qui est passée de 1.5X à 2.5X le bruit de fond. Cette différence entre les deux générations de BRET, peut s'expliquer par l'une des variables dans l'équation de la loi de Förster, le R_0 . Ce R_0 est une constante indiquant la distance permissive entre deux chromophores pour avoir 50% de l'efficacité du transfert d'énergie, dans le cas présent, entre la luciférase et les protéines fluorescentes (GFP ou YFP). Cette distance a été calculée expérimentalement pour les deux générations de BRET, donnant ainsi 44Å pour le BRET_{480-YFP} et 75Å pour le BRET_{400-GFP} (Dacres *et al.*, 2009). En considérant cette différence de R_0 , il est possible de conclure que le BRET_{400-GFP} permet de mesurer des interactions entre deux partenaires qui sont plus éloignés, que le BRET_{480-YFP}. Plus précisément, la distance entre les deux partenaires peut être d'environ 1.7X plus grande dans le cas du BRET_{400-GFP} comparativement au BRET_{480-YFP}. Comme le transfert d'énergie au sein du biocapteur BRET diminue en fonction de l'augmentation de la concentration d'AMPc, il est attendu que la génération BRET_{400-GFP} soit plus sensible que le BRET_{480-YFP}, car la fenêtre dynamique du BRET_{400-GFP} est plus importante dû à son R_0 qui est plus élevé (Dacres *et al.*, 2009). Pour un même essai mesurant la production d'AMPc, le biocapteur BRET_{400-GFP} permet d'avoir une meilleure certitude sur la mesure de la concentration cellulaire d'AMPc. De plus, avec l'augmentation de la production de lumière par les nouvelles RLuc8 et RlucII, l'utilisation de la génération

BRET₄₀₀-GFP devient aussi simple d'utilisation que la génération BRET₄₈₀-YFP, car il est possible de mesurer une plaque 96 puits en entier, suite à l'addition du substrat.

Obelin

Afin de suivre la libération intracellulaire de calcium, plusieurs méthodes de mesure sont présentement disponibles, toutes basées sur la modulation d'un signal suite à la fixation du calcium au niveau du biocapteur. Dans les années 1960 et 1970, la purification de protéines à activité bioluminescente suite à la liaison du calcium, a été réalisée sur différents organismes marins tels *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962) et *Obelia geniculata* (Campbell, 1974). Toutefois, leur utilisation comme outils de mesure du calcium cytoplasmique dans les cellules de mammifères a nécessité plusieurs années de recherche et l'avènement de la biologie moléculaire, afin d'isoler et de placer dans des vecteurs d'expression, les gènes codant pour ces différentes photo-protéines. Avant l'isolation des gènes pour l'aequorin (*Aequorea victoria*) et l'obelin (*Obelia geniculata*), les photo-protéines étaient purifiées et ensuite micro-injectées dans les cellules (Ashley *et al.*, 1975) ou incorporées dans des microsomes (Dormer *et al.*, 1978) afin de permettre leur entrée dans les cellules. Cette difficulté d'utilisation et le faible nombre d'échantillons pouvant être mesurés en même temps, a limité leur emploi comme traceur de calcium, et favorisé l'utilisation de petites molécules fluorescentes (de type Fura), développées dans les années 1980 (Grynkiewicz *et al.*, 1985) et présentement utilisées de façon routinière pour des campagnes de criblage à large échelle dans les compagnies pharmaceutiques.

Malgré la grande utilisation des petites molécules fluorescentes pour la mesure du calcium intracellulaire, plusieurs caractéristiques défavorables diminuent la sensibilité de cette méthode de quantification du calcium. Premièrement, ces molécules vont émettre de la fluorescence ou changer leurs propriétés de fluorescence, suite à la fixation du calcium sur la molécule. Toutefois, à l'état de base, ces molécules possèdent une légère fluorescence

sans la présence de calcium, ce qui diminue la fenêtre dynamique de l'essai en augmentant le niveau de fluorescence de base. Suite à l'excitation des cellules par la lumière, une certaine proportion du signal de fluorescence mesuré provient de l'auto-fluorescence des cellules, ce qui augmente également le niveau de base de fluorescence et ainsi diminue la fenêtre dynamique de l'essai. Finalement, les petites molécules fluorescentes ont la capacité de traverser les membranes pour diffuser dans tous les compartiments cellulaires. Par conséquent, la fluorescence résultant de leur stimulation représente la moyenne de tous les événements se produisant dans les diverses organelles de la cellule et non uniquement les changements de concentrations cytoplasmiques de calcium, diminuant ainsi la précision et la sensibilité de cette méthode.

En revanche, les photo-protéines, telle l'obéline, sont uniquement exprimées dans le cytoplasme des cellules, limitant la mesure des concentrations de calcium à ce compartiment. Outre cette localisation cytoplasmique spontanée, il est également possible d'introduire des étiquettes d'adressage spécifique aux photo-protéines, afin de suivre les variations calciques dans différents compartiments cellulaires; tels les mitochondries dans le cas de la MitoPhotina, une photo-protéine chimérique entre l'obelin et la clytin, un autre type luciférase dépendante du calcium, munie d'un site d'adressage à la mitochondrie, qui permet d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit de fond que l'aequorin, luciférase-calcique largement utilisée dans l'industrie, pour suivre l'activation des RCPG (Bovolenta *et al.*, 2007). Un autre avantage des photo-protéines est le ratio du signal sur le bruit de fond, qui est largement supérieur aux essais classiques utilisant les petites molécules fluorescentes (Bovolenta *et al.*, 2007). Dans le cadre de l'article 3, une comparaison entre un essai classique avec une petite molécule (FLIPR Calcium 4 Assay Kit, Molecular Devices) et la photo-protéine obéline a permis de démontrer une sensibilité nettement supérieure pour l'obéline avec un ratio signal sur bruit de fond de 230X comparativement à 3.3X pour la petite molécule, en utilisant un récepteur couplé naturellement à la sous-unité Gαq (voir figure supplémentaire 1 de l'article 3).

L'utilisation de l'obelin a permis pour la première fois de mesurer la signalisation calcique d'un récepteur couplé à G α i, sans l'utilisation de la surexpression de PLC- β 2 (qui augmente la réponse calcique produite par le dimère G $\beta\gamma$ de G α i), ni l'utilisation de la chimère G α q/i5 possédant les cinq derniers acides aminés de G α i1 (qui permet l'activation de G α q par des récepteurs normalement couplés à G α i). Lors des criblages à haut débit, l'utilisation de ce type d'artifices permettant de coupler des récepteurs G α i plus efficacement à la voie calcique, facilite la recherche de molécules pouvant lier les récepteurs G α i, car il est laborieux de mesurer l'activité de ces récepteurs autrement. Par contre, dans le cadre de recherches plus fondamentales consistant à déterminer les différentes voies activées suite la stimulation d'un récepteur, la surexpression de PLC- β 2 et de la chimère G α q/i5 peut altérer les voies activées normalement par ces récepteurs. Dans le cas de l'étude réalisée dans l'article 3, l'un des objectifs visé étant de mesurer les influences de différentes sous-unités G α sur la réponse calcique, il n'était pas souhaitable d'utiliser la chimère G α q/i5 comme amplificateur de la réponse calcique.

Biocapteurs parfaits??

Par définition, les biocapteurs sont des outils de mesure qui permettent de rapporter des événements cellulaires. En dépit de leur grande utilité, les biocapteurs actuels possèdent tous le même défaut, leur présence entraîne des modifications plus ou moins importantes dans la physiologie de la cellule. Dans le cas des biocapteurs de BRET/FRET, la surexpression de protéines fusionnées aux différents rapporteurs peut entraîner une diminution ou une augmentation de la réponse de certaines voies de signalisation, en altérant les mécanismes de contrôle de ces voies, car ces protéines dérivent d'une composante normalement utilisée par les cellules pour réguler leur homéostasie, contrairement à l'obéline qui est exogène. Un biocapteur parfait devrait dans un premier temps permettre la mesure d'un événement cellulaire, sans modifier la physiologie de la cellule et cette mesure devrait être uniquement dépendante de l'événement en question. Suivant ces conditions, l'utilisation de petites molécules rapporteuses, telles les molécules

fluorescentes en présence de calcium décrites précédemment, semble répondre à cette exigence, par contre leur sensibilité n'est pas assez élevée pour mesurer les faibles changements de concentrations calciques provoquées par certains récepteurs. En revanche, l'obéline est nettement plus sensible pour détecter de faibles niveaux de calcium. De plus, en l'absence de variation de calcium, le signal de base est nul, ce qui représente un autre point essentiel pour parler d'un biocapteur parfait. En revanche, il est possible que l'expression de l'obéline puisse titrer le calcium cytoplasmique, diminuant ainsi la disponibilité de cet ion pour les fonctions normales de la cellule.

Pour palier aux différents problèmes des biocapteurs, de nouvelles technologies sont présentement mises au point afin de détecter des modifications cellulaires, dans un contexte de cellules vivantes, sans l'ajout de marqueurs bioluminescents ou fluorescents. Ces techniques sont basées sur la mesure d'un changement global de structure de la cellule rapporté soit par la modification d'un courant électrique (CellKey™, MDS Analytical Technologies) (Verdonk *et al.*, 2006), soit par la détection optique (Epic™, Corning) (Lee *et al.*, 2008). Dans les deux cas, il est possible de mesurer l'effet de différentes molécules sur la structure de la cellule, mais la complexité des voies de signalisation impliquées dans ces modifications rend difficile l'interprétation de ces changements.

Finalement, en l'absence de perfection au niveau des biocapteurs de BRET/FRET et des petites molécules rapporteuses, seule l'utilisation de plusieurs biocapteurs en même temps va permettre de confirmer les différentes mesures obtenues à partir des biocapteurs individuels (dans le cas où ils mesurent le même événement cellulaire) ou de disséquer individuellement les différentes voies de signalisation engagées par les RCPG, d'où l'intérêt de pouvoir combiner différents biocapteurs dans un même essai.

Régulation de l'efficacité de signalisation

La terminaison de la signalisation des RCPG est un phénomène hautement régulé par plusieurs mécanismes moléculaires, tels le recrutement de protéines inhibitrices de l'activité des protéines G hétérotrimériques (RGS), la phosphorylation des récepteurs (GRK) et leur internalisation en vue d'une dégradation (β -arrestine). L'internalisation des récepteurs est au cœur des dispositifs cellulaires utilisés dans le but de désensibiliser et resensibiliser des voies de signalisation précises, engendrées par certains récepteurs. Au cours des dernières années, une séquence d'événements de phosphorylation suivis du recrutement de protéines a été proposée pour expliquer cette désensibilisation de la signalisation par les RCPG; les récepteurs sont phosphorylés par des kinases de type GRK, suivi par le recrutement de l'arrestine, une protéine d'échafaudage permettant l'arrimage des différentes protéines essentielles à l'internalisation (Claing, 2004). Récemment, différentes études sur des récepteurs (DOR et le récepteur à la dopamine D2) ont démontré que la phosphorylation des récepteurs n'est pas nécessaire pour le recrutement de l'arrestine, ainsi que l'internalisation des récepteurs en question. Cette indépendance de la phosphorylation pour la séquestration des récepteurs a également été observée pour le récepteur β 2-adrénergique (Bouvier *et al.*, 1988). Néanmoins, la phosphorylation des récepteurs semble importante pour contrôler le recyclage vs la dégradation des RCGP (Namkung *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008).

Dans le cadre de l'étude présentée dans l'article 2, la présence d'un GRK2 mutant pour son activité kinase (GRK2-K220R) n'a pas permis de favoriser le recrutement de la β -arrestine2 aux récepteurs α_{2A} -AR, contrairement aux contrôles GRK2 et GRK5 natifs. Par contre, le GRK2-K220R diminue la réponse de mobilisation du calcium aussi bien que le GRK2 natif. De plus, la présence de GRK2 ou GRK2-K220R permet d'augmenter la distance entre $G_{\alpha i}$ et $G\beta\gamma$, tel que mesuré par une diminution plus importante du BRET entre $G_{\alpha i}$ et

G $\beta\gamma$ (figure x article 2). La présence de GRK2 en complexe avec les récepteurs, et non son activité kinase, semble importante pour la désensibilisation. Une autre évidence indiquant que la présence de GRK2 sous les récepteurs est importante, provient d'une étude sur l'effet du couplage de G α_{15} , sous-unité la famille G, sur la désensibilisation ainsi que le recrutement de β -arrestine pour certains récepteurs (Innamorati *et al.*, 2009). Comme G $\alpha_{15/16}$ (orthologues souris / humain, respectivement) est incapable d'interagir avec GRK2 (Day *et al.*, 2003), la présence de cette sous-unité G α_{15} empêche le recrutement de GRK2 à la membrane, donc possiblement aux récepteurs, ce qui diminue l'entrée de l'arrestine dans le complexe. À partir de ces résultats, il est possible de conclure que la présence de GRK2 sous le récepteur, et non simplement la phosphorylation par GRK2 des récepteur, favorise le recrutement de l'arrestine. Par contre, la phosphorylation des récepteurs semble influencer l'avidité de l'interaction entre la β -arrestine et les récepteurs, ce qui explique l'augmentation du BRET mesuré entre β -arrestine2 et α_{2A} -AR en présence de GRK2 natif.

Ces résultats sur l'importance de la présence de GRK2 pour la désensibilisation, pourraient suggérer la formation d'un complexe transitoire entre le récepteur, le GRK2 et les β -arrestines. Afin de réguler l'activité et la translocation à la membrane plasmique de GRK2, les protéines kinases de la famille Src phosphorylent GRK2 au niveau de sites spécifiques (Hong *et al.*, 2009; Sarnago *et al.*, 1999). En parallèle, il a également été démontré que l'interaction directe entre Src et β -arrestine est importante pour la dégradation de GRK2 (Penela *et al.*, 2001). Ces différentes observations sur l'interaction Src/ β -arrestin et l'effet direct de Src sur l'activité de GRK2, démontrent également la pertinence d'un complexe GRK2/ β -arrestine pour la régulation de l'activité des RCPG. Dans le cadre de l'étude de l'article 2, un complexe GRK2/ β -arrestine2/récepteur α_{2A} -adrénergique a été mesuré par l'utilisation du multiplexage du BRET_{400-GFP} et du BRET_{480-YFP} dans un seul essai (résultats non publiés). Tel qu'expliqué précédemment, cet essai de combinaison de BRET ne permet

pas de dire si les trois partenaires sont en interaction en même temps. Cependant, comme le recrutement de GRK2 et de β -arrestine se produisent sous les mêmes récepteurs, il est possible d'imaginer que cette interaction mesurée en BRET entre le GRK2 et la β -arrestine2 est due à la formation d'un complexe récepteur/GRK2/ β -arrestine2.

Tel que mesuré par le groupe du Dr. Zingg, le recrutement transitoire de GRK2 au niveau du récepteur OTR, précède le recrutement de la β -arrestin2 à OTR qui est maintenu dans le temps (Hasbi *et al.*, 2004). Or, il est possible d'observer une fenêtre de temps où GRK2 et β -arrestine sont en interaction avec le récepteur, ce qui est compatible avec l'idée de la formation d'un complexe entre un RCPG, une GRK2 et une β -arrestine. Par ailleurs, le complexe entre GRK2 et β -arrestine a déjà été montré *in vivo* suite à l'activation d'un récepteur. Le groupe du Dr. Mayor a immunoprécipité les GRK2 endogènes suite à la l'activation du récepteur CCR2b, et révélé par immuobuvardage la présence de β -arrestine dans l'immunoprécipitat de monocytes (Aragay *et al.*, 1998), indiquant la possibilité de formation de complexes entre ces deux protéines, uniquement suite à la stimulation d'un récepteur.

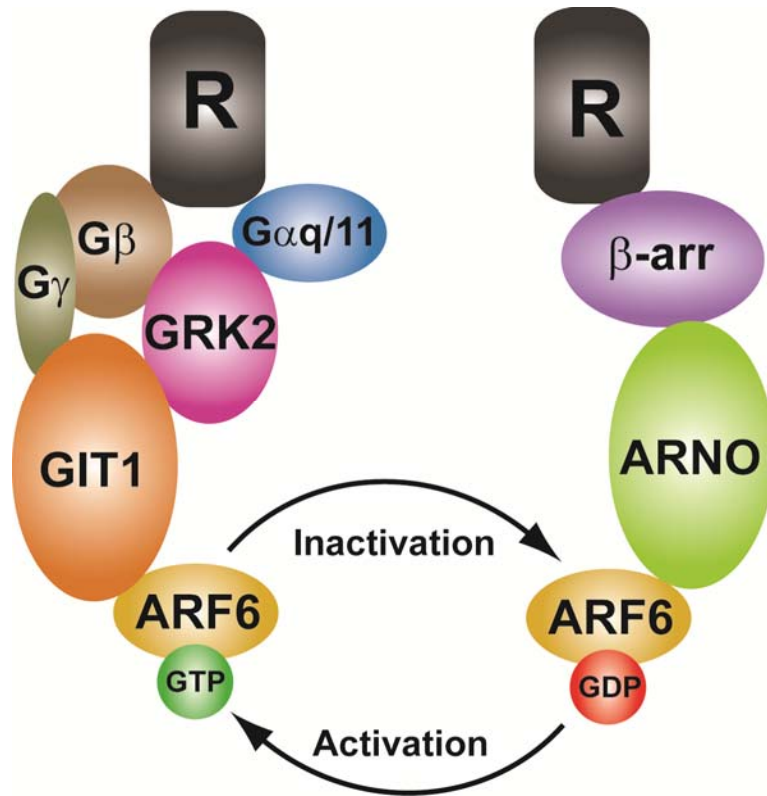


Figure 28: Cycle d'activation/inactivation d'ARF6 : rôle possible de GRK2 et βarr-2

La présence de GRK2 et β-arrestine dans le même complexe peut avoir une importance biologique pour certains mécanismes cellulaires, tels que l'envoi des récepteurs dans les puits tapissés de clathrine et le remodelage du cytosquelette. La petite protéine G ARF6, importante dans différents types d'internalisation ainsi que dans la migration cellulaire, est impliquée dans la régulation de certains récepteurs. L'activation/inactivation rapide de ARF6 par l'entrée de GTP suivi de l'hydrolyse de ce GTP en GDP, est requise pour ses fonctions cellulaires (Claing, 2004). Afin de contrôler cet échange du GDP/GTP ainsi que l'hydrolyse du GTP, ARF6 est régulé par deux types de protéines, l'une favorisant l'échange du GDP (une ARF-GEF appelé ARNO) et l'autre augmentant l'activité GTPasique de ARF6 (une ARF-GAP appelé GIT1). La protéine ARF-GEF, ARNO, interagit avec β-arrestine de façon constitutive (Claing *et al.*, 2001), alors que de son côté

GRK2 interagit avec GIT1 pour l'entraîner à la membrane plasmique (Penela *et al.*, 2008). La formation d'un complexe comprenant ARNO/ β -arrestine avec GIT1/GRK2 sous un récepteur activé, pourrait permettre cette activation/inactivation rapide en rapprochant tous les éléments moléculaires nécessaires à cette activité d'ARF6, permettant ainsi le remodelage du cytosquelette requis lors de la migration cellulaire (voir Figure 28, page 232).

Ces résultats semblent indiquer que la formation d'un complexe entre GRK2 et β -arrestine sous un récepteur activé est possible. Une récente étude menée sur la sélectivité du recrutement de β -arrestine par les sous types de GRK, indique que GRK2 favoriserait le recrutement de β -arrestine2, tandis que GRK3 favoriserait plutôt l'arrivée de β -arrestin1 (Busillo *et al.*). En parallèle, il a été démontré que le type de sous-unités G β de la protéine G peut influencer le recrutement différentiel de GRK2/GRK3 aux récepteurs (Daaka *et al.*, 1997b). La sous-unité G β 3 interagit uniquement avec GRK3 et non GRK2, ainsi la présence de G β 3 sous un récepteur pourrait promouvoir sélectivement le recrutement de GRK3, et par conséquent favoriser l'entrée de β -arrestin1 dans le complexe. Ces résultats indiquent que la nature des sous-unités de la protéine G est importante pour la sélectivité de formation de complexes suivant l'activation des récepteurs, influençant même le devenir de ces complexes.

Dimérisation fonctionnelle des protéines G

Le calcium est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires. Certaines études ont d'ailleurs démontré l'importance de la signalisation via le calcium par le récepteur δ -opioïde (DOR) pour l'activation ainsi que la prolifération des cellules lymphocyte T (Sharp *et al.*, 1998), et la libération de neurotransmetteurs suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire

de calcium (Jin *et al.*, 1992). Principalement couplé à la protéine $G_{\alpha i}$, le récepteur DOR est également en mesure d'interagir avec d'autres protéines G_{α} , qui pourraient, en plus de $G_{\beta\gamma}$ et de $G_{\alpha i}$, influencer la mobilisation du calcium par ce récepteur. Le groupe du Dr. Hales a démontré que la co-expression de DOR et MOR permet le couplage du récepteur MOR à la protéine $G_{\alpha q}$. Cependant, la mobilisation de calcium intracellulaire demeure sensible à la PTX, indiquant une composante $G_{\alpha i}$ essentielle à ce mécanisme (Charles *et al.*, 2003).

Dans l'étude de l'article 3, la co-expression de différentes sous-unités G_{α} , des sous familles de la protéine G; $G_{\alpha i}$ (sensible à la PTX) et $G_{\alpha q}$ non sensible à la PTX) ont montré une similarité de sensibilité à la PTX pour la libération du calcium, tel qu'observé préalablement par le groupe du Dr. Hales. Curieusement, la surexpression des sous-unités de la famille $G_{\alpha i}$ ou $G_{\alpha q}$ n'augmente pas la libération du calcium, alors que la co-expression de $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha q}$ dans les mêmes cellules provoque une augmentation de la concentration cytoplasmique du calcium, suite à l'activation du récepteur DOR. Le fait de surexprimer la protéine $G_{\alpha q}$ pourrait induire l'activité constitutive de certains récepteurs couplés à $G_{\alpha q}$, et ainsi produire cette initiation de la voie calcique, comme dans le cas de l'étude menée par le groupe du Dr. Henderson (Yeo *et al.*, 2001). Les auteurs de cette étude ont démontré que la pré-activation des cellules SH-SY5Y par le carbachol permet une stimulation plus importante de la voie du calcium par un agoniste sélectif de DOR (DPDPE). En effet, alors que seules 5% des cellules modifient leur concentration de calcium cytoplasmique suite à une simple activation par le DPDPE, la pré-stimulation par le carbachol augmente ce nombre à 60 % (Yeo *et al.*, 2001). À partir de ces résultats, les auteurs ont conclu que la pré-activation des récepteurs muscariniques permet une deuxième vague plus importante de libération de calcium par les DOR suite à leur activation. Ce mécanisme de 'priming' par des récepteurs $G_{\alpha q}$ ne peut être invoqué pour expliquer la synergie observée entre $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha q}$, qui provoque une augmentation du relâchement du calcium suite à l'activation des DOR, car la surexpression seule de $G_{\alpha q}$ n'a aucun effet. Si

la surexpression de $G\alpha_q$ augmentait l'activité de récepteurs couplés à $G\alpha_q$, nous aurions dû obtenir les mêmes résultats en surexpression simple de $G\alpha_q$ et en co-expression avec $G\alpha_i$.

En admettant que la surexpression de $G\alpha_q$ influence l'activité calcique induite par les DOR via une interaction croisée avec d'autres composantes cellulaires (tels des récepteurs couplés à $G\alpha_q$), cette hypothèse ne permet pas d'expliquer les résultats obtenus avec la co-expression de $G\alpha_{15}$, une sous-unité de la famille $G\alpha_q$ qui active la mobilisation du calcium via le $PLC\beta$, et $G\alpha_o$. Lorsque surexprimé seul, $G\alpha_{15}$ provoque une augmentation importante de la mobilisation calcique par les DOR, une réponse faiblement influencée par la PTX. Tout comme dans le cas de la co-expression de $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$, la co-expression de $G\alpha_o$ avec $G\alpha_{15}$ amplifie la réponse calcique, mais dans ce cas-ci, la réponse est fortement inhibée par la PTX. Il est possible d'imaginer que les récepteurs DOR soient préalablement couplés à $G\alpha_i/o$, et suite à leur stimulation, les DOR changeraient de couplage pour devenir couplé à $G\alpha_q/15$, comme cela a été proposé pour certains récepteurs, comme par exemple le récepteur β_2 adrénergique qui passent d'un couplage $G\alpha_s$ à un couplage $G\alpha_i$ suite à leur activation (Daaka *et al.*, 1997a; Mitra et Bourreau, 2006), ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus. Lorsqu'exprimé seule, $G\alpha_{15}$ serait la protéine G principalement couplée aux DOR, ce qui expliquerait l'absence d'effet de la PTX. Par contre, en présence de $G\alpha_o$, les récepteurs seraient principalement couplés à cette protéine G, et suite à l'activation des récepteurs, $G\alpha_{15}$ pourrait prendre la place de $G\alpha_o$, expliquant ainsi l'effet de la PTX observé. Seulement, ce modèle de changement de couplage ne permet pas d'expliquer la synergie de production de calcium observée suite à la co-expression de $G\alpha_i/o$ avec $G\alpha_q/15$.

Lorsqu'analysés individuellement, les résultats de l'activation du calcium par les récepteurs DOR présentés dans l'article 3, peuvent être expliqués par différents modèles. Toutefois, si l'on combine ces résultats de mobilisation du calcium avec ceux obtenus sur les interactions protéiques entre les sous-unités de $G\alpha$ de la protéine G, un modèle de formation de complexes entre le récepteur DOR et différentes sous-unités $G\alpha$ prend alors

forme et permet de proposer une hypothèse expliquant l'ensemble des résultats obtenus, où le récepteur DOR pourrait interagir avec plusieurs protéines $G\alpha$ dans un même complexe.

La co-expression de $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, mais pas $G\alpha_q$, augmente la mobilisation du calcium suite à l'activation du récepteur DOR (article 3 figure 2). Contrairement aux sous-unités $G\alpha_{14}$ et $G\alpha_{15}$, le récepteur DOR ne semble pas en mesure d'activer directement la sous-unité $G\alpha_q$, en dépit du fait que $G\alpha_q$ semble interagir directement avec DOR (Law et Reisine, 1997).

Une des premières évidences de l'interaction entre $G\alpha_q$ et DOR vient de l'étude menée par le groupe du Dr. Reisine qui a démontré la présence du récepteur DOR suite à l'immunoprécipitation de $G\alpha_q$ (Law et Reisine, 1997). Il semble qu'une partie des récepteurs DOR puissent d'interagir avec $G\alpha_q$ à l'état de base ou suite à la stimulation du récepteur par un agoniste sélectif (Law et Reisine, 1997). Cependant, ces résultats n'indiquent pas si la sous-unité $G\alpha_q$ participe à la signalisation normale du récepteur DOR. De notre côté, nous avons mesuré une interaction basale entre le récepteur DOR et la sous-unité $G\alpha_q$ en BRET, qui n'est pas modulée par la stimulation du récepteur. Il a été démontré qu'une modulation de signal de BRET entre un récepteur et une protéine G hétérotrimérique est le reflet de l'engagement de cette protéine G (Gales *et al.*, 2005). Par conséquent, l'absence de modulation d'interaction entre $G\alpha_q$ et le récepteur DOR semble indiquer une absence d'engagement direct de cette $G\alpha$ par le récepteur DOR. Toutefois, l'interaction entre $G\alpha_q$ et le dimère $G\beta\gamma$ est modulée par la présence d'agoniste du DOR, indiquant la présence de $G\alpha_q$ dans un contexte de récepteurs DOR membranaires et actifs.

La sous-unité $G\alpha_q$ peut être phosphorylée en position 356 au niveau de son C-terminal par des kinases de tyrosine, telle que fyn, (Umemori *et al.*, 1997). Une fois phosphorylée, la protéine $G\alpha_q$ possède un meilleur couplage à la PLC- β (Liu *et al.*, 1996b), alors que l'interaction entre son domaine C-terminal et les récepteurs diminue (Umemori *et al.*, 1999). En parallèle, il a été montré que l'activité kinase de fyn peut être régulée par les

sous-unités de la famille G α i (Tsygankova *et al.*, 1998). Dans le contexte du récepteur DOR, il serait possible que l'activation de G α i par le récepteur DOR augmente la phosphorylation de G α q, ce qui permettrait alors d'augmenter le couplage de la PLC- β au complexe récepteuriel, favorisant ainsi l'activation des PLC- β par le dimère G β γ de G α i. Pour plusieurs récepteurs couplés aux sous-unités de la famille G α i, il a été montré que c'est le dimère G β γ qui permet de lier et d'activer la PLC β pour induire la mobilisation du calcium. En même temps, la phosphorylation empêcherait l'activation directe de G α q par DOR, car une fois phosphorylé, le C-terminal de G α q ne peut plus entrer dans la structure du récepteur pour être activé (voire Figure 29, page 238).

Il a été montré que les sous-unités de la familles G α i pouvaient interagir avec les canaux potassiques activés par les protéines G (GIRK), effecteurs prototypiques de la signalisation par G β γ , et pouvaient induire un changement de conformation différente du dimère G β γ (Berlin *et al.*, 2009). GIRK semblerait agir comme pierre angulaire pour former un complexe de signalisation avec G α i et G β γ (Berlin *et al.*, 2009). Comme les PLC- β sont capable d'interagir avec G α q et G β γ de G α i (Filtz *et al.*, 1996), il serait possible que les PLC- β participent au complexe par une interaction avec G α q, permettant ainsi l'orientation favorable pour l'interaction et l'activation des PLC- β par le dimère G β γ de G α i. En parallèle, le groupe du Dr. Smrcka a récemment observé par analyse de résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution, les mouvements du dimère G β γ libre ou en interaction avec différentes protéines (Smrcka *et al.*, 2009). Ils ont ainsi déterminé que certains résidus de G β (G β W99 et G β W332) importants dans l'interaction avec la sous-unité G α ne semblaient pas perdre leur mobilité en présence de G α , mais qu'en présence de la phosducine, ces mêmes résidus perdaient alors leur mobilité (Smrcka *et al.*, 2009). De ces résultats, ils ont conclu qu'en solution, l'hétérotrimère G α β γ se retrouve en conformation inactive ouverte, ce qui explique la liberté de mouvement de ces résidus. Par conséquent, sans l'échange GDP/GTP, il est possible d'avoir l'interaction d'effecteurs (dans leur cas la phosducine) de G β γ ou G α avec l'hétérotrimère G α β γ (Smrcka *et al.*, 2009). Dans le

modèle que nous proposons, $G\alpha_q$, qui serait à l'état inactif, pourrait servir de protéine d'échafaudage à la PLC- β , favorisant la signalisation calcique du récepteur DOR (voir Figure 29, page 238).

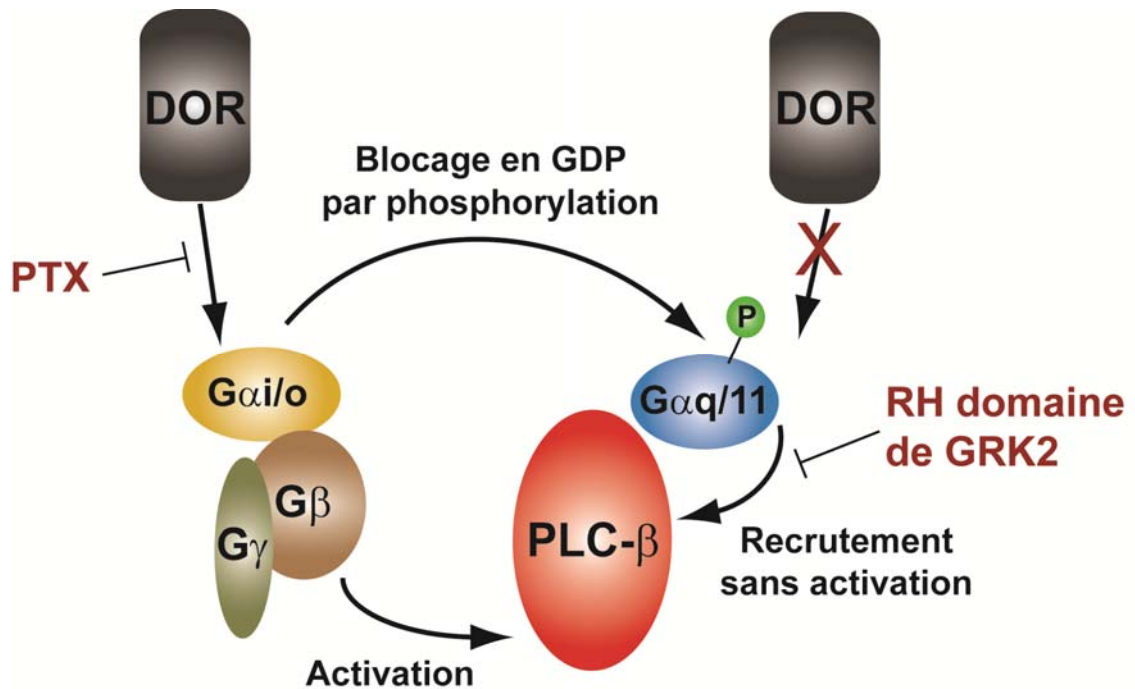


Figure 29: Modèle d'activation de la PLC- β par DOR

Comme les dimères $G\beta\gamma$ de $G_{\alpha i}$ sont capables d'activer la production d'IP3 par les PLC- β et que les PLC- β pourraient être recrutés dans le complexe par $G\alpha_q$ phosphorylé, il est possible d'imaginer un mécanisme d'action permettant de justifier la présence de différentes $G\alpha$ dans le même complexe (voire Figure 29, page 238). Toutefois, plusieurs expériences complémentaires devront être effectuées afin de valider ce modèle de signalisation du calcium pour un récepteur $G_{\alpha i}$, impliquant une sous-unité $G\alpha_q$ inactive.

Un autre résultat semble indiquer que $G\alpha_q$ pourrait être localisée dans le complexe de signalisation du récepteur DOR, soit l'effet de la protéine GRK2 sur la mobilisation du calcium induite par DOR. La protéine kinase GRK2 est composée de trois domaines

importants pour sa localisation ainsi que sa fonction : (1) Le domaine RH situé dans la portion N-terminale de la protéine, similaire au domaine RGS des protéines du même nom, est important pour l'interaction avec la protéine Gαq. Ce domaine de GRK2 semble interagir uniquement avec certains membres de la famille Gαq (Carman *et al.*, 1999; Sallese *et al.*, 2000). (2) Le deuxième domaine de GRK2 situé au centre de la protéine, est important pour l'activité kinase. (3) Finalement, le troisième domaine, est localisé dans la portion C-terminale de la protéine et est directement impliqué dans la liaison au dimère Gβγ (Daaka *et al.*, 1997b). Certains groupes ont utilisé le domaine N-terminal de GRK2 pour mesurer l'implication directe de Gαq dans la signalisation des RCPG, car l'expression du domaine N-terminal de GRK2 atténue l'activité des PLC-β (Carman *et al.*, 1999; Hains *et al.*, 2004; Sallese *et al.*, 2000). Le domaine RH de GRK2 interagit différemment que les RGS avec Gαq (Day *et al.*, 2004). Ce domaine RH de GRK2 semble plutôt interagir avec la même région que les effecteurs de Gαq, tels les PLC-β ou p63RhoGEF (Shankaranarayanan *et al.*, 2008), ce qui crée un encombrement stérique par compétition pour le site d'interaction, limitant l'accès des effecteurs sur Gαq. Lorsque ce domaine RH de GRK2 a été introduit dans l'essai de mesure de la mobilisation du calcium (l'essai obelin), nous avons observé un blocage de la réponse calcique suite à l'activation du récepteur DOR par un agoniste sélectif. De plus, une diminution de la mobilisation du calcium a également été observée suite à l'expression de la portion C-terminale de GRK2, indiquant que Gαq ainsi que le dimère Gβγ semblent essentiels pour la signalisation calcique du récepteur DOR (résultats non publiés voir Figure 30, page 240). En parallèle, l'effet de la surexpression du domaine RH et du domaine C-terminal de GRK2 a également été mesuré sur la voie de l'AMPc inhibée par le récepteur DOR. Les résultats obtenus ont démontré que la séquestration du dimère Gβγ par le domaine C-terminal de GRK2 diminue l'activité inhibitrice du récepteur sur la voie de l'AMPc, alors que la présence du domaine RH augmente cette activité inhibitrice (résultats non publiés voir Figure 30, page 240). Par ailleurs, la PTX bloque autant la mobilisation du calcium que l'inhibition de la voie de l'AMPc, démontrant ainsi la nécessité d'activation de Gαi par le DOR dans les deux cas.

De plus, la présence de $G_{\alpha q}$ semble également importante pour la mobilisation du calcium ainsi que la régulation de l'inhibition de la production d'AMPc. Les résultats démontrant l'effet du domaine RH de GRK2 sur la signalisation des DOR peuvent s'expliquer par une altération de la liaison des effecteurs sur $G_{\alpha q}$, inhibant la mobilisation du calcium. De plus, le domaine RH empêche le recrutement des GRK2 endogènes, bloquant ainsi la désensibilisation du récepteur DOR par GRK2, ce qui provoque une augmentation de l'activité inhibitrice de $G_{\alpha i}$ sur la production d'AMPc.

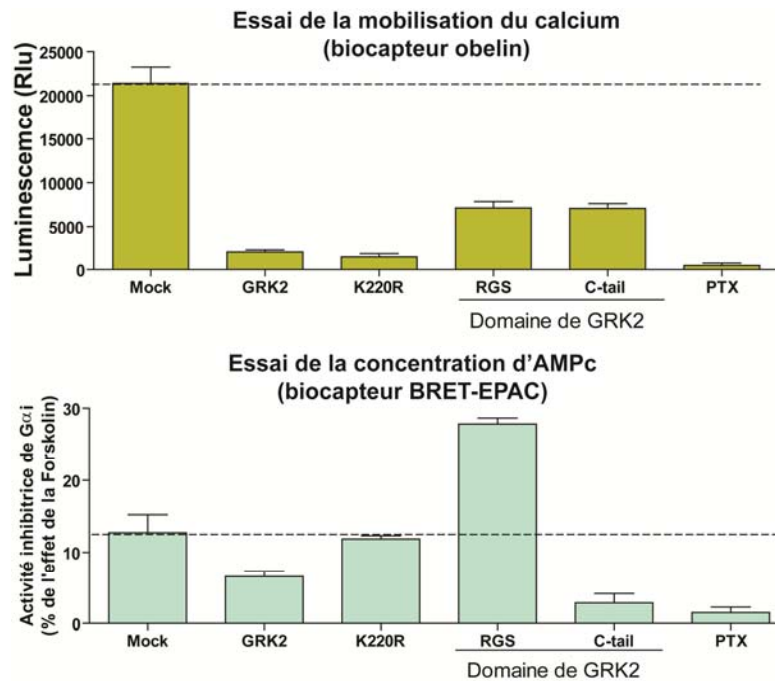


Figure 30: Effet du domaine RH de GRK2 sur le calcium et l'AMPc produit par DOR

Cellules HEK293t expriment stablement de le récepteur Flag-DOR ont été transfecté avec les biocapteurs de calcium Obéline ou d'AMPc BRET-EPAC pour mesurer l'effet de la présence de GRK2, du mutant d'activité kinase GRK2-K220R ou les domaines d'interaction à $G_{\alpha q}$ (domaine RGS) ou dimère $G\beta\gamma$ (C-tail) de GRK2.

À partir des résultats présentés dans l'article 3 sur la dimériorisation des G_{α} , de l'étude du Dr. Smrcka sur la possibilité de fixer des effecteurs par les protéines G hétérotrimériques à l'état inactifs (Smrcka *et al.*, 2009), ainsi que de l'effet du domaine RH de GRK2 sur la signalisation du calcium par le récepteur DOR, il est concevable d'imaginer qu'une

protéine $G\alpha$ puisse interagir avec un récepteur sans toutefois être activée par ce dernier et puisse participer à la signalisation de ce récepteur, sans échanger son GDP pour du GTP.

Dans la littérature, un modèle intéressant d'implication de $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ dans la signalisation par le calcium a été mise en évidence dans les cellules NIH 3T3, où selon le cycle cellulaire, la libération du calcium par le récepteur de type V1a endogène est influencé par la toxine PTX, suite à la stimulation par l'AVP (Abel *et al.*, 2000). En phase de division cellulaire, la PTX n'a pas d'effet sur la signalisation du calcium. Par contre, en G_0 (phase de latence), la PTX bloque 50% de la réponse calcique. De plus, la micro-injection d'anticorps anti- $G\alpha_q/11$ affecte la signalisation du calcium dans les deux états cellulaires, tandis que la micro-injection d'anti- $G\alpha_i/o$ affecte uniquement la signalisation des cellules en phase G_0 (Abel *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent que $G\alpha_q$ est essentiel à la signalisation du calcium pour le récepteur à AVP des NIH 3T3 et que dans certaines conditions cellulaires, $G\alpha_i$ peut influencer directement l'activité de $G\alpha_q$.

Un des facteurs qui rend ardue la démonstration du modèle selon lequel DOR/ $G\alpha_i$ / $G\alpha_q$ se retrouvent dans un même complexe, est la difficulté d'obtenir des outils pharmacologique inhibiteurs de $G\alpha_q$, comme c'est le cas pour $G\alpha_i$ avec la PTX, afin de démontrer l'importance des deux $G\alpha$ dans la signalisation via le calcium. Malgré le fait qu'un inhibiteur de $G\alpha_q$, le YM-254890, soit rapporté dans la littérature (Takasaki *et al.*, 2004), il nous a été impossible d'avoir accès à cette molécule pour mener notre étude. Par ailleurs, bien que YM-254890 soit sélectif pour $G\alpha_q$ et qu'il diminuerait potentiellement l'activité calcique du récepteur DOR, il y aurait toujours un doute possible sur la contribution d'une interaction directe de $G\alpha_q$ dans la signalisation des DOR. En effet, il est également envisageable que l'effet attendu de l'inhibiteur YM-254890 puisse être dû à une inhibition d'autres voies cellulaires indépendantes des DOR, et ainsi indirectement affecter la mobilisation du calcium par le DOR.

Une autre alternative pourrait être proposée pour inhiber $G_{\alpha q}$ et ainsi démontrer l'implication de cette protéine G dans la signalisation des DOR, consiste à réduire l'expression de $G_{\alpha q}$ par des ARNm interférents. Seulement, pour des raisons techniques, il nous a été impossible de coupler l'expression de vecteurs shRNA (plasmides contenant la séquence spécifique des ARNm interférents pour une protéine donnée) avec celle des vecteurs d'expression de protéine de fusion BRET, pour suivre l'interaction entre les RCPG et les G_{α} en BRET dans des conditions de surexpression transitoire. Toutefois, même dans l'éventualité où il aurait été possible de trouver des conditions d'utilisation de la technologie shRNA compatibles avec les techniques de BRET (mesure d'interaction protéine-protéines) ou d'obelin (mesure de la concentration cytoplasmique du calcium), il aurait également été difficile d'affirmer que la réduction de la quantité de $G_{\alpha q}$ soit directement impliquée dans la réduction de la réponse DOR, plutôt qu'indirectement via les interactions croisées avec d'autres voies de signalisation nécessitant $G_{\alpha q}$.

Dans les deux cas, que ce soit avec l'inhibiteur spécifique YM-254890 ou avec les shRNA sélectifs, la diminution de signal attendue pour la libération du calcium intracellulaire suite à l'inhibition de $G_{\alpha q}$, pourrait être interprétée de différentes façons. Ces deux approches ne permettraient donc pas de confirmer définitivement la présence de $G_{\alpha q}$ dans un complexe avec le récepteur DOR et $G_{\alpha i}$. Par contre, la synergie de libération du calcium mesurée suite à la co-expression de membres de la famille $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha q}$, ainsi que l'effet de la PTX sur les conditions de surexpression simple des sous-unités de la famille $G_{\alpha q}$, indiquent que les interactions croisées entre ces deux protéines G_{α} pourraient avoir lieu dans un complexe de signalisation commun près du récepteur DOR.

Dimérisation des protéines G et implication dans la signalisation

Les résultats fonctionnels obtenus pour le récepteur DOR suggèrent la possibilité de formation de complexes entre des sous-unités de la famille $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ pour la signalisation via le calcium induite par ce récepteur. Afin de confirmer l'existence de tels complexes comprenant plusieurs sous-unités $G\alpha$, une matrice d'interaction en BRET entre les différentes sous-unités de $G\alpha$ a été produite dans le but de déterminer les éventuels partenaires d'interactions (article 3, figure 4). Basé sur leur potentiel à générer un signal de BRET spécifique, certaines sous-unités $G\alpha$ ont démontré des interactions spécifiques avec différentes $G\alpha$, tandis que d'autres ont démontré une plus grande sélectivité en interagissant seulement avec quelques sous-unités $G\alpha$. Cette simple observation de combinaisons différentielles d'interactions renforce l'idée que ces complexes à plusieurs $G\alpha$ existent et soient sélectifs donnant naissance qu'à certaines associations. Il est connu dans la littérature que $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ ne se retrouvent pas sous les mêmes récepteurs en même temps. En effet, l'activation du récepteur β_2 adrénergique va entraîner la transposition d'une signalisation $G\alpha_s$ vers une signalisation via $G\alpha_i$ (Daaka *et al.*, 1997a). Dans le tableau d'interactions, les membres de la famille $G\alpha_i$, à l'exception de $G\alpha_o$, ne semblent pas interagir avec $G\alpha_s$ (article 3, figure 4). En ce qui concerne l'interaction mesurée entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$, il a été montré par le groupe du Dr. Sternweis qu'une synergie d'action entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$ pouvait augmenter la production d'AMPc par l'adénylate cyclase VII (ACVII) (Jiang *et al.*, 2008). La formation d'un complexe entre ACVII- $G\alpha_s$ - $G\alpha_{12}$ pourrait expliquer cette synergie d'action. Par ailleurs, il a été démontré que des récepteurs couplés à $G\alpha_q$ peuvent augmenter l'activité de l'adénylate cyclase VI (ACVI) en synergie avec l'action de la forskoline, un activateur des adénylates cyclases qui est potentialisé par la présence de $G\alpha_s$ (Beazely et Watts, 2005). Un modèle similaire à celui proposé pour $G\alpha_{12}/G\alpha_s$ peut être échafaudé, où un complexe entre ACVI- $G\alpha_s$ - $G\alpha_q$ permettrait d'expliquer cette synergie. Comme pour $G\alpha_{12}$, $G\alpha_s$ semble interagir avec $G\alpha_q$ dans nos essais d'interaction.

Ces différents exemples de synergie entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$, ainsi qu'entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_q$ pour l'activation de l'adénylate cyclase, n'excluent pas la possibilité d'interactions croisées entre

deux systèmes de récepteurs distincts et séparés. En dépit des interactions observées entre certaines $G\alpha$, il est également possible que les $G\alpha$ soient activées séquentiellement par les récepteurs. Néanmoins, il demeure envisageable que la formation de complexes à plusieurs $G\alpha$ puisse influencer l'activité de certains effecteurs. Dans le cas du complexe entre $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ retrouvé dans l'article 3, une augmentation de mobilisation du calcium a été mesurée suite à la co-expression d'un membre de la famille $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$, et la formation de complexes en BRET entre certaines $G\alpha$ membres de ces sous-familles a également été observée. Une activation séquentielle de $G\alpha_i$ suivi de $G\alpha_q$ ne semble pas possible à la lumière des résultats démontrant l'interaction entre le récepteur les différentes $G\alpha$. Le récepteur DOR semble interagir avec $G\alpha_q$ à l'état basal. S'il y avait eu un recrutement de $G\alpha_q$, une forte augmentation de BRET aurait été mesurée suite à la stimulation du récepteur. Pour ce qui est d'une activation séquentielle de populations de récepteurs DOR couplés différemment soit à $G\alpha_i$ ou à $G\alpha_q$, l'absence d'engagement de $G\alpha_q$ par le récepteur DOR ne permet pas d'invoquer ce phénomène. La présence de $G\alpha_q$ dans un complexe de récepteurs activés est confirmée par le changement de BRET entre $G\alpha_q$ et $G\gamma_1$ suite à l'activation du récepteur DOR par le DPDPE. Ce changement de BRET est également sensible à la PTX démontrant l'interrelation entre $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$.

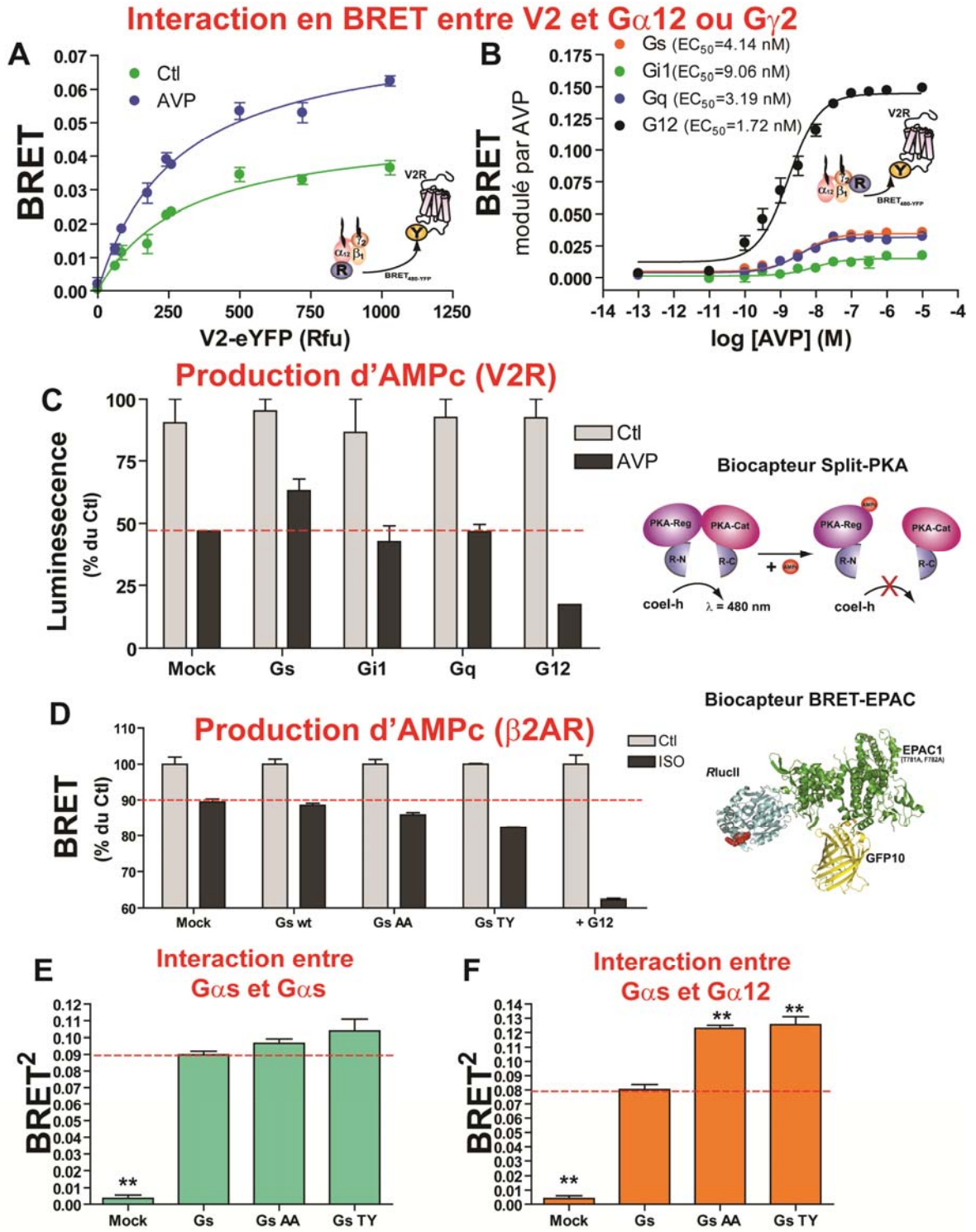


Figure 31: Interaction entre Gas et Ga12 et effet sur la signalisation d'AMPC

A) Courbe de titration de l'interaction entre le récepteur V2R et Ga12, modulée par l'AVP. **B)** Effet de la co-expression de différentes sous-unités Ga sur la modulation de l'interaction entre Gγ2 et V2R. La co-expression de Ga12 augmente la modulation du signal observée entre la sous-unité Gγ2 et V2R, comparativement aux autres Ga. **C)** Effet de la co-expression de différentes sous-unités Ga sur la production d'AMPc mesurée suite à l'activation du V2R. Le biocapteur Split-PKA a été utilisé comme rapporteur de la concentration d'AMPc intracellulaire. La co-expression de Ga12 augmente la réponse du récepteur V2 sur l'accumulation d'AMPc, comparativement aux autres Ga. **D)** Effet de la co-expression de différents mutants de Gas sur la production d'AMPc suite à l'activation du β2AR. Le biocapteur BRET-EPAC a été utilisé comme rapporteur de la concentration d'AMPc intracellulaire. La co-expression de Ga12 augmente la réponse du récepteur β2AR sur l'accumulation d'AMPc, comparativement aux autres Ga. Il est possible d'observer également que les mutations Gas AA et Gas TY provoquent une augmentation de la production d'AMPc comparativement au contrôle Ga natif. **E-F)** Effet des mutations de Gas sur l'interaction entre Gas et Gas (**E**) ou l'interaction entre Gas et Ga12 (**F**). Il est possible d'observer que les mutations dans Gas augmentent l'interaction entre Ga12 et Gas, et non entre Gas et Gas.

Des résultats non publiés obtenus au cours de cette thèse supportent l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre Gas et Ga12 pour l'activation d'effecteurs (voir Figure 31, page 245). Premièrement, Ga12 peut se lier au récepteur V2R et cette interaction est modulée par la présence d'AVP. Parallèlement, il a été observé que la co-expression de Ga12 favorise le changement de conformation de l'interaction entre Gγ2 et V2R. De plus, la co-expression de Ga12 favorise la production d'AMPc induite par le V2R, indiquant que l'augmentation de l'expression de Ga12 permet un meilleur couplage avec la voie d'AMPc. Cette production d'AMPc a été mesurée à l'aide du biocapteur Split-PKA (Stefan *et al.*, 2007), où la Rluc séparée en deux fragments est fusionnée aux sous-unités catalytiques et régulatrices de la protéine kinase A (PKA). En présence d'AMPc, les sous-unités catalytiques et régulatrices se séparent, ce qui éloigne les deux fragments de la Rluc, entraînant ainsi une diminution de bioluminescence. En parallèle, l'effet de Ga12 sur la production d'AMPc a été mesuré pour le récepteur β2AR, en utilisant le biocapteur BRET-EPAC. Comme dans le cas du récepteur V2R, la présence de Ga12 augmente la production d'AMPc induite par le β2AR. L'utilisation de deux récepteurs couplés à Gas, V2R et β2AR, et de deux biocapteurs, Split-PKA et BRET-EPAC, ont permis d'observer une augmentation de production d'AMPc par les cellules qui sur-expriment Ga12, indiquant que cette sous-unité Ga12 peut être présente dans un complexe de récepteurs actifs. Cette synergie pour la production d'AMPc entre Ga12 et des récepteurs couplés à Gas, a

préalablement été observée via un mécanisme impliquant l'adénylate cyclase de type 7 (Jiang *et al.*, 2008).

Des mutations dans la portion C-terminale de *G α s* (*G α sAA* : 375A/Y376A et *G α sTF* : V375T/Y376F) entraînent également une augmentation de la production d'AMPc (voir Figure 31, page 245). En parallèle, ces mêmes mutations permettent une augmentation d'interaction entre *G α s* et *G α 12*, sans modifier l'interaction entre *G α s* et *G α s*. Cette augmentation d'interaction entre *G α 12* et *G α s* ainsi que l'augmentation de la production d'AMPc induites par la mutation de la portion C-terminale de *G α s*, semblent indiquer que la formation d'un complexe entre *G α s* et *G α 12* influence l'activation d'effecteurs.

En plus de la formation de complexes entre différentes sous-unités *G α* , des interactions spécifiques entre différentes sous-unités *G γ* ont également été observées (voir Figure 32, page 248). Toutefois, étant donné qu'il est difficile d'attribuer des effets fonctionnels à la formation de complexes entre différentes sous-unités *G γ* dû au fait que leurs fonctions cellulaires demeurent mal connues, ces résultats ont fait l'objet de moins de recherches. Néanmoins, il n'en demeure pas moins que ces résultats suggèrent que la formation de complexes à plusieurs sous-unités soit également possible pour le dimère *G $\beta\gamma$* , en plus des sous-unités *G α* , indiquant que l'hétérotrimère complet de la protéine G pourrait être impliqué dans cette formation de complexes.

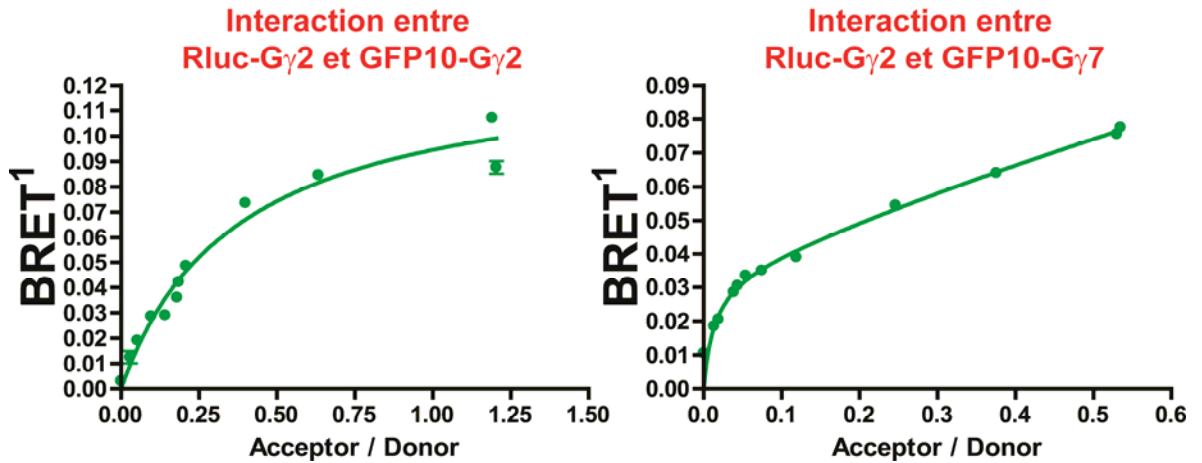


Figure 32: Interactions entre des sous-unités G γ

Courbe de titration BRET entre G γ 2 et G γ 2 ou entre G γ 2 et G γ 7. Des cellules HEK293t ont été transfectées avec une quantité constante de Rluc-G γ 2 et une quantité consente de GFP10-G γ 2 ou GFP10-G γ 7.

La formation de complexes entre différentes GTPases de même nature n'est pas unique aux protéines G hétérotrimériques. En effet, il a été rapporté dans la littérature que la petite protéine G Ras forme un dimère fonctionnel. Ce dimère de Ras, une GTPase impliquée dans l'activation des MAP-kinases en aval des récepteurs RTK, semble important pour l'activation de Raf-1, un effecteur de Ras (Inouye *et al.*, 2000). Les GTPases sont classifiées en deux grandes classes, la première et la plus étudiée comprend les GTPases de type Ras et celles de type G α de la protéine G hétérotrimérique, pour lesquelles l'activité GTPasique est régulée par des protéines GEF et de GAP. De leur côté, les membres de la seconde classe, qui comprend la dynamine, les septins et autres GTPases, n'ont pas de protéines accessoires GEF ou GAP qui régulent leur activité GTPasique. L'homodimérisation de ces GTPases semble plutôt gouverner leur activation par le contrôle de leur activité GTPasique (Gasper *et al.*, 2009).

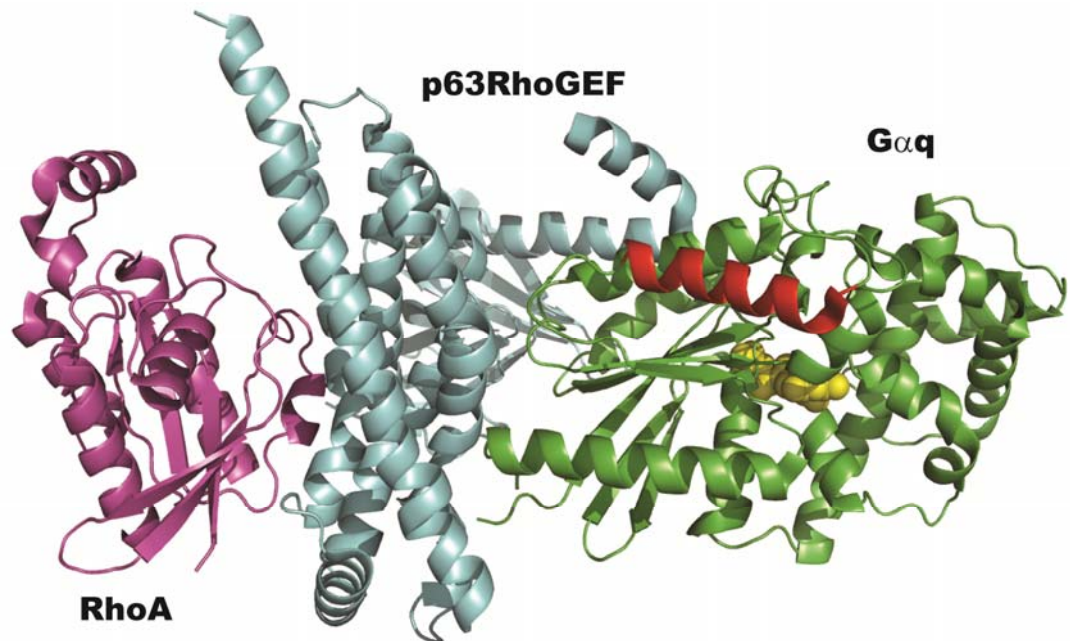


Figure 33: Complexes entre Gaq-p63RhoGEF-RhoA

En vert la sous-unité Gaq, en cyan p63RhoGEF, en rose RhoA et en rouge l'hélice $\alpha 4$ de Gaq. Image produite avec PyMOL avec le PDB : 2RNG

En plus de ces exemples d'homodimérisation entre GTPases, il est possible de retrouver dans la littérature plusieurs exemples de formation de complexes entre GTPases, comprenant des sous-unités $G\alpha$ impliquées dans le contrôle des activités de ces complexes. Les sous-unités $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha i}$ forment des complexes avec la tubuline, une GTPase impliquée dans la réorganisation des microtubules (Wang *et al.*, 1990). L'interaction de $G_{\alpha i}$ avec le dimère de tubuline influence l'activité de polymérisation des microtubules, suggérant un mécanisme d'action, expliquant en partie, l'influence des RCPG sur le remodelage du cytosquelette (Wang et Rasenick, 1991). Ces interactions $G\alpha$ -tubuline démontrent l'influence directe des $G\alpha$ sur l'activité d'autres GTPases. Il existe également des cas où les $G\alpha$ influencent l'activité de GTPases indirectement, via la formation de complexes avec une protéine GEF. Les sous-unités $G_{\alpha 12/13}$ (Sah *et al.*, 2000), ainsi que $G_{\alpha q}$ (voir Figure

33, page 249)(Lutz *et al.*, 2005) favorisent l'activation de RhoA en formant des complexes avec des RhoGEF.

L'homodimérisation des GTPases, l'interaction directe entre $G\alpha$ et diverses GTPases, ainsi que l'activation indirecte de certaines GTPases par des $G\alpha$, sont autant d'exemples biochimiques et physiologiques de contrôle de l'activité GTPase par la formation de complexes à plusieurs GTPases, permettant d'affirmer que les sous-unités $G\alpha$ peuvent agir de concert pour moduler l'activité de certains effecteurs. Non seulement ces évidences biochimiques démontrent la formation de complexes comprenant plusieurs GTPases, mais ces complexes peuvent également être visualisés à partir de l'analyse des données cristallographiques obtenues sur certaines GTPases.

Structure des interactions entre les GTPases

Dans le but de déterminer les déterminants moléculaires de la sélectivité d'interaction entre les $G\alpha$ observée dans les essais BRET, un alignement des séquences en acides aminés d'un membre prototypique de chacune des quatre grandes sous familles de $G\alpha$ a été effectué avec un logiciel d'alignement de séquence, M-Coffee (Moretti *et al.*, 2007), qui tient compte de la structure tridimensionnelle des protéines (voir article 3 figure supplémentaire 2). Bien que les sous-unités $G\alpha$ soient très similaires, deux régions plus variables ont été observées suite à l'alignement des séquences de $G\alpha$. La première région située dans la portion N-terminale des $G\alpha$ est à proximité de la région d'interaction soit avec $G\beta\gamma$, les RGS et les effecteurs (Cherfils et Chabre, 2003; Slep *et al.*, 2001; Tesmer *et al.*, 1997a). Comme les sous-unités $G\alpha$ n'ont pas tous les mêmes régulateurs et effecteurs, il est normal que cette région apparaisse plus variable, démontrant en même temps la validité de l'utilisation du logiciel M-Coffee pour trouver des régions variables, même au sein de

protéines très similaires. La deuxième région variable (l'hélice $\alpha 4$) est située dans la portion C-terminale, du côté GTPasique de la structure de $G\alpha$, et semble être la région de sélectivité pour la formation de complexes entre les $G\alpha$. En permutant une portion de l'hélice $\alpha 4$ provenant de $G\alpha 12$ dans la sous-unité $G\alpha 1$, deux protéines $G\alpha$ qui n'interagissent pas normalement ensemble, il a été possible de récupérer une interaction entre la protéine $G\alpha 1/12$ chimérique et la protéine $G\alpha 1$ native, démontrant ainsi l'importance de cette région pour la formation et la sélectivité des complexes entre les sous-unités $G\alpha$.

Cette hélice $\alpha 4$ a préalablement été montrée comme important pour l'activation des effecteurs (Berlot et Bourne, 1992). Dans le cadre de cette étude, les auteurs ont réalisé différentes chimères entre une sous-unité $G\alpha 2$ constitutivement active et $G\alpha s$ en introduisant des portions de $G\alpha s$ dans $G\alpha 2$. L'expression de ces différentes chimères en cellule ont permis de révéler que certaines portions de $G\alpha s$ greffées permettaient une accumulation de l'AMPc, démontrant l'importance de ces régions de $G\alpha s$ dans l'activation d'adénylyl cyclase effecteur principale de $G\alpha s$. Ultérieurement, au co-cristalle entre le domaine de liaison à $G\alpha s$ des adénylyl cyclases et $G\alpha s$ sous forme active ($GTP\gamma s$) a révélé que l'interaction entre $G\alpha s$ et son effecteur se produisait plutôt via l'hélice $\alpha 3$ située à l'opposé de l'hélice $\alpha 4$ dans la structure tridimensionnelle (voir Figure 34 page 252) (Tesmer *et al.*, 1997b). Cette interaction avec l'hélice $\alpha 3$ de la cyclase ouvre la porte à des nouvelles hypothèses expliquant le rôle de l'hélice $\alpha 4$ dans l'activation des effecteurs.

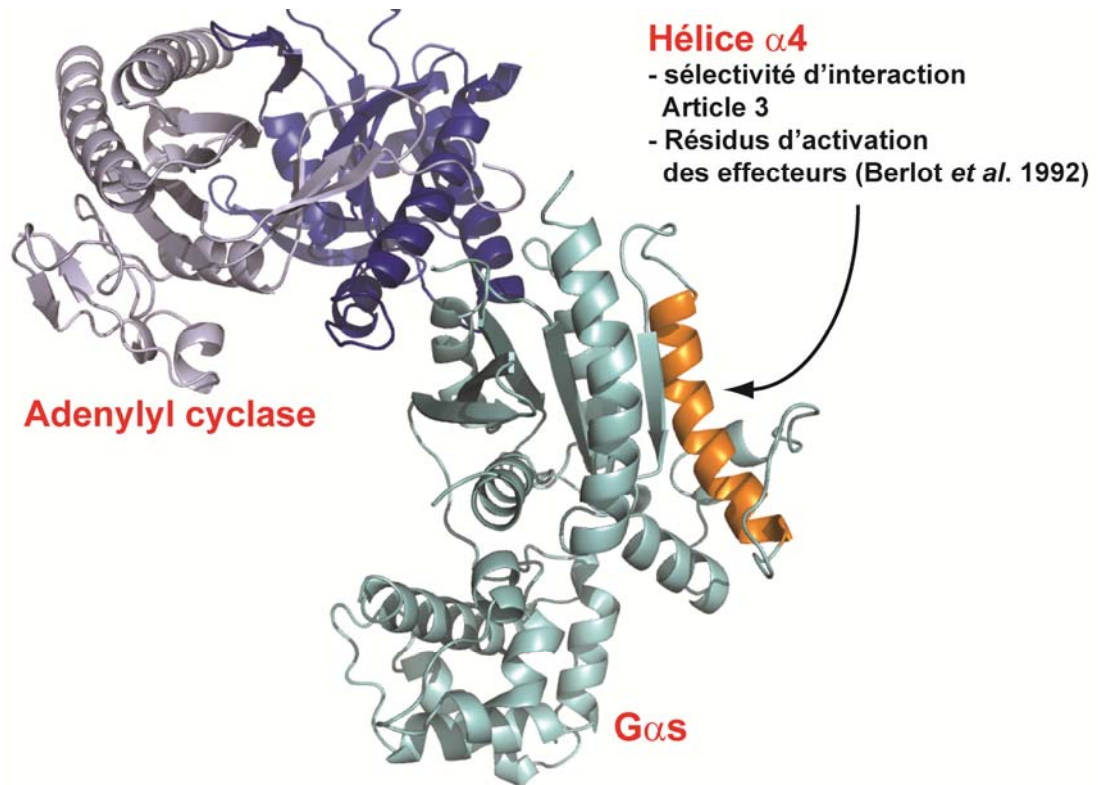


Figure 34: Interaction entre G α s et l'adenylyl cyclase

G α s est représenté en bleu claire, en bleu foncé et lilas les domaines d'interaction à G α s de l'adenylyl cyclase et en orange l'hélice $\alpha 4$. Images produites avec PyMOL le PDB : 1AZS

Cette hélice $\alpha 4$ a également été démontrée comme étant importante pour l'interaction et l'activation des G α par le récepteur rhodopsine (Garcia *et al.*, 1995). Cette hélice $\alpha 4$, qui est située à l'opposé du site d'interaction avec le dimère G $\beta\gamma$, étant importante pour l'interaction avec les récepteurs, la dimérisation des G α pourrait offrir une surface d'interaction pour les récepteurs, dans le cas d'une interaction directe entre les sous-unités G α . Par opposition, la dimérisation des récepteurs pourrait forcer le rapprochement des sous-unités G α indirectement. Dans les deux cas, interaction directe ou formation de complexes via la dimérisation les récepteurs, cette région demeure importante pour le rapprochement sélectif des G α .

Afin de déterminer si cette hélice α_4 est responsable de l'interaction directe ou indirecte entre les $G\alpha$, les structures cristallographiques ont alors été étudiées dans le but de rechercher des évidences d'interactions entre les sous-unités $G\alpha$. En premier lieu, cette région responsable de la spécificité d'interaction entre les sous-unités $G\alpha$ est caractérisée par une hélice α (hélice α_4) localisée à la surface de la protéine, et semble disponible pour des interactions (voir Figure 35, page 254). Cette hélice α_4 de $G\alpha_i$, en rouge dans la figure, est conservée chez les autres GTPases de la famille Ras, comme indiqué en rouge pour N-Ras ainsi qu'en rouge et en gris pour RhoA, à la figure 30. Cette conservation peut indiquer un rôle similaire pour cette région dans les deux types de GTPase (Ras et $G\alpha$ de la protéine G). Le groupe du Dr. Hakoshima a réalisé la co-cristallisation de RhoA avec une protéine accessoire RhoGDI, à l'état actif fixé au GTP (Ihara *et al.*, 1998). Un dimère de protéine RhoGDI a ainsi été observé, qui oriente les deux protomères de RhoA l'un face à l'autre, pour former une interface d'interaction (voir Figure 35, page 254). Les hélices α de chacun des protomères ont été colorées en gris et en rouge respectivement, pour faire ressortir la position relative de ces hélices similaires aux hélices α responsables de la sélectivité d'interaction des $G\alpha$. Une surface d'interaction entre les deux protomères semble définie par l'hélice α , suivie d'un brin de feuillet β , et finalement d'une deuxième hélice α correspondant aux derniers acides aminés du côté C-terminal de RhoA et des $G\alpha$. Ce co-cristal de dimère de RhoA montre la possibilité d'interactions directes entre des GTPases, ainsi qu'une surface d'interaction entre les protomères incluant la région correspondante à la région de sélectivité d'interaction de $G\alpha$.

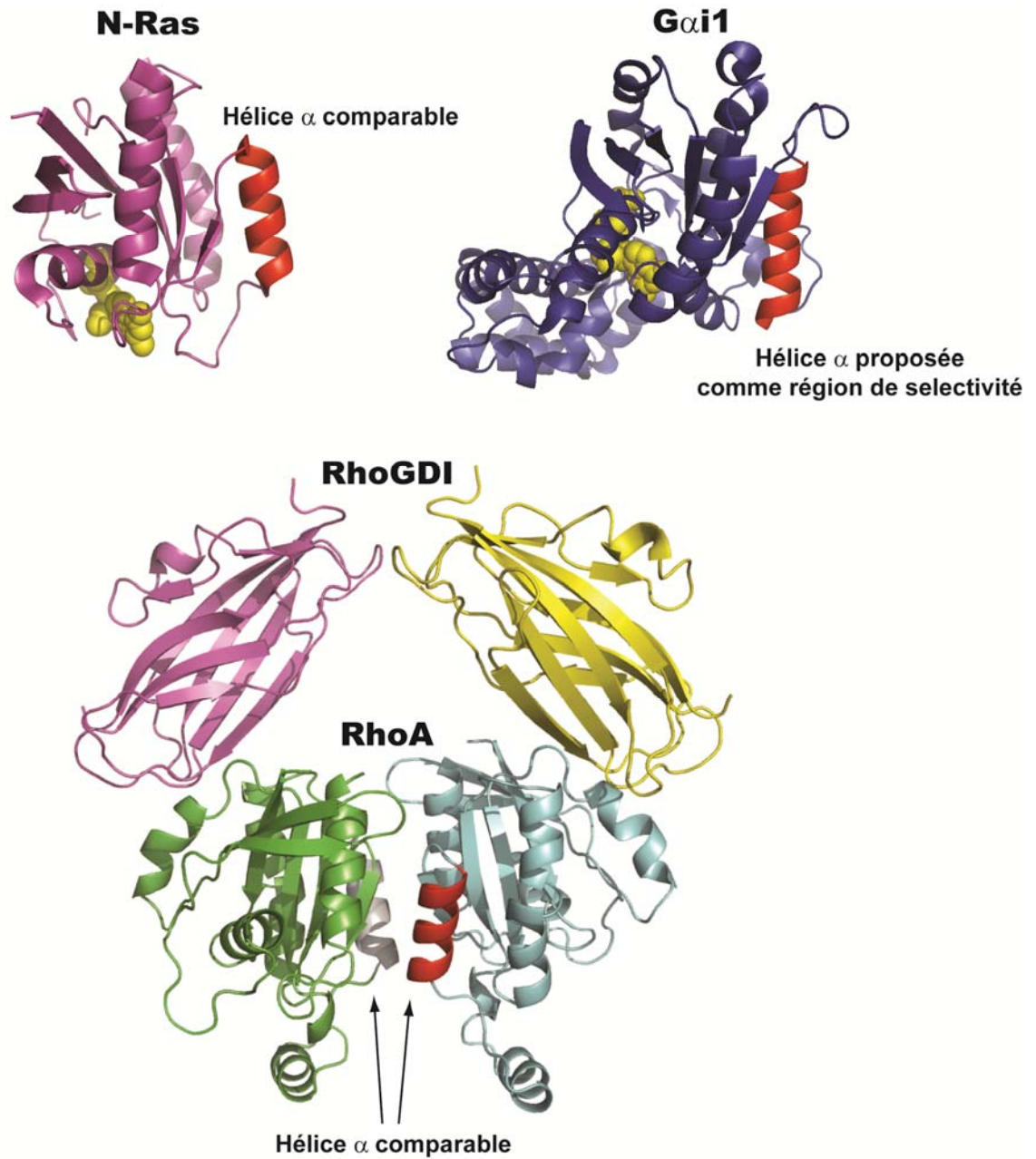


Figure 35: Structure des différentes GTPases

N-Ras (3CON), G α i1 (2GTP) et RhoA (1CC0). Images produites avec PyMOL

Afin d'étendre ces observations concernant la surface d'interaction entre les GTPase pour les $G\alpha$, des cristaux de différentes $G\alpha$ ont été analysés en recherchant des interactions possibles entre deux protomères. Deux cristaux intéressants ont démontré des interactions entre deux $G\alpha$ de même nature, $G\alpha_s$ et $G\alpha_i1$, qui semblent inclure le site de sélectivité retrouvé suite à l'analyse des séquences en d'acides aminés de $G\alpha$ (voir Figure 36, page 255). Tout comme dans le cas de RhoA, le domaine d'interaction est composé de l'hélice α de la sélectivité d'interaction, suivi d'un brin de feuillet β et finalement d'une deuxième hélice α du C-terminal de la protéine. Ces observations réalisées à partir de différents cristaux produits par des groupes distincts utilisant des conditions expérimentales différentes, renforcent l'idée d'une interaction directe possible entre les $G\alpha$. Par contre, ces observations ne permettent pas d'exclure la possibilité que ces proximités entre $G\alpha$ soient la conséquence d'une orientation favorable à cette proximité du à l'interaction des $G\alpha$ à d'autres protéines dans un complexe macromoléculaire. Par conséquent, dans certaines conditions cellulaires, les sous-unités $G\alpha$ pourraient être monomériques et leurs interactions avec des récepteurs ou d'autres protéines pourraient contrôler leurs rapprochements sous forme de complexes.

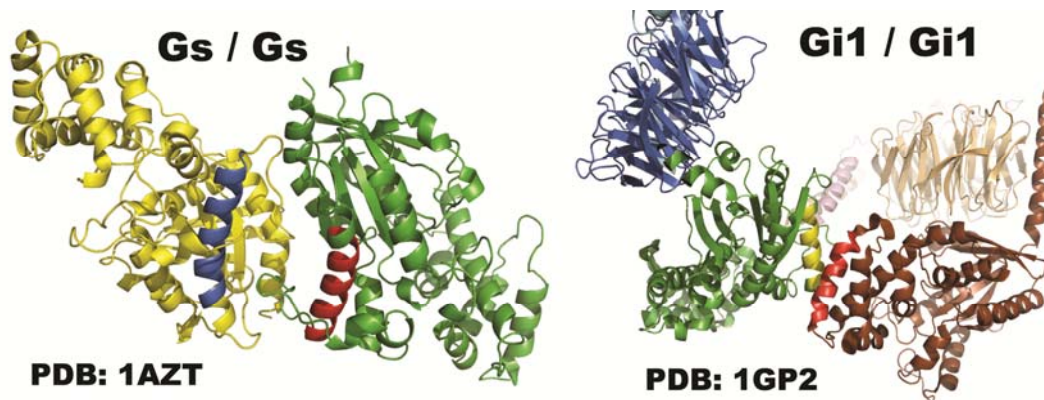


Figure 36: Dimères des $G\alpha$ et site de sélectivité.

La protéine AGS3 régulant l'activité des sous-unités *Gai* en l'absence de stimulation par les RCPG, possède quatre sites d'interaction avec les *Gai*, appelés domaines GPR (Peterson *et al.*, 2000). En utilisant la technique de BRET, il a été possible de mesurer l'interaction entre AGS3 et *Gai1*, ainsi que l'influence de chacun des quatre domaines d'interactions GPR sur cette association (voir Figure 37, page 257) (Oner *et al.*, 2010) Le signal BRET mesuré entre AGS3 et *Gai1* est dépendant du nombre de domaines GPR fonctionnels. En effet, ce signal de BRET diminue en fonction du nombre de domaines GPR non fonctionnels, pour finalement disparaître complètement suite à la mutation de trois domaines GPR ou plus. AGS3 n'est plus en mesure d'interagir avec *Gai* lorsqu'il lui reste uniquement un domaine GPR fonctionnel, ce qui semble indiquer que AGS3 a besoin de la présence d'un minimum de deux sous-unités *Gai* afin d'interagir de façon efficace avec cette sous-unité de la protéine G. En parallèle, il a été montré dans l'article 3 figure 5 que la surexpression d'AGS3 augmente sélectivement l'interaction entre deux protéines *Gai*. Ces résultats indiquent que plusieurs *Gα* ont la capacité de lier la protéine AGS3 en même temps, donc de former des complexes comprenant plusieurs *Gα*. Ces observations confirment la possibilité de retrouver deux *Gα* en interaction, et ouvrent la porte aux complexes comprenant plusieurs *Gα*. Par contre, il est impossible de conclure si les interactions observées sont directes ou indirectes.

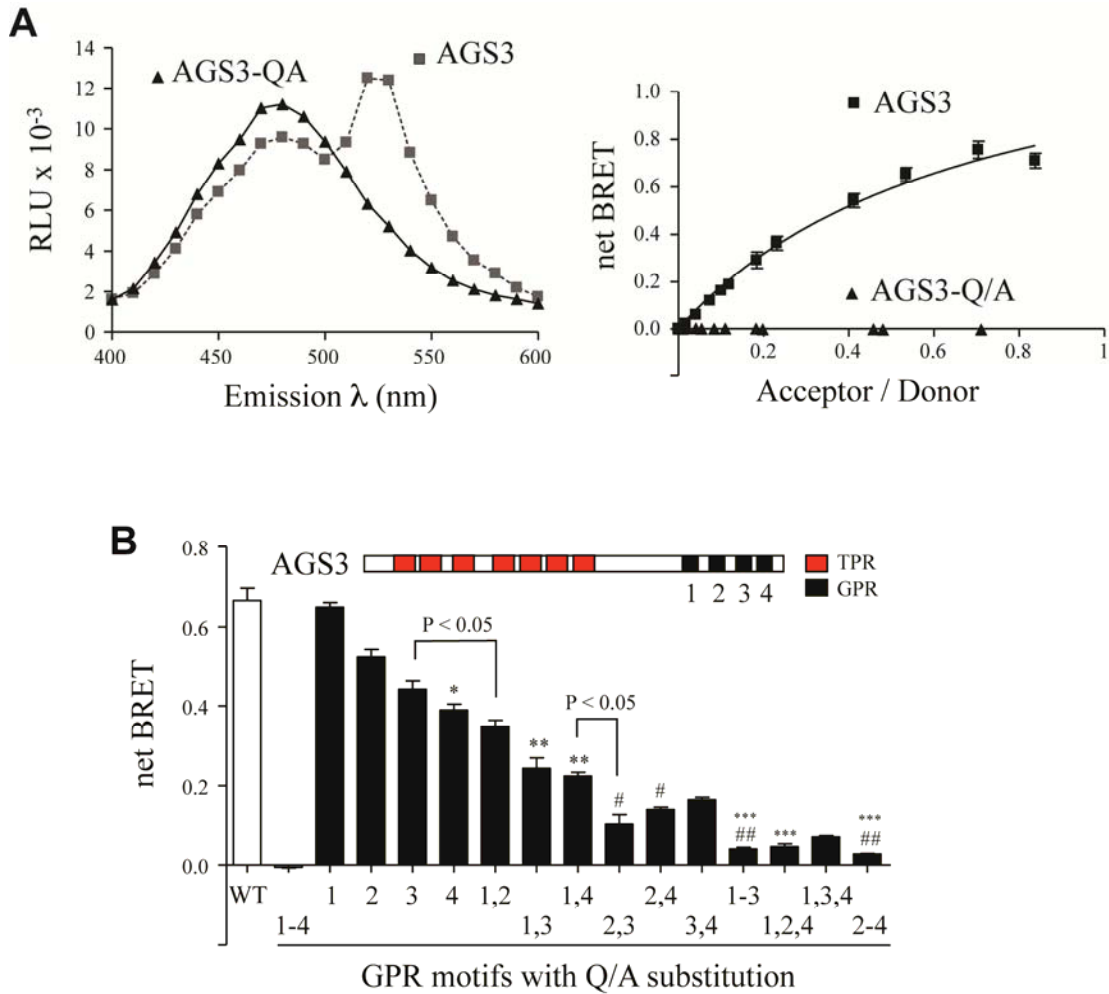


Figure 37: Interaction entre AGS3 et G*ai*

A) Comparaison de l'interaction avec G*ai*1 de AGS3 et du mutant AGS3-Q/A, où les 4 domaines GPR, sites d'interaction à G*ai*, ont été mutés. **B)** Mesure de l'interaction entre G*ai*1 et les mutations individuelles de chacun des domaines GPR ou en combinaison. Ces résultats montrent que la mutation des 4 domaines ainsi que la mutation de 3 domaines GPR aboli totalement l'interaction entre AGS3 et G*ai*1. Résultats obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Steve Lanier (Oner *et al.*, 2010).

Au cours de la dernière année, un groupe a publié des résultats de co-cristallisation d'ARF6, une GTPase impliquée dans le remodelage du cytosquelette et la migration cellulaire, avec une protéine d'échafaudage Jip4 (voir Figure 38, page 258) (Isabet *et al.*, 2009). L'analyse de ce co-cristal permet d'observer la présence d'une interaction directe

entre deux ARF6, ainsi qu'une interaction indirecte avec un troisième protomère d'ARF6 via la protéine Jip4, démontrant ainsi la double possibilité d'interaction entre deux GTPases. De plus, dans le cas de l'interaction directe, il est possible d'observer que tout comme pour le dimère RhoA, l'hélice α correspondante à l'hélice α de sélectivité des $G\alpha$ est impliquée dans la formation de l'interaction directe entre les deux ARF6, démontrant à nouveau l'importance de cette hélice α dans la formation de complexes GTPasiques.

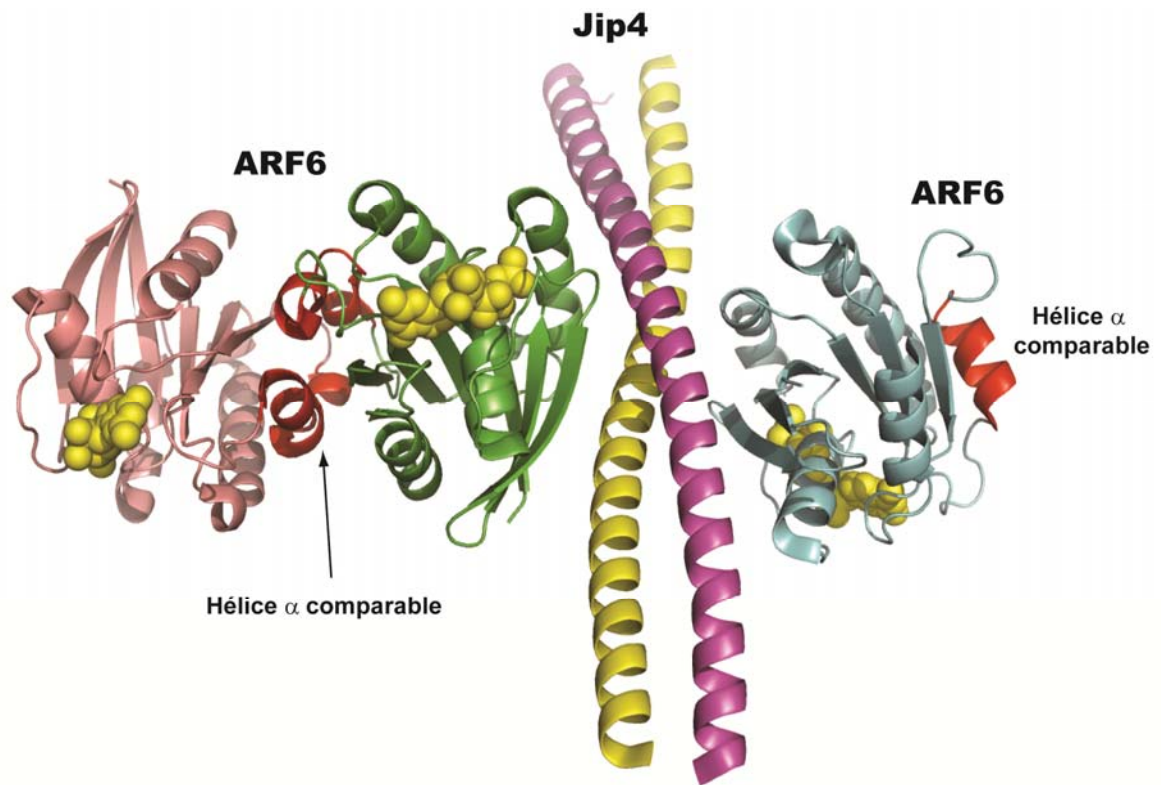


Figure 38: Structure du complexe ARF6/Jip4

En rose, vert et bleu trois protomères de ARF6 et en jaune et rose foncé deux protomères de Jip4. Coloré en rouge les hélices α de ARF6 qui correspond à l'hélice $\alpha 4$ des protéines $G\alpha$ (PDB : 2W83. Images produites avec PyMOL.

Afin de démontrer la possibilité de retrouver deux $G\alpha$ sous un dimère de récepteur, une superposition de différents cristaux a été effectuée à l'aide des cristaux individuel et

superposer avec le logiciel de PyMol voir Figure 39, page 260). Le récepteur opsine a été cristallographié sous forme de dimère à l'état inactif (PDB, 3CAP), et monomérique à l'état actif en interaction avec un peptide de la portion C-terminale de Gat sous forme active (PDB, 3DQB). Dans un premier temps, une superposition des monomères du dimère d'opsine avec deux monomères d'opsine/C-terminal Gat a été réalisée. Par la suite, deux protéines G hétérotrimériques, Gat/G $\beta\gamma$ t, (PDB, 1GOT) ont été positionnées en fonction du peptide Gat (marqué en rouge dans la Figure 39) de chacun des monomères d'opsine/C-terminal. La superposition des ces différents cristaux montre la possibilité de retrouver deux G α sous le même dimère de récepteur. De plus, dans cette configuration, les hélices α de sélectivité, décrites plus tôt, de chacune des deux sous-unités G α (en orange à la Figure 39, page 260) se font face, validant ainsi la position de cette hélice α dans l'interface d'interaction entre les G α , et démontrant également la pertinence de cette approche de superposition de cristaux pour valider les résultats expérimentaux. Que ce soit des interactions directes ou indirectes entre différentes GTPases, il semble évident que cette notion de complexes comprenant plusieurs GTPases représente un modèle attrayant pour expliquer la complexité de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.

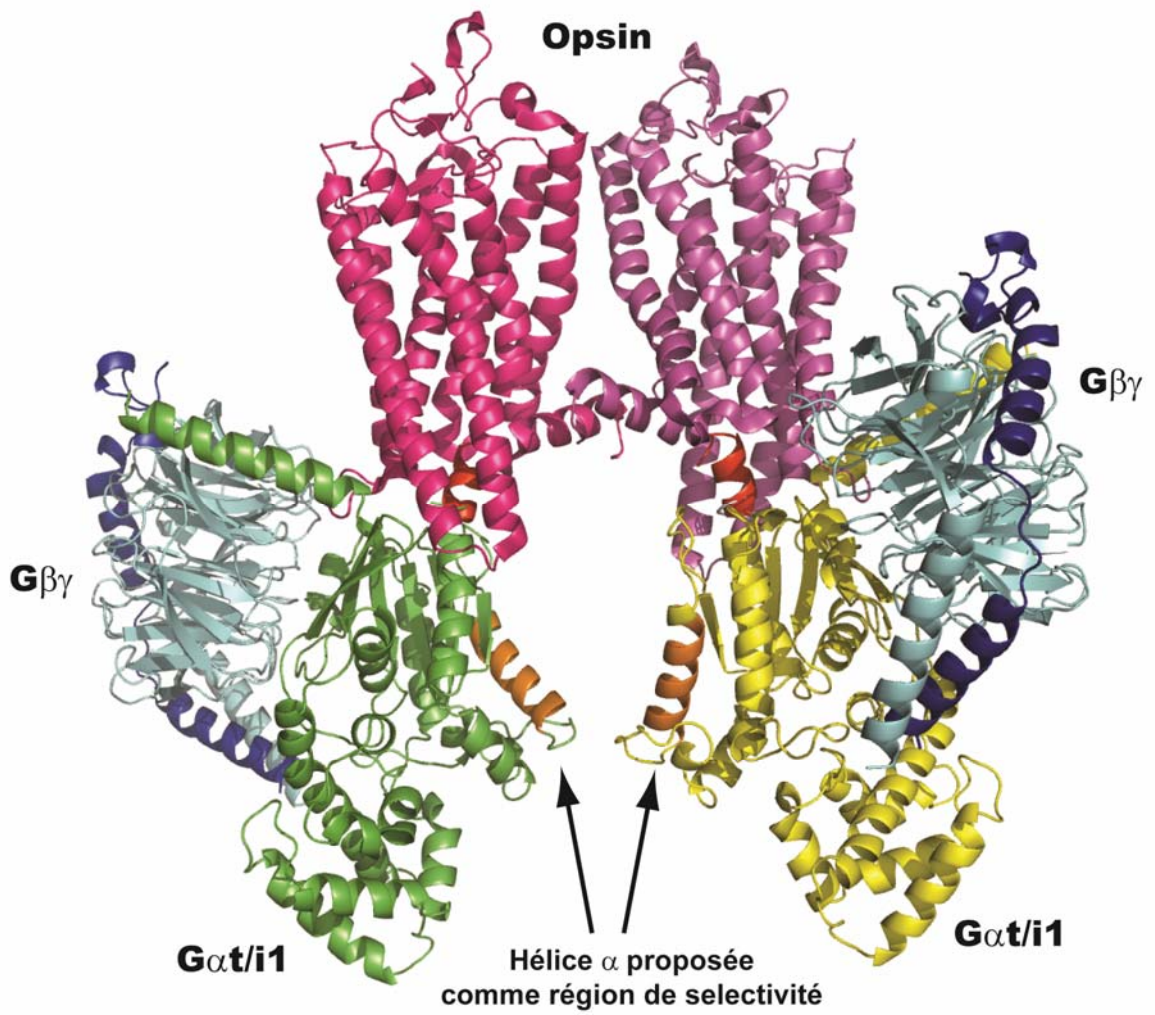


Figure 39: Schéma de dimère de RCPG avec la protéine G

En rose et mauve deux protomères récepteur opsine co-cristallisé avec la portion C-terminal de Gat (5 dernier acide aminés, PDB : 3DQB). En bleu claire et bleu foncé le dimère G β γ et en jaune et vert protomère de Gat/i (PDB : 1GOT). En orange les hélices α 4 de sélectivité. Cette image a été générée via la superposition du co-cristal d'opsine/Gat sur le dimère de récepteur opsine (PDB : 3CAP). Par la suite les acides aminés de la partie C-terminal de Gat/i (PDB : 1GOT) ont été alignés sur leurs correspondant dans le co-cristal d'opsine/Gat (PDB : 3DQB). Images produites avec PyMOL.

Dimérisation des récepteurs et activation asymétrique

La dimérisation des récepteurs est une notion de plus en plus acceptée dans la communauté scientifique, notamment grâce à quelques exemples de récepteurs actifs uniquement sous forme dimériques tel que le récepteur métabotrope du GABA (GABA_B) qui nécessite la formation d'un hétérodimère entre les monomères GBR1 et GBR2 pour atteindre la surface cellulaire et être actif (voir Figure 4, page 10) (Kaupmann *et al.*, 1998; Pin *et al.*, 2004). Cette hétérodimérisation permet la localisation appropriée du complexe, ainsi que le couplage fonctionnel à la protéine G. Par ailleurs, dans certains cas, la dimérisation peut également permettre aux récepteurs impliqués de changer de type de couplage à la protéine G. Dans le cas des récepteurs à la dopamine D1 et D2 couplés respectivement à la protéine G_{αs} et G_{αi}, la formation d'un hétérodimère D1/D2 provoque la mobilisation des réserves de calcium intracellulaire via un nouveau couplage à la protéine G_{αq} (Hasbi *et al.*, 2009). Dans les conditions du groupe du Dr. George, seul le blocage par l'inhibiteur YM254890 sélectif pour G_{αq} permet de réduire la mobilisation du calcium, excluant l'implication des voies dépendantes de G_{αs} et G_{αi} pour cette mobilisation. Il a aussi été démontré que MOR et DOR, récepteurs normalement couplés G_{αi}, interagissent ensemble, et ainsi permettent la mobilisation du calcium intracellulaire via G_{αq}. Contrairement au dimère D1/D2, la PTX bloque la mobilisation du calcium, démontrant l'importance de l'activation de G_{αi} dans cette mobilisation. Dans l'article 3, un phénomène similaire a été observé, où le récepteur DOR requiert l'activation de G_{αi} et la présence de G_{αq} pour la mobilisation du calcium. Il n'est donc pas exclu que dans le cas des récepteurs D1/D2, la présence d'une autre protéine G_α dans le complexe soit essentielle à la mobilisation du calcium. Comme l'interaction G_{αs}/G_{αi} n'a pas été détectée par BRET dans le cadre de l'article 3, il est possible que la formation de l'hétérodimère D1/D2 engage un autre complexe impliquant G_{αs}/G_{αq} ou

Gai/Gaq, mais l'absence d'effet de la PTX favorise davantage l'hypothèse d'un complexe D1/D2 avec Gas/Gaq.

En parallèle à ces observations de sélectivité fonctionnelle via l'hétérodimérisation des récepteurs, il a été démontré dans la littérature que dans le cas des récepteurs au glutamate, seul un protomère du dimère de récepteurs peut atteindre la conformation active à la fois (Goudet *et al.*, 2005). Cette asymétrie est également observée pour le récepteur BLT1, où seul un protomère peut atteindre l'état actif dans des conditions *in vitro* en présence de protéines G hétérotrimériques (Damian *et al.*, 2006). À l'opposé, en l'absence de protéines G, tous les protomères subissent les mêmes changements de conformation au sein du dimère de récepteurs, par conséquent la présence de la protéine G semble être le moteur de cette asymétrie fonctionnelle. Il est connu depuis plusieurs années que l'engagement de la protéine G induit la présence de sites de hautes affinités des récepteurs pour leurs agonistes (Bennett, 1982). Plus récemment, avec la co-cristallisation du récepteur opsine à l'état actif avec un peptide de la portion C-terminale de Gat (Scheerer *et al.*, 2008), il a été démontré que ces derniers acides aminés de la protéine G participent directement aux changements de conformation des récepteurs. Il est donc possible d'imaginer que l'apparition des sites de hautes affinités pour les agonistes soit induite par cette entrée du C-terminal de Ga dans la structure du récepteur.

Le groupe du Dr. Javitch a démontré, en utilisant la reconstitution du signal à partir de deux récepteurs non fonctionnels, que l'encombrement stérique sous un récepteur influence l'activation des protéines G (Han *et al.*, 2009), et ainsi l'asymétrie créée par la présence de deux récepteurs différents permet une nouvelle signalisation. Ils ont utilisé le calcium comme mesure d'activité pour le récepteur D2 qui n'est pas normalement couplé à cette voie, avec des récepteurs D2 directement fusionnés à une protéine chimérique Gaq15 pour permettre l'activation de la voie calcique. Lorsque fusionnée directement au récepteur, la protéine Gaq15 semble incapable de signaler. Par contre, suite à la co-expression du

récepteur D2 sauvage (incapable de signaler via le calcium) et de la protéine de fusion D2-Gαq_{i5}, une mobilisation du calcium est observée (Han *et al.*, 2009). Ces résultats sont expliqués par la présentation et l'activation de Gαq_{i5}, provenant du récepteur D2 fusionné, aux récepteurs D2 sauvages présents dans le même dimère. En introduisant un bras espaceur entre le récepteur et la Gαq_{i5}, les chercheurs ont été en mesure de suivre une mobilisation de calcium en l'absence de co-expression de récepteurs D2 natifs. Ces résultats indiquent que la fusion de Gαq_{i5} directement au récepteur n'est pas accessible pour être directement activée par le récepteur auquel elle est fusionnée. Toutefois, un récepteur D2 natif situé à proximité de cette protéine de fusion est en mesure d'utiliser la protéine Gαq_{i5}. Au niveau de la protéine de fusion, la présence d'un bras espaceur plus long entre le récepteur et la Gαq_{i5} permet alors au récepteur fusionné d'activer directement sa protéine Gα.

En parallèle, ils ont démontré que l'addition d'une mutation dans Gαq (G208A), connue pour inhiber l'activité d'échange du GDP/GTP, au niveau de la protéine de fusion D2-L-Gαq_{i5} (L=bras espaceur) élimine la réponse calcique (Han *et al.*, 2009). Par contre, la co-transfection de Gαq_{i5} non fusionnée permet non seulement de retrouver la signalisation calcique de la protéine de fusion D2-L-Gαq_{i5}-G208A, mais potentialise cette réponse en comparaison aux conditions contrôles. Ces résultats indiquent que la présence de plusieurs protéines Gα dans un complexe de récepteurs est possible et qu'une asymétrie fonctionnelle, soit au niveau des récepteurs (D2 wt avec D2-Gαq_{i5}, soit Gαq_{i5} non fusionnée) ou soit au niveau des protéine G (Gαq_{i5}-G208A avec Gαq_{i5}), semble requise pour induire une signalisation calcique maximum.

L'asymétrie fonctionnelle a également été mesurée par l'utilisation de dimères de récepteurs où un seul protomère est constitutivement actif ou inhibé par un agoniste inverse pour l'activation sur la voie calcique (Han *et al.*, 2009). Dans le cas où un seul récepteur est constitutivement actif, l'activation par un agoniste produit une réponse moindre

comparativement à la condition contrôle avec deux récepteurs D2 natifs. Par opposition, la présence dans le dimère d'un récepteur liant un agoniste inverse, produit une réponse plus importante que la condition contrôle avec deux récepteurs natifs. L'asymétrie créée par la présence de l'agoniste inverse permet une meilleure signalisation ou une diminution de l'inhibition de la réponse. Cette asymétrie fonctionnelle a également été mise à jour pour les récepteur du glutamate (Goudet *et al.*, 2005). Par opposition, il a été montré que l'activation des deux protomères au sein d'un dimère de récepteur est importante pour le recrutement de la β -arrestine dans le cas du récepteur muscarinique M3 (Novi *et al.*, 2005). Le recrutement la β -arrestine suite à la phosphorylation par les GRK est connu pour être impliqué dans l'arrêt et la désensibilisation de la signalisation des RCPG (Lohse *et al.*, 1990). Alors, la symétrie d'activation des monomères au sein d'un dimère permettrait d'engager le système d'arrêt plus efficacement, ce qui diminue la réponse du dimère.

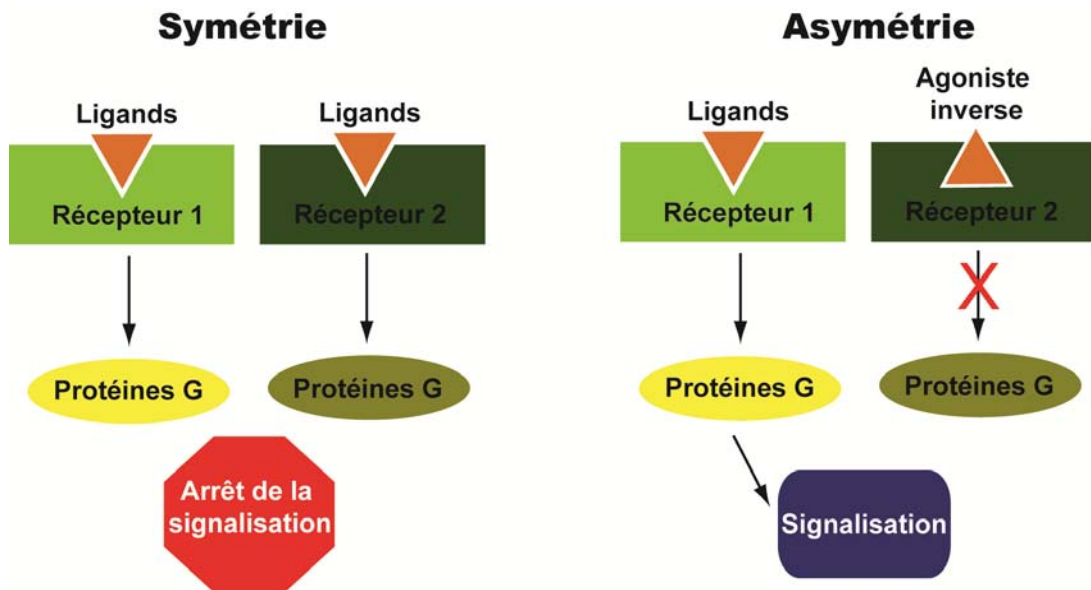


Figure 40: Asymétrie vs symétrie d'activation d'un dimère de récepteur

Étant donné que la présence de $G\alpha$ est essentielle pour l'asymétrie des dimères de récepteurs et que la conformation des récepteurs est influencée par la présence du C-terminal de $G\alpha$, la nature des protéines G interagissant avec les récepteurs va donc avoir une influence sur l'asymétrie. Dans le cas du récepteur DOR où uniquement $G\alpha i1$ semble être activé par le récepteur, une asymétrie a pu être créée par la présence de $G\alpha q$ dans le complexe, ainsi dans le cas de récepteurs homodimériques, cette asymétrie pourrait être définie par le type de complexes de protéines $G\alpha$ recruté.

Conclusions

Au cours de cette thèse, deux aspects très différents, mais intimement liés ont été traités, soit le développement technologique pour l'étude d'interactions protéine-protéine à multiples partenaires, et l'étude de la formation de complexes impliqués dans la signalisation des RCPG. La mise au point de nouvelles couleurs de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) (BRET₄₀₀-BFP, BRET₄₀₀-CFP et BRET₄₀₀-mAmetrine), ainsi que de l'utilisation combinatoire du BRET₄₀₀-GFP (aussi appelé BRET²) et du BRET₄₈₀-YFP (BRET¹) ont permis de suivre la formation de complexes à plusieurs protéines dans un cadre cellulaire pour la première fois, démontrant l'importance du développement technologique pour l'étude de questions biologiques.

Grâce à ces nouvelles méthodes d'étude de complexes à plusieurs partenaires, ainsi qu'à la mesure plus sensible de la mobilisation du calcium obtenue avec l'obelin, il a été possible de démontrer l'importance des sous-unités G α i et G α q dans la signalisation calcique du récepteur DOR. L'inhibition de l'activité de G α i par la toxine PTX bloque toute mobilisation du calcium, montrant l'importance de l'activation de G α i par le DOR pour cette signalisation. En revanche, la présence de G α q dans le complexe semble important pour permettre cette signalisation calcique, probablement en induisant l'entrée d'effecteurs spécifiques dans le complexe à l'état lié par le GDP (dite inactives).

L'utilisation combinatoire du BRET₄₀₀-GFP et du BRET₄₈₀-YFP a permis de démontrer pour la première fois la formation d'un complexe comprenant plusieurs protéines régulatrices des RCPG en même temps. Il a été possible de mesurer l'interaction entre GRK2 et la β -arrestine suite à la stimulation d'un RCPG, ouvrant des questions sur les fonctions biologiques de la formation de ce complexe récepteur/GRK/arrestine, sur l'asymétrie de l'activation des récepteurs au sein d'un dimère, ainsi que sur le rôle de chacun dans la sélectivité de la signalisation. De plus, l'entrée de GRK2 dans le complexe récepteur/

protéine G permet une réorganisation conformationnelle de l'hétérotrimère $G\alpha/G\beta\gamma$, favorisant la désensibilisation phosphorylation indépendante.

Certains résultats dans la littérature indiquent que la nature des protéines G peut influencer le recrutement des protéines régulatrices, et comme $G\alpha_q$ est la seule des sous-unités $G\alpha$ interagissant avec les GRK2/3 et que la sous-unité $G\beta$ semble influencer le type de GRK recrutés, les complexes hétérotrimériques de protéines G sont donc importants non seulement pour la signalisation des récepteurs, mais ils jouent également un rôle clé pour déterminer le type de protéines régulatrices recrutées aux récepteurs, influençant ainsi cette signalisation. La formation de complexes protéines G/récepteur semble impliquer plusieurs sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de natures identiques ou différentes, expliquant une partie de la complexité de signalisation engendrée par les RCPG. De plus, l'activation de toutes les protéines G ne semble pas nécessaire pour l'action des récepteurs, mais pourrait influencer la signalisation par le biais d'interactions avec diverses protéines effectrices ou régulatrices. Par conséquent, le concept de complexes à multi-protéines G pourrait permettre d'expliquer plusieurs phénomènes biologiques observés, notamment les effets sur la dépendance/indépendance de certains RCPG aux protéines G, sur l'asymétrie d'activation des récepteurs au sein d'un dimère, et les effets différentiels des ligands sur les mêmes types de récepteurs (ligand biased signalling).

Bibliographie

- AbdAlla S, Lothar H and Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**(6800):94-98.
- Abel A, Wittau N, Wieland T, Schultz G and Kalkbrenner F (2000) Cell cycle-dependent coupling of the vasopressin V1a receptor to different G proteins. *J Biol Chem* **275**(42):32543-32551.
- Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* **153**(3):586-600.
- Ahlstrom M and Lamberg-Allardt C (1997) Rapid protein kinase A--mediated activation of cyclic AMP-phosphodiesterase by parathyroid hormone in UMR-106 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **12**(2):172-178.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairret 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**(7):3684-3689.
- Aragay AM, Mellado M, Frade JM, Martin AM, Jimenez-Sainz MC, Martinez AC and Mayor F, Jr. (1998) Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6):2985-2990.
- Artemyev NO, Rarick HM, Mills JS, Skiba NP and Hamm HE (1992) Sites of interaction between rod G-protein alpha-subunit and cGMP-phosphodiesterase gamma-subunit. Implications for the phosphodiesterase activation mechanism. *J Biol Chem* **267**(35):25067-25072.
- Ashley CC, Griffiths PJ, Moisescu DG and Rose RM (1975) A method for injecting aequorin into large muscle fibres using a micropipette. *J Physiol* **245**(2):11P-12P.
- Beazely MA and Watts VJ (2005) Galphaq-coupled receptor signaling enhances adenylate cyclase type 6 activation. *Biochem Pharmacol* **70**(1):113-120.
- Beckett AH and Casy AF (1954) Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J Pharm Pharmacol* **6**(12):986-1001.

- Belcheva MM, Szucs M, Wang D, Sadee W and Coscia CJ (2001) mu-Opioid receptor-mediated ERK activation involves calmodulin-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* **276**(36):33847-33853.
- Bennett N (1982) Light-induced interactions between rhodopsin and the GTP-binding protein. Relation with phosphodiesterase activation. *Eur J Biochem* **123**(1):133-139.
- Berlin S, Keren-Raifman T, Castel R, Rubinstein M, Dessauer CW, Ivanina T and Dascal N (2009) G α i and G β γ jointly regulate the conformations of a G β γ effector, the neuronal G-protein activated K⁺ channel (GIRK). *J Biol Chem*.
- Berlot CH and Bourne HR (1992) Identification of effector-activating residues of Gs alpha. *Cell* **68**(5):911-922.
- Berridge MJ (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**(2):345-360.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6):933-940.
- Bevis BJ and Glick BS (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**(1):83-87.
- Bhushan RG, Sharma SK, Xie Z, Daniels DJ and Portoghese PS (2004) A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta(1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers. *J Med Chem* **47**(12):2969-2972.
- Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* **11**(10):406-410.
- Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, Ishido M, Barberis C, Antaramian A, Brabet P and Rosenthal W (1992) Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* **357**(6376):333-335.
- Blackmore PF and Exton JH (1986) Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum fluoride and glucagon. Modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* **261**(24):11056-11063.
- Blahos J, 2nd, Mary S, Perroy J, de Colle C, Brabet I, Bockaert J and Pin JP (1998) Extreme C terminus of G protein alpha-subunits contains a site that discriminates between Gi-coupled metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **273**(40):25765-25769.

- Boekhoff I, Inglese J, Schleicher S, Koch WJ, Lefkowitz RJ and Breer H (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **269**(1):37-40.
- Bonifacino JS and Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**:395-447.
- Bos JL (2003) Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(9):733-738.
- Bos JL (2006) Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**(12):680-686.
- Bossis I and Stratakis CA (2004) Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**(12):5452-5458.
- Bourne HR, Sanders DA and McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**(6297):125-132.
- Bourque CW and Oliet SH (1997) Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **59**:601-619.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**(6171):370-373.
- Bovolenta S, Foti M, Lohmer S and Corazza S (2007) Development of a Ca(2+)-activated photoprotein, Photina, and its application to high-throughput screening. *J Biomol Screen* **12**(5):694-704.
- Bunemann M, Frank M and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26):16077-16082.
- Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M and Benovic JL Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*.
- Bylund DB (1988) Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* **9**(10):356-361.

- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr. and Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* **46**(2):121-136.
- Bylund DB and Ray-Prenger C (1989) Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* **251**(2):640-644.
- Callaway C, Seryshev A, Wang JP, Slavik KJ, Needleman DH, Cantu C, 3rd, Wu Y, Jayaraman T, Marks AR and Hamilton SL (1994) Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* **269**(22):15876-15884.
- Campbell AK (1974) Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata*. *Biochem J* **143**(2):411-418.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA and Tsien RY (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12):7877-7882.
- Cardullo RA (2007) Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods Cell Biol* **81**:479-494.
- Cardullo RA and Parpura V (2003) Fluorescence resonance energy transfer microscopy: theory and instrumentation. *Methods Cell Biol* **72**:415-430.
- Carlson HJ and Campbell RE (2009) Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol* **20**(1):19-27.
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL and Kozasa T (1999) Selective regulation of G α (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**(48):34483-34492.
- Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, Cortes A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C and Franco R (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* **5**(8):727-733.
- Carter BD and Medzihradsky F (1993) Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9):4062-4066.

- Charles AC, Mostovskaya N, Asas K, Evans CJ, Dankovich ML and Hales TG (2003) Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol* **63**(1):89-95.
- Chefer VI, Kieffer BL and Shippenberg TS (2003) Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur J Neurosci* **18**(7):1915-1922.
- Chen CA and Manning DR (2001) Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **20**(13):1643-1652.
- Cherfils J and Chabre M (2003) Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions. *Trends Biochem Sci* **28**(1):13-17.
- Chikumi H, Vazquez-Prado J, Servitja JM, Miyazaki H and Gutkind JS (2002) Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* **277**(30):27130-27134.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM and Schwartz MA (1994) The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**(3):507-513.
- Cismowski MJ, Takesono A, Bernard ML, Duzic E and Lanier SM (2001) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci* **68**(19-20):2301-2308.
- Claing A (2004) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochem Cell Biol* **82**(6):610-617.
- Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT and Lefkowitz RJ (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**(45):42509-42513.
- Clapham DE and Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:167-203.
- Clarke S (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**:355-386.
- Conn PM, Rogers DC and McNeil R (1982) Potency enhancement of a GnRH agonist: GnRH-receptor microaggregation stimulates gonadotropin release. *Endocrinology* **111**(1):335-337.

- Conti E, Franks NP and Brick P (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**(3):287-298.
- Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**(1 Spec No):33-38.
- Coulon V, Audet M, Homburger V, Bockaert J, Fagni L, Bouvier M and Perroy J (2008) Subcellular imaging of dynamic protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys J* **94**(3):1001-1009.
- Cox BM, Goldstein A and Hi CH (1976) Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin-(61-91), derived from beta-lipotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(6):1821-1823.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA and Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**(11):448-455.
- Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997a) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**(6655):88-91.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD and Lefkowitz RJ (1997b) Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6):2180-2185.
- Dacres H, Wang J, Dumancic MM and Trowell SC (2009) Experimental Determination of the Forster Distance for Two Commonly Used Bioluminescent Resonance Energy Transfer Pairs. *Anal Chem*.
- Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin JP and Baneres JL (2006) Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J* **25**(24):5693-5702.
- Dave RH, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R and Rasenick MM (2009) Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals* **17**(1):100-108.
- Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL and Wedegaertner PB (2003) Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family. *Biochemistry* **42**(30):9176-9184.
- Day PW, Tesmer JJ, Sterne-Marr R, Freeman LC, Benovic JL and Wedegaertner PB (2004) Characterization of the GRK2 binding site of Galphaq. *J Biol Chem* **279**(51):53643-53652.

- De A, Ray P, Loening AM and Gambhir SS (2009) BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J* **23**(8):2702-2709.
- de Costa BR, Rothman RB, Bykov V, Jacobson AE and Rice KC (1989) Selective and enantiospecific acylation of kappa opioid receptors by (1S,2S)-trans-2-isothiocyanato-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny) cyclohexy l] benzeneacetamide. Demonstration of kappa receptor heterogeneity. *J Med Chem* **32**(2):281-283.
- DeGraff JL, Gagnon AW, Benovic JL and Orsini MJ (1999) Role of arrestins in endocytosis and signaling of alpha2-adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* **274**(16):11253-11259.
- Devlin MG and Christopoulos A (2002) Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J Neurochem* **80**(6):1095-1102.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**:483-510.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghurir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS and Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* **48**(4):567-592.
- DiPilato LM, Cheng X and Zhang J (2004) Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47):16513-16518.
- Dolphin AC (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* **19**(3):237-244.
- Dormer RL, Newman GR and Campbell AK (1978) Preparation and characterization of liposomes containing the Ca²⁺-activated photoprotein, obelin. *Biochim Biophys Acta* **538**(1):87-105.
- Dulhunty AF, Laver D, Curtis SM, Pace S, Haarmann C and Gallant EM (2001) Characteristics of irreversible ATP activation suggest that native skeletal ryanodine receptors can be phosphorylated via an endogenous CaMKII. *Biophys J* **81**(6):3240-3252.
- Eason MG, Kurose H, Holt BD, Raymond JR and Liggett SB (1992) Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects.

- Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *J Biol Chem* **267**(22):15795-15801.
- Ellis C (2004) The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* **3**(7):575, 577-626.
- Erickson HP (2009) Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol Proced Online*.
- Ernst OP, Meyer CK, Marin EP, Henklein P, Fu WY, Sakmar TP and Hofmann KP (2000) Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits. *J Biol Chem* **275**(3):1937-1943.
- Evanko DS and Haydon PG (2005) Elimination of environmental sensitivity in a cameleon FRET-based calcium sensor via replacement of the acceptor with Venus. *Cell Calcium* **37**(4):341-348.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Siderovski DP and Wedegaertner PB (2001) Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J Biol Chem* **276**(26):23945-23953.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM and Wedegaertner PB (2000) Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J Biol Chem* **275**(2):1327-1336.
- Fan GH, Yang W, Wang XJ, Qian Q and Richmond A (2001) Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry* **40**(3):791-800.
- Fields TA and Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* **321** (Pt 3):561-571.
- Filtz TM, Paterson A and Harden TK (1996) Purification and G protein subunit regulation of a phospholipase C-beta from *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **271**(49):31121-31126.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz (Intermolecular energy migration and fluorescence). *Annalen der Physik* **2**:55-75.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**(6919):127-128.

- Francesconi A and Duvoisin RM (1998) Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J Biol Chem* **273**(10):5615-5624.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(3):177-184.
- Galperin E, Verkhusha VV and Sorkin A (2004) Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat Methods* **1**(3):209-217.
- Gandia J, Lluís C, Ferre S, Franco R and Ciruela F (2008) Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays* **30**(1):82-89.
- Garcia-Higuera I, Penela P, Murga C, Egea G, Bonay P, Benovic JL and Mayor F, Jr. (1994) Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J Biol Chem* **269**(2):1348-1355.
- Garcia PD, Onrust R, Bell SM, Sakmar TP and Bourne HR (1995) Transducin-alpha C-terminal mutations prevent activation by rhodopsin: a new assay using recombinant proteins expressed in cultured cells. *EMBO J* **14**(18):4460-4469.
- Gasper R, Meyer S, Gotthardt K, Sirajuddin M and Wittinghofer A (2009) It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(6):423-429.
- Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa IR, Jr., Kindermann M, Beaufile F and Johnsson K (2008) An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* **15**(2):128-136.
- Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Peluso J and Kieffer BL (1998) Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11):6326-6330.
- Gaveriaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J and Kieffer B (1995) Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* **369**(2-3):272-276.
- Gelb MH, Scholten JD and Sebolt-Leopold JS (1998) Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr Opin Chem Biol* **2**(1):40-48.
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**:615-649.

- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M and Hood L (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(12):6666-6670.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**(22):RC110.
- Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH and Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**(6599):447-450.
- Gorokhovatsky AY, Rudenko NV, Marchenkov VV, Skosyrev VS, Arzhanov MA, Burkhardt N, Zakharov MV, Semisotnov GV, Vinokurov LM and Alakhov YB (2003) Homogeneous assay for biotin based on *Aequorea victoria* bioluminescence resonance energy transfer system. *Anal Biochem* **313**(1):68-75.
- Goudet C, Kniazeff J, Hlavackova V, Malhaire F, Maurel D, Acher F, Blahos J, Prezeau L and Pin JP (2005) Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators. *J Biol Chem* **280**(26):24380-24385.
- Griner EM and Kazanietz MG (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**(4):281-294.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**(6):3440-3450.
- Guibert C, Ducret T and Savineau JP (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* **98**(1):10-23.
- Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M and Javitch JA (2008) Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J* **27**(17):2293-2304.
- Hague C, Uberti MA, Chen Z, Bush CF, Jones SV, Ressler KJ, Hall RA and Minneman KP (2004) Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37):13672-13676.
- Hains MD, Siderovski DP and Harden TK (2004) Application of RGS box proteins to evaluate G-protein selectivity in receptor-promoted signaling. *Methods Enzymol* **389**:71-88.

- Halpin DM (2008) ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **3**(4):543-561.
- Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA 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**(40):29089-29100.
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **273**(2):669-672.
- Hamm HE and Gilchrist A (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**(2):189-196.
- Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H and Javitch JA (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* **5**(9):688-695.
- Handler CM, Geller EB and Adler MW (1992) Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **43**(4):1209-1216.
- Harbeck MC, Chepurny O, Nikolaev VO, Lohse MJ, Holz GG and Roe MW (2006) Simultaneous optical measurements of cytosolic Ca²⁺ and cAMP in single cells. *Sci STKE* **2006**(353):pl6.
- Haribabu B, Hook SS, Selbert MA, Goldstein EG, Tomhave ED, Edelman AM, Snyderman R and Means AR (1995) Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J* **14**(15):3679-3686.
- Hasbi A, Devost D, Laporte SA and Zingg HH (2004) Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol Endocrinol* **18**(5):1277-1286.
- Hasbi A, Fan T, Alijaniam M, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF and George SR (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50):21377-21382.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, 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**(27):16384-16392.

- Heim R, Prasher DC and Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26):12501-12504.
- Henderson R and Unwin PN (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**(5521):28-32.
- Hepler JR and Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**(10):383-387.
- Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**(1):25-44.
- Heroux M, Hogue M, Lemieux S and Bouvier M (2007) Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J Biol Chem* **282**(43):31610-31620.
- Herrmann-Frank A and Varsanyi M (1993) Enhancement of Ca²⁺ release channel activity by phosphorylation of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Lett* **332**(3):237-242.
- Hildreth KL, Wu JH, Barak LS, Exum ST, Kim LK, Peppel K and Freedman NJ (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor. *J Biol Chem* **279**(40):41775-41782.
- Ho MK and Wong YH (1998) Structure and function of the pertussis-toxin-insensitive Gz protein. *Biol Signals Recept* **7**(2):80-89.
- Hong MH, Xu C, Wang YJ, Ji JL, Tao YM, Xu XJ, Chen J, Xie X, Chi ZQ and Liu JG (2009) Role of Src in ligand-specific regulation of delta-opioid receptor desensitization and internalization. *J Neurochem* **108**(1):102-114.
- Hsia JA, Moss J, Hewlett EL and Vaughan M (1984) ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* **259**(2):1086-1090.
- Hu CD, Chinenov Y and Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**(4):789-798.
- Huang P, Steplock D, Weinman EJ, Hall RA, Ding Z, Li J, Wang Y and Liu-Chen LY (2004) kappa Opioid receptor interacts with Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾-exchanger regulatory factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to

- stimulate Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange independent of G(i)/G(o) proteins. *J Biol Chem* **279**(24):25002-25009.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**(5536):577-580.
- Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, Kaibuchi K and Hakoshima T (1998) Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* **273**(16):9656-9666.
- Innamorati G, Giannone F, Guzzi F, Rovati GE, Accomazzo MR, Chini B, Bianchi E, Schiaffino MV, Tridente G and Parenti M (2009) Heterotrimeric G proteins demonstrate differential sensitivity to beta-arrestin dependent desensitization. *Cell Signal* **21**(7):1135-1142.
- Inouye K, Mizutani S, Koide H and Kaziro Y (2000) Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* **275**(6):3737-3740.
- Isabet T, Montagnac G, Regazzoni K, Raynal B, El Khadali F, England P, Franco M, Chavrier P, Houdusse A and Menetrey J (2009) The structural basis of Arf effector specificity: the crystal structure of ARF6 in a complex with JIP4. *EMBO J* **28**(18):2835-2845.
- Jamot L, Matthes HW, Simonin F, Kieffer BL and Roder JC (2003) Differential involvement of the mu and kappa opioid receptors in spatial learning. *Genes Brain Behav* **2**(2):80-92.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Fraser ID and Sternweis PC (2008) Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenylyl cyclase VII. *J Biol Chem* **283**(34):23429-23439.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Lin KM, DeCamp D, Roach T, Hsueh R, Rebres RA, Ross EM, Taussig R, Fraser I and Sternweis PC (2007) Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem* **282**(14):10576-10584.
- Jin W, Lee NM, Loh HH and Thayer SA (1992) Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* **42**(6):1083-1089.

- Jones SB, Halenda SP and Bylund DB (1991) Alpha 2-adrenergic receptor stimulation of phospholipase A2 and of adenylate cyclase in transfected Chinese hamster ovary cells is mediated by different mechanisms. *Mol Pharmacol* **39**(2):239-245.
- Jordan BA and Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**(6737):697-700.
- Kable JW, Murrin LC and Bylund DB (2000) In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **293**(1):1-7.
- Kam AY, Chan AS and Wong YH (2003) Rac and Cdc42-dependent regulation of c-Jun N-terminal kinases by the delta-opioid receptor. *J Neurochem* **84**(3):503-513.
- Kam AY, Chan AS and Wong YH (2004) Phosphatidylinositol-3 kinase is distinctively required for mu-, but not kappa-opioid receptor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Neurochem* **89**(2):391-402.
- 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**(6712):683-687.
- Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H and Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* **21**(1):86-89.
- Kitchen I, Leslie FM, Kelly M, Barnes R, Crook TJ, Hill RG, Borsodi A, Toth G, Melchiorri P and Negri L (1995) Development of delta-opioid receptor subtypes and the regulatory role of weaning: radioligand binding, autoradiography and in situ hybridization studies. *J Pharmacol Exp Ther* **275**(3):1597-1607.
- Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HW and Kieffer B (1997) Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Res* **778**(1):73-88.
- Klein S, Reuveni H and Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7):3219-3223.
- Kocan M, See HB, Seeber RM, Eidne KA and Pflieger KD (2008) Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen* **13**(9):888-898.

- Koelle MR (1997) A new family of G-protein regulators - the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2):143-147.
- Kohout TA and Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**(1):9-18.
- Kovoor A, Celver J, Abdryashitov RI, Chavkin C and Gurevich VV (1999) Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* **274**(11):6831-6834.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G and Sternweis PC (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **280**(5372):2109-2111.
- Krupnick JG, Goodman OB, Jr., Keen JH and Benovic JL (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* **272**(23):15011-15016.
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A and Kornau HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283**(5398):74-77.
- Laglia G, Zeiger MA, Leipricht A, Caturegli P, Levine MA, Kohn LD and Saji M (1996) Increased cyclic adenosine 3',5'-monophosphate inhibits G protein-coupled activation of phospholipase C in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* **137**(8):3170-3176.
- Landa LR, Jr., Harbeck M, Kaihara K, Chepurny O, Kitiphongspattana K, Graf O, Nikolaev VO, Lohse MJ, Holz GG and Roe MW (2005) Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem* **280**(35):31294-31302.
- Lanier SM (2004) AGS proteins, GPR motifs and the signals processed by heterotrimeric G proteins. *Biol Cell* **96**(5):369-372.
- Law PY, Wong YH and Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:389-430.
- Law SF and Reisine T (1997) Changes in the association of G protein subunits with the cloned mouse delta opioid receptor on agonist stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* **281**(3):1476-1486.
- Lee JW, Joshi S, Chan JS and Wong YH (1998) Differential coupling of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors to G alpha16-mediated stimulation of phospholipase C. *J Neurochem* **70**(5):2203-2211.

- Lee PH, Gao A, van Staden C, Ly J, Salon J, Xu A, Fang Y and Verkleeren R (2008) Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed G protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol* **6**(1):83-94.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **25**(8):413-422.
- Limbird LE (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J* **2**(11):2686-2695.
- Lin X, Voyno-Yasenetskaya TA, Hooley R, Lin CY, Orłowski J and Barber DL (1996) α_{12} differentially regulates $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger isoforms. *J Biol Chem* **271**(37):22604-22610.
- Liu J, Blin N, Conklin BR and Wess J (1996a) Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem* **271**(11):6172-6178.
- Liu WW, Mattingly RR and Garrison JC (1996b) Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene increases the tyrosine phosphorylation state and activity of the α subunit of Gq/G11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16):8258-8263.
- Lo RK and Wong YH (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 activation by the delta-opioid receptor via α_{14} involves multiple intermediates. *Mol Pharmacol* **65**(6):1427-1439.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P and Darnell J (1995) *Molecular Cell Biology*. Third Edition Scientific American Book, New York.
- Loening AM, Fenn TD, Wu AM and Gambhir SS (2006) Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**(9):391-400.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**(4962):1547-1550.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J and Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**(5611):495-499.
- Los GV and Wood K (2007) The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol* **356**:195-208.

- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M and Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**(12):11134-11139.
- Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W and Huang XY (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102**(5):635-646.
- Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM and Danuser G (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**(7260):99-103.
- Maggio R, Vogel Z and Wess J (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7):3103-3107.
- Magliery TJ, Wilson CG, Pan W, Mishler D, Ghosh I, Hamilton AD and Regan L (2005) Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc* **127**(1):146-157.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* **7**(8):2445-2464.
- Marchese A, Paing MM, Temple BR and Trejo J (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:601-629.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE and Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**(3):517-532.
- Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prezeau L, Trinquet E and Pin JP (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* **5**(6):561-567.
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ and Lefkowitz RJ (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**(5496):1574-1577.
- McElroy WD and DeLuca MA (1983) Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J Appl Biochem* **5**(3):197-209.

- McLaughlin SK, McKinnon PJ, Spickofsky N, Danho W and Margolskee RF (1994) Molecular cloning of G proteins and phosphodiesterases from rat taste cells. *Physiol Behav* **56**(6):1157-1164.
- Meigs TE, Fields TA, McKee DD and Casey PJ (2001) Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta-catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2):519-524.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL and Martinez AC (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* **20**(10):2497-2507.
- Mende U, Schmidt CJ, Yi F, Spring DJ and Neer EJ (1995) The G protein gamma subunit. Requirements for dimerization with beta subunits. *J Biol Chem* **270**(26):15892-15898.
- Michie AM, Rena G, Harnett MM and Houslay MD (1998) Upregulation of cAMP-specific PDE-4 activity following ligation of the TCR complex on thymocytes is blocked by selective inhibitors of protein kinase C and tyrosyl kinases. *Cell Biochem Biophys* **28**(2-3):161-185.
- Mikoshiba K (2007) IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* **102**(5):1426-1446.
- Milano SK, Pace HC, Kim YM, Brenner C and Benovic JL (2002) Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* **41**(10):3321-3328.
- Mitra S and Bourreau JP (2006) Gs and Gi coupling of adrenomedullin in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(5):H1842-1847.
- Moles A, Kieffer BL and D'Amato FR (2004) Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* **304**(5679):1983-1986.
- Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel CV and Notredame C (2007) The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue):W645-648.
- Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B and Beaudet A (2004) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain* **109**(3):266-273.

- Morley JE, Levine AS, Kneip J, Grace M, Zeugner H and Shearman GT (1985) The kappa opioid receptor and food intake. *Eur J Pharmacol* **112**(1):17-25.
- Mustafi D and Palczewski K (2009) Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol Pharmacol* **75**(1):1-12.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M and Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29):10554-10559.
- Namkung Y, Dipace C, Javitch JA and Sibley DR (2009) G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* **284**(22):15038-15051.
- Neilan CL, Akil H, Woods JH and Traynor JR (1999) Constitutive activity of the delta-opioid receptor expressed in C6 glioma cells: identification of non-peptide delta-inverse agonists. *Br J Pharmacol* **128**(3):556-562.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ and Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**(6877):199-202.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ and Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**(3):381-390.
- Neves SR, Ram PT and Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* **296**(5573):1636-1639.
- Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P and Knepper MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* **82**(1):205-244.
- Niu J, Vaiskunaite R, Suzuki N, Kozasa T, Carr DW, Dulin N and Voyno-Yasenetskaya TA (2001) Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation. *Curr Biol* **11**(21):1686-1690.
- Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini GU, 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**(20):19768-19776.
- Oner S, An N, Vural A, Breton BBM, Blumer J and Lanier S (2010) REGULATION OF THE AGS3-G*ai* SIGNALING COMPLEX BY A SEVEN-TRANSMEMBRANE SPAN RECEPTOR

EMBO, (en préparation).

- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY and Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**(5280):1392-1395.
- Otto-Bruc A, Vuong TM and Antonny B (1994) GTP-dependent binding of Gi, G(o) and Gs to the gamma-subunit of the effector of Gt. *FEBS Lett* **343**(3):183-187.
- Overton MC and Blumer KJ (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr Biol* **10**(6):341-344.
- Paing MM, Johnston CA, Siderovski DP and Trejo J (2006) Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization. *Mol Cell Biol* **26**(8):3231-3242.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.
- Pang S, Smith J, Onley D, Reeve J, Walker M and Foy C (2005) A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *J Immunol Methods* **302**(1-2):1-12.
- Paulmurugan R and Gambhir SS (2003) Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal Chem* **75**(7):1584-1589.
- Penela P, Elorza A, Sarnago S and Mayor F, Jr. (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J* **20**(18):5129-5138.
- Penela P, Ribas C, Aymerich I, Eijkelkamp N, Barreiro O, Heijnen CJ, Kavelaars A, Sanchez-Madrid F and Mayor F, Jr. (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *EMBO J* **27**(8):1206-1218.
- Penela P, Ribas C and Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**(11):973-981.
- Perala M, Hirvonen H, Kalimo H, Ala-Uotila S, Regan JW, Akerman KE and Scheinin M (1992) Differential expression of two alpha 2-adrenergic receptor subtype mRNAs in human tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **16**(1-2):57-63.
- Perez DM (2005) From plants to man: the GPCR "tree of life". *Mol Pharmacol* **67**(5):1383-1384.

- Pert CB and Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**(77):1011-1014.
- Peterson YK, Bernard ML, Ma H, Hazard S, 3rd, Graber SG and Lanier SM (2000) Stabilization of the GDP-bound conformation of G α by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3. *J Biol Chem* **275**(43):33193-33196.
- Pfeiffer A, Knepel W, Braun S, Meyer HD, Lohmann H and Brantl V (1986) Effects of a kappa-opioid agonist on adrenocorticotrophic and diuretic function in man. *Horm Metab Res* **18**(12):842-848.
- Pfister C, Chabre M, Plouet J, Tuyen VV, De Kozak Y, Faure JP and Kuhn H (1985) Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* **228**(4701):891-893.
- Piljic A and Schultz C (2008) Simultaneous recording of multiple cellular events by FRET. *ACS Chem Biol* **3**(3):156-160.
- Pin JP, Kniazeff J, Goudet C, Bessis AS, Liu J, Galvez T, Acher F, Rondard P and Prezeau L (2004) The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell* **96**(5):335-342.
- Pineyro G, Azzi M, De Lean A, Schiller P and Bouvier M (2001) Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Mol Pharmacol* **60**(4):816-827.
- Pol O, Palacio JR and Puig MM (2003) The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(2):455-462.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2):229-233.
- Puzianowska-Kuznicka M and Kuznicki J (2009) The ER and ageing II: calcium homeostasis. *Ageing Res Rev* **8**(3):160-172.
- Qanbar R and Bouvier M (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther* **97**(1):1-33.
- Quock RM, Hosohata Y, Knapp RJ, Burkey TH, Hosohata K, Zhang X, Rice KC, Nagase H, Hruby VJ, Porreca F, Roeske WR and Yamamura HI (1997) Relative efficacies of delta-opioid receptor agonists at the cloned human delta-opioid receptor. *Eur J Pharmacol* **326**(1):101-104.

- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF and George SR (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**(2):654-659.
- Raw AS, Coleman DE, Gilman AG and Sprang SR (1997) Structural and biochemical characterization of the GTPgammaS-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase-deficient Gly42 --> Val mutant of Gialpha1. *Biochemistry* **36**(50):15660-15669.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI and Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* **45**(2):330-334.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Jr. and Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**(5237):792-794.
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I and Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**(4):913-922.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC and Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**(5463):154-157.
- Roof DJ, Applebury ML and Sternweis PC (1985) Relationships within the family of GTP-binding proteins isolated from bovine central nervous system. *J Biol Chem* **260**(30):16242-16249.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**(7245):356-363.
- Rovati GE, Capra V and Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* **71**(4):959-964.
- Roychowdhury S and Rasenick MM (2008) Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric Gproteins. *FEBS J* **275**(19):4654-4663.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA and Brown JH (2000) The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:459-489.

- Salemi S, Aeschlimann A, Reisch N, Jungel A, Gay RE, Heppner FL, Michel BA, Gay S and Sprott H (2005) Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2):1012-1017.
- Sallese M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L and De Blasi A (2000) Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol* **57**(4):826-831.
- Salvador LM, Mukherjee S, Kahn RA, Lamm ML, Fazleabas AT, Maizels ET, Bader MF, Hamm H, Rasenick MM, Casanova JE and Hunzicker-Dunn M (2001) Activation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin hormone receptor promotes ADP ribosylation factor 6 activation in porcine ovarian follicular membranes. *J Biol Chem* **276**(36):33773-33781.
- Sanchez-Blazquez P and Garzon J (1998) delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* **285**(2):820-827.
- Sarma T, Voyno-Yasenetskaya T, Hope TJ and Rasenick MM (2003) Heterotrimeric G-proteins associate with microtubules during differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *FASEB J* **17**(8):848-859.
- Sarnago S, Elorza A and Mayor F, Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**(48):34411-34416.
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP and Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**(7212):497-502.
- Schmidt M, Nehls C, Rumenapp U and Jakobs KH (1996) m3 Muscarinic receptor-induced and Gi-mediated heterologous potentiation of phospholipase C stimulation: role of phosphoinositide synthesis. *Mol Pharmacol* **50**(4):1038-1046.
- Schoffelmeer AN, Rice KC, Jacobson AE, Van Gelderen JG, Hogenboom F, Heijna MH and Mulder AH (1988) Mu-, delta- and kappa-opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur J Pharmacol* **154**(2):169-178.
- Schulz R (2001) The pharmacology of phosducin. *Pharmacol Res* **43**(1):1-10.
- Schulz R, Eisinger DA and Wehmeyer A (2004) Opioid control of MAP kinase cascade. *Eur J Pharmacol* **500**(1-3):487-497.

- Schwindinger WF and Robishaw JD (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**(13):1653-1660.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE and Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**(12):1567-1572.
- Shaner NC, Steinbach PA and Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**(12):905-909.
- Shankaranarayanan A, Thal DM, Tesmer VM, Roman DL, Neubig RR, Kozasa T and Tesmer JJ (2008) Assembly of high order G alpha q-effector complexes with RGS proteins. *J Biol Chem* **283**(50):34923-34934.
- Sharp BM, McKean DJ, McAllen K and Shahabi NA (1998) Signaling through delta opioid receptors on murine splenic T cells and stably transfected Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* **840**:420-424.
- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**:223-239.
- Shrestha S and Deo SK (2006) Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. *Anal Bioanal Chem* **386**(3):515-524.
- Shyu YJ, Suarez CD and Hu CD (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**(1):151-156.
- Slep KC, Kercher MA, He W, Cowan CW, Wensel TG and Sigler PB (2001) Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 Å. *Nature* **409**(6823):1071-1077.
- Smit MJ, Vink C, Verzijl D, Casarosa P, Bruggeman CA and Leurs R (2003) Virally encoded G protein-coupled receptors: targets for potentially innovative anti-viral drug development. *Curr Drug Targets* **4**(5):431-441.
- Smrcka AV, Kichik N, Tarrago T, Burroughs M, Park MS, Itoga NK, Stern HA, Willardson BM and Giralt E (2009) NMR analysis of G-protein {beta}{gamma} subunit complexes reveals a dynamic G{alpha}-G{beta}{gamma} subunit interface and multiple protein recognition modes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Smrcka AV and Sternweis PC (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**(13):9667-9674.
- Sorkin A, McClure M, Huang F and Carter R (2000) Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* **10**(21):1395-1398.
- Stander S, Gunzer M, Metze D, Luger T and Steinhoff M (2002) Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. *Regul Pept* **110**(1):75-83.
- Stefan E, Aquin S, Berger N, Landry CR, Nyfeler B, Bouvier M and Michnick SW (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**(43):16916-16921.
- Stephens L, Jackson TR and Hawkins PT (1993) Activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate supply by agonists and non-hydrolysable GTP analogues. *Biochem J* **296** (Pt 2):481-488.
- Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S and Ryu SH (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**(6):415-434.
- Sunahara RK and Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**(3):168-184.
- Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K and Kobori M (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* **279**(46):47438-47445.
- Takida S and Wedegaertner PB (2003) Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of Gbetagamma. *J Biol Chem* **278**(19):17284-17290.
- Tallini YN, Ohkura M, Choi BR, Ji G, Imoto K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin HB, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Nakai J and Kotlikoff MI (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12):4753-4758.
- Tam R and Saier MH, Jr. (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**(2):320-346.

- Taylor JM, Jacob-Mosier GG, Lawton RG, VanDort M and Neubig RR (1996) Receptor and membrane interaction sites on G β . A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus. *J Biol Chem* **271**(7):3336-3339.
- Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG and Sprang SR (1997a) Structure of RGS4 bound to AlF₄--activated G(i α 1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**(2):251-261.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG and Sprang SR (1997b) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* **278**(5345):1907-1916.
- Tien LT, Fan LW, Sogawa C, Ma T, Loh HH and Ho IK (2004) Changes in acetylcholinesterase activity and muscarinic receptor bindings in mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* **126**(1):38-44.
- Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L and Auh JS (1998) Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr* **178**:440-466.
- Tran TM, Jorgensen R and Clark RB (2007) Phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor in plasma membranes by intrinsic GRK5. *Biochemistry* **46**(50):14438-14449.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**:509-544.
- Tsygankova OM, Peng M, Maloney JA, Hopkins N and Williamson JR (1998) Angiotensin II induces diverse signal transduction pathways via both G α and G β proteins in liver epithelial cells. *J Cell Biochem* **69**(1):63-71.
- Umemori H, Hayashi T, Inoue T, Nakanishi S, Mikoshiba K and Yamamoto T (1999) Involvement of protein tyrosine phosphatases in activation of the trimeric G protein Gq/11. *Oncogene* **18**(51):7399-7402.
- Umemori H, Inoue T, Kume S, Sekiyama N, Nagao M, Itoh H, Nakanishi S, Mikoshiba K and Yamamoto T (1997) Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit. *Science* **276**(5320):1878-1881.
- Verdonk E, Johnson K, McGuinness R, Leung G, Chen YW, Tang HR, Michelotti JM and Liu VF (2006) Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform

- for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol* **4**(5):609-619.
- Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, Portoghese PS and Whistler JL (2005) A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25):9050-9055.
- Wang D, Tolbert LM, Carlson KW and Sadee W (2000) Nuclear Ca²⁺/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor. *J Neurochem* **74**(4):1418-1425.
- Wang N and Rasenick MM (1991) Tubulin-G protein interactions involve microtubule polymerization domains. *Biochemistry* **30**(45):10957-10965.
- Wang N, Yan K and Rasenick MM (1990) Tubulin binds specifically to the signal-transducing proteins, Gs alpha and Gi alpha 1. *J Biol Chem* **265**(3):1239-1242.
- Wang Q, Zhao J, Brady AE, Feng J, Allen PB, Lefkowitz RJ, Greengard P and Limbird LE (2004) Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* **304**(5679):1940-1944.
- Weinman S (1991) Calcium-binding proteins: an overview. *J Biol Buccale* **19**(1):90-98.
- Werry TD, Wilkinson GF and Willars GB (2003) Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* **374**(Pt 2):281-296.
- Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**(3):231-264.
- Willets JM, Challiss RA and Nahorski SR (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci* **24**(12):626-633.
- Wilson T and Hastings JW (1998) Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:197-230.
- Wolfe BL and Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**(5):462-470.
- Xu Y, Piston DW and Johnson CH (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1):151-156.

- Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K and Negishi M (2002) Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* **12**(15):1353-1358.
- Yeo A, Samways DS, Fowler CE, Gunn-Moore F and Henderson G (2001) Coincident signalling between the Gi/Go-coupled delta-opioid receptor and the Gq-coupled m3 muscarinic receptor at the level of intracellular free calcium in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **76**(6):1688-1700.
- Yoo JH, Yang EM, Lee SY, Loh HH, Ho IK and Jang CG (2003) Differential effects of morphine and cocaine on locomotor activity and sensitization in mu-opioid receptor knockout mice. *Neurosci Lett* **344**(1):37-40.
- Yuen JW, So IY, Kam AY and Wong YH (2004) Regulation of STAT3 by mu-opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroreport* **15**(9):1431-1435.
- Yuferov V, Fussell D, LaForge KS, Nielsen DA, Gordon D, Ho A, Leal SM, Ott J and Kreek MJ (2004) Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction. *Pharmacogenetics* **14**(12):793-804.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ and Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* **386**(6624):499-502.
- Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ and Porreca F (1996) Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**:379-401.
- Zeng W, Mak DO, Li Q, Shin DM, Foskett JK and Muallem S (2003) A new mode of Ca²⁺ signaling by G protein-coupled receptors: gating of IP3 receptor Ca²⁺ release channels by Gbetagamma. *Curr Biol* **13**(10):872-876.
- Zhang X, Wang F, Chen X, Chen Y and Ma L (2008) Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *J Neurochem* **106**(2):781-792.
- Zhu X and Birnbaumer L (1996) G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of Galpha(16) and evidence for a synergic interaction between Gbeta gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7):2827-2831.

Annexes

Liste des articles autres que premier auteur :

1. RECEPTOR-REGULATED INTERACTION OF ACTIVATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 4 AND G1ALPHA, Sadik Oner¹, Ellen Maher¹, Billy Breton, Michel Bouvier, and Joe B. Blumer, *J Biol Chem.* 2010 (in press)
2. COUPLING OF A G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR TO THE AGS3-G α i SIGNALING COMPLEX, Sadik Oner, Ningfei An, Ali Vural, Billy Breton, Michel Bouvier, Joe B. Blumer and Stephen M. Lanier, *FASEB J.* 2010 (in press)
3. Multimerization of Staufen1 in live cells., Martel C, Dugré-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, Trépanier V, Duchaine T, Bouvier M, Desgroseillers L. *RNA.* 2010 Mar;16(3):585-97.
4. Vasopressin Type 2 Receptor V88M Mutation: Molecular Basis of Partial and Complete Nephrogenic Diabetes Insipidus. Bockenhauer D, Carpentier E, Rochdi D, Van't Hoff W, Breton B, Bernier V, Bouvier M, Bichet DG. *Nephron Physiol.* 2009 Oct 8;114(1):p1-p10.
5. Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. Leduc M, Breton B, Galés C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, Heveker N.J *Pharmacol Exp Ther.* 2009 Oct;331(1):297-307.

6. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M. *J Biol Chem*. 2007 Oct 5;282(40):29089-100.
7. Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. Héroux M, Breton B, Hogue M, Bouvier M. *Biochemistry*. 2007 Jun 12;46(23):7022-33. Epub 2007 May 16.
8. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M. *Curr Protoc Neurosci*. 2006 Feb;Chapter 5:Unit 5.23

Article 4

Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2.

Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M. *J Biol Chem.* 2007 Oct 5;282(40):29089-100.

Pour cet article, ma contribution a été principalement au niveau technique en produisant les résultats pour la figure 8 qui mesure en parallèle les interactions entre le récepteur V2 et β -arrestin2 ainsi que β 2-adaptin et β -arrestin2 en utilisant simultanément le BRET¹ et le BRET².

Unraveling G Protein-coupled Receptor Endocytosis Pathways Using Real-time Monitoring of Agonist-promoted Interaction between β -Arrestins and AP-2*

Received for publication, January 19, 2007, and in revised form, July 3, 2007. Published, JBC Papers in Press, August 3, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700577200

Fadi F. Hamdan^{†1,2,3}, Moulay Driss Rochdi^{†1,3}, Billy Breton[†], Delphine Fessart[§], Douce E. Michaud[†], Pascale G. Charest^{†4}, Stéphane A. Laporte^{§5}, and Michel Bouvier^{†6}

From the [†]Department of Biochemistry and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7 and the [§]Department of Medicine, McGill University, Montréal, Québec H3A 1A1, Canada

The most widely studied pathway underlying agonist-promoted internalization of G protein-coupled receptors (GPCRs) involves β -arrestin and clathrin-coated pits. However, both β -arrestin- and clathrin-independent processes have also been reported. Classically, the endocytic routes are characterized using pharmacological inhibitors and various dominant negative mutants, resulting sometimes in conflicting results and interpretational difficulties. Here, taking advantage of the fact that β -arrestin binding to the β 2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 (β 2-adaptin) is needed for the β -arrestin-mediated targeting of GPCRs to clathrin-coated pits, we developed a bioluminescence resonance energy transfer-based approach directly assessing the molecular steps involved in the endocytosis of GPCRs in living cells. For 10 of the 12 receptors tested, including some that were previously suggested to internalize via clathrin-independent pathways, agonist stimulation promoted β -arrestin 1 and 2 interaction with β 2-adaptin, indicating a β -arrestin- and clathrin-dependent endocytic process. Detailed analyses of β -arrestin interactions with both the receptor and β 2-adaptin also allowed us to demonstrate that recruitment of β -arrestins to the receptor and the ensuing conformational changes are the leading events preceding AP-2 engagement and subsequent clathrin-mediated endocytosis. Among the receptors tested, only the endothelin A and B receptors failed to promote interaction between β -arrestins and β 2-adaptin. However, both receptors recruited β -arrestins upon agonist stimulation, suggesting a β -arrestin-dependent but clathrin-independent route of internalization for these two receptors. In addition to providing a new tool to dissect the molecular events

involved in GPCR endocytosis, the bioluminescence resonance energy transfer-based β -arrestin/ β 2-adaptin interaction assay represents a novel biosensor to assess receptor activation.

G protein-coupled receptors (GPCRs)⁷ are seven transmembrane domain receptors that constitute the largest family of cell surface proteins involved in signal transduction. In humans, it is estimated that GPCRs are encoded by ~800 distinct genes that control a variety of important physiological responses (1). Following agonist binding, GPCRs undergo conformational changes that regulate the activity of downstream effector systems to mediate various cellular responses. The extent and duration of GPCR signaling is tightly regulated by mechanisms that terminate the initial signaling and later re-establish the capacity of the receptors to respond to new agonist exposure. The removal of GPCRs from the cell surface, also known as internalization or endocytosis, plays an important role in these processes (2, 3). For most GPCRs, rapid feedback desensitization is initiated by G protein-coupled receptor kinases that phosphorylate agonist-occupied GPCRs to create high affinity binding sites for β -arrestins, which in turn uncouple the receptor from its cognate G protein (reviewed in Ref. 4). β -Arrestins also target receptors for endocytosis by linking them to the endocytic machinery, including clathrin and the clathrin adaptor AP-2 (5–11). By controlling receptor recycling following endocytosis, β -arrestins have also been shown to regulate the rate of receptor resensitization (12). Based on their interaction

* This work was supported in part by research grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (to M. B. and S. A. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Current address: Saint-Justine Hospital Research Center, Dept. of Genetics, Université de Montréal.

³ Recipients of CIHR postdoctoral fellowships.

⁴ Current address: Biological Sciences Dept., University of California, San Diego.

⁵ Holds a Canada research chair in molecular endocrinology.

⁶ Michel Bouvier holds a Canada research chair in signal transduction/molecular pharmacology. To whom correspondence should be addressed: Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Center-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. Tel.: 514-343-6319; Fax: 514-343-6843; E-mail: [REDACTED]

⁷ The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; AVP, 8-arginine-vasopressin; AP-21967, synthetic heterodimerizer binding with high affinity to both cyclophilin FKBP and FRB fragments; AT1aR, angiotensin II receptor; β 2AR, β 2-adrenergic receptor; B2R, bradykinin B2 receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; C5a, complement component 5a; C5aR, the complement component C5a receptor; CCR5, CC-chemokine 5 receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; dynl(K44A), dominant negative mutant of dynamin I; EP4R, prostaglandin EP4 receptor; ET1, endothelin; ETAR, endothelin A receptor; ETBR, endothelin B receptor; FKBP, cyclophilin fragments; FRB, cyclophilin fragment; G418, Geneticin; GFP, green fluorescent protein; HEK, human embryonic kidney cells; HRP, horseradish peroxidase; M2R, M2 muscarinic receptor; PEI, polyethyleneimine; *Rluc*, *Renilla reniformis* luciferase; V1aR, V1a vasopressin receptor; V2R, vasopressin V2 receptor; VIP, vasoactive intestinal peptide 1; VIP1R, vasoactive intestinal peptide 1 receptor; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; PBS, phosphate-buffered saline; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HA, hemagglutinin; siRNA, small interference RNA.

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

with β -arrestins, GPCRs are divided into two main classes. Class A, which includes receptors such as the β 2-adrenergic (β 2AR), endothelin A (ETAR), and V1a vasopressin (V1aR), interacts transiently with β -arrestins and can rapidly recycle back from the endosomes to the cell surface (13, 14). Class B receptors, such as vasopressin V2 (V2R), CC-chemokine 5 (CCR5), prostaglandin EP4 (EP4R), and vasoactive intestinal peptide 1 (VIP1R), interact more stably with β -arrestins, leading to a complex that resides for extended periods of time into endosomes. Receptors tightly associated with β -arrestins in endosomes are only poorly recycled to the cell surface and eventually targeted for lysosomal degradation (13–17). The two classes of receptors also differ by their binding preference toward β -arrestin1 and β -arrestin2. Indeed, whereas class A receptors binds with greater affinity to β -arrestin2, class B receptors do not show preference between the two β -arrestins (13). More recently, it was suggested that some receptors may not be easily classified in class A or B. For example, the bradykinin B2 receptor (B2R) was found to internalize with β -arrestins into endosomes but can then dissociate from β -arrestin and efficiently recycle to the plasma membrane after agonist removal (18). The authors suggested that receptors with such hybrid features could be referred to as class C.

Although the roles of β -arrestins and clathrin-coated vesicles in GPCR endocytosis have been well characterized, alternative pathways involving non-coated vesicles, such as caveolae, or other non-clathrin and non-caveolae mediated routes, have also been described for several receptors (reviewed in Refs. 2, 3, 19). Also, the requirement for β -arrestin does not seem to be universal, and endocytosis of some GPCRs through either clathrin-coated vesicles or caveolae was proposed to be β -arrestin-independent (20). To characterize the various endocytic routes used by different receptors, several pharmacological and biochemical tools have been used. These include blockers that do not discriminate between clathrin-dependent or caveolae-mediated endocytosis (e.g. hypertonic sucrose, low temperature, concanavalin-A, and dominant negative mutants of dynamin) as well as inhibitors that are believed to selectively inhibit clathrin-coated vesicle (e.g. monodansylcadaverine, chlorpromazine, as well as dominant negative mutants of β -arrestin and Eps-15) or caveolae-mediated endocytosis (e.g. filpin and nystatin) (3, 19, 21, 22). Although these approaches have been useful, the interpretation of their data was sometimes difficult and generated some controversies on the exact mechanism underlying the endocytosis of certain GPCRs. For example, inhibition of endocytosis by dominant negative mutants of β -arrestins (β -arrestin1(V53D), β -arrestin1-(319–418), and β -arrestin2(Δ LIELD/F391A) (7, 23, 24)) or a dominant negative of the AP-2 interacting protein Eps15 (25) has often been used to suggest the involvement of a clathrin-mediated process. However, in the case of the ETAR, endocytosis through caveolae was also inhibited by a dominant negative mutant of β -arrestin (20). Similarly, inhibiting Eps15 has been recently found to prevent caveolae-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor (26). Off-target effects of dominant negative mutants can also complicate interpretation of the results. For instance, whereas it was initially believed that β -arrestins were specific regulators for GPCRs, growing evidences demon-

strate its role in the regulation of non-GPCRs membrane proteins endocytosis (27). Although this may reflect direct interaction of β -arrestins with non-GPCR proteins (28), it could also result from the interference with components of the endocytic machinery that could be shared by clathrin- and caveolae-mediated routes.

The above discussion illustrates the importance of developing new tools that will allow the direct assessment of the molecular steps involved in the endocytosis of specific GPCRs. To generate one such tool, we took advantage of the fact that, for internalization, the β -arrestins binding to the β 2-adaptin subunit of the clathrin adaptor AP-2 are needed for the β -arrestin-mediated targeting of GPCRs to clathrin-coated pits (7, 8, 10, 29). Specifically, we designed a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assay that allows real-time monitoring of the interaction between β -arrestins and β 2-adaptin as a biosensor for β -arrestin-promoted clathrin-mediated endocytosis. BRET is a non-radiative energy transfer that occurs between the energy donor *Renilla* luciferase (*Rluc*) and variants of the green fluorescent proteins (EYFP for BRET¹ and GFP, GFP², or Tsapphire for BRET²) as the energy acceptor only when the two proteins are within 100 Å from one another and situated in favorable orientation, making it an attractive assay for studying both inducible and constitutive protein-protein interactions (30, 31). Thus, in response to the activation of 12 different GPCRs, previously suggested to internalize via different endocytic routes, BRET¹ was assessed between β -arrestin-*Rluc* and β 2-adaptin-EYFP and used as an indicator of clathrin-mediated endocytosis involving β -arrestins. By combining the spectrally resolved BRET¹ and BRET² technologies, we could simultaneously assess the recruitment of β -arrestin to GPCR and β -arrestin/AP-2 interaction, which allowed us to monitor the kinetics of the two events. The data obtained herein show that some of the GPCRs previously suggested to internalize via a clathrin-independent pathway were capable of promoting β -arrestin interaction with AP-2. Thus, contrary to what was deduced from indirect methods, these receptors internalize via a β -arrestin- and clathrin-dependent mechanism. Other receptors, such as ETAR and ETBR, which are capable of recruiting β -arrestins but were shown to internalize via caveolae, did not promote β -arrestin interaction with β 2-adaptin, indicating a β -arrestin-dependent but clathrin-independent endocytic process. In addition to providing a new tool to dissect the molecular events involved in GPCR endocytosis, the BRET-based β -arrestin/ β 2-adaptin interaction assay can also be used to detect constitutive receptor internalization and quantify receptor activation in a pharmacologically relevant manner.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, Geneticin (G418), L-glutamine, and penicillin-streptomycin were purchased from Wisent. Fugene6 was obtained from Roche Diagnostics. Coelenterazine-*h* was from Prolume, and DeepBlueC was from Biotium. Recombinant human RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) was from PeproTech. Poly-D-lysine, 8-arginine-vasopressin (AVP), isoproterenol, bradykinin, human

recombinant C5a, prostaglandin E2, vasoactive intestinal peptide, endothelin-1 (ET1), and carbachol were from Sigma-Aldrich Canada. Antibodies against β 2-adaptin, α -adaptin, and clathrin were obtained from BD Biosciences. The anti-GFP was from Molecular Probes. White opaque and clear bottom 96-well plates were from Corning. Linear polyethyleneimine (25 kDa) was from Polysciences. Plate readers used to measure BRET in this study were the Mithras LB940 from Berthold for BRET¹ and a modified TopCount from Packard for BRET².

Expression Plasmids—The constructs presented herein were made using standard molecular biology techniques employing PCR and fragment replacement strategies. β -Arrestin2-Rluc and β -arrestin1-Rluc were generated by PCR amplification of the coding sequences of the rat β -arrestin2 (kindly provided by S. Marullo, Institute Cochin, Paris) and the rat β -arrestin1 (a gift from Kathryn DeFea, University of California, Riverside) without their stop codons that were ligated upstream of a humanized *Renilla reniformis* luciferase (*Rluc*, originally PCR-amplified from pRluc-N1 from PerkinElmer Life Sciences) in pcDNA3.1zeo+ (Invitrogen); both β -arrestin1 and β -arrestin2 were fused to *Rluc* via the same 6-amino acid linker (GSGTAT). *Rluc*- β -arrestin2-EYFP construct was made as described by Charest *et al.* (42). β -Arrestin2-(R393E,R395E)-*Rluc* DNA was obtained by subcloning the mutant β -arrestin2 into pcDNA3.1. V2R-EYFP construct was generated by amplifying V2R coding sequences by PCR without its stop codon and cloned upstream of EYFP in pRK5. β 2-Adaptin-EYFP was generated by subcloning the coding region, minus the stop codon, and coming from a human β 2-adaptin plasmid template (10) into pEYFP-N1 (Clontech). To construct V2R-Tsapphire, the coding sequence of Turbo Sapphire (32) was PCR-amplified and fused, in-frame, downstream of the V2R coding sequence lacking its stop codon (which was removed from V2R-VENUS-pIRESpuro3 (33)) and ligated into pcDNA3.1/zeo(+). EP4R and the complement component C5a receptor (C5aR) in pcDNA3.1(+) were from UMR cDNA Resource Center. The angiotensin II receptor (HA-AT1aR-pRc) expression construct was a gift from Dr. Sylvain Meloche (Université de Montréal, Montréal, Canada). The V2R-FKBP and FRB- β -arrestin2-*Rluc* (34), Myc-V2R(R137H) (35), HA- β 2AR (36), dynI(K44A) (37), Myc-V2R, Myc-V1aR (38), M2 muscarinic receptor (HA-M2R) (21), vasoactive peptide 1 receptor (FLAG-VIP1R) (21), endothelin receptor subtypes A and B (HA-ETAR and FLAG-ETBR (39)), CCR5 (18), and bradykinin receptor subtype 2 (HA-B2R) (40) expression constructs were previously described. Except for CCR5, EP4R, and C5aR, all GPCRs used in this study contained an N-terminal epitope tag (*e.g.* Myc, HA, or FLAG) that was previously shown not to compromise the activity of these receptors. For the purpose of brevity, unless stated otherwise, GPCRs used here will be identified by their names only without indicating their N-terminal epitope tag. All GPCRs used herein were from human cDNAs, except for the VIP1R, which was from rat.

Cell Culture, Plasmid Transfections, and Stable Cell Line Production—Unless otherwise stated, human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in high glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin-streptomycin, and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified chamber at 95% air and 5% CO₂. For transient transfec-

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

tions in 6-well plates, 400,000 HEK293T cells were seeded and transfected the next day using Fugene6 according to manufacturer's recommendations. For transfections in 100-mm plates, cells were seeded at a density of 2.5 million cells/plate in DMEM containing 5% fetal bovine serum and transfected the next day using polyethyleneimine (PEI, 25-kDa molecular mass, linear form prepared at 1 mg/ml in sterile distilled H₂O) at a DNA:PEI ratio of 1:3. Plasmid DNA and PEI were diluted, each in separate tubes, with 500 μ l of NaCl solution (150 mM). The PEI solution was then added onto the DNA solution, vortexed at maximum speed for 5 s, and incubated at room temperature for 20 min prior to addition to the cells. To generate cells stably expressing β 2-adaptin-EYFP (HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP), transfected cells were selected with 1 mg/ml G418. Clonal cells expressing β 2-adaptin-EYFP were obtained by limited dilution and were tested for expression of β 2-adaptin-EYFP by fluorescence measurements and Western blotting. HEK293T cells stably expressing MycV2R (HEK293T/V2R) were generated by selection with 0.45 mg/ml G418, and a clonal cell line (41) expressing \sim 8 pmol/mg of V2R was used for transient cotransfection of β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-*Rluc*.

Immunoprecipitation and Western Blotting—Immunoprecipitation experiments were carried out as described previously (65). Immunoprecipitated proteins were separated on 6% SDS-PAGE, whereas proteins from total cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE before transfer onto nitrocellulose membranes. Protein immunodetection on membranes was assessed using either anti- β 2-adaptin (0.2 μ g/ml), anti- α -adaptin (0.25 μ g/ml), anti-clathrin (0.25 μ g/ml), or anti-GFP (2 μ g/ml) (65) antibodies.

Total Fluorescence Measurements—To measure total fluorescence, cells were washed once with PBS-Mg (PBS containing 0.5 mM MgCl₂), gently detached by pipetting in PBS-Mg, and seeded at a density of \sim 100,000 cells/well in 96-well plates (white wall with clear bottom plates). All throughout this study, cell number quantification was based on measuring the A₆₀₀ of the cell suspension and correlating it to a pre-established standard curve (A₆₀₀ versus cell number). The fluorescence level was measured using a FlexStation II (Molecular Devices). For measuring fluorescence of V2R-Tsapphire, transfected cells were excited at 400 nm, and the emission was recorded at 511 nm (cut-off at 490 nm), whereas measurements of β 2-adaptin-EYFP fluorescence were done at an excitation wavelength of 470 nm and emission wavelength of 535 nm (cut-off at 500 nm).

Monitoring Protein-Protein Interaction Using BRET¹—Approximately 18 h after transfection, cells were detached by trypsinization and seeded (\sim 50,000 cells/well) into 96-well (white wall, clear bottom) tissue culture plates previously treated with poly-D-lysine, and re-incubated at 37 °C for another 18 h. On the day of the experiment, the culture medium was replaced by PBS-Mg and incubated with or without various concentrations of the tested agonist for the specified time at room temperature. To measure the BRET¹ signal, the transparent bottom of the 96-well plate was covered with a white-backed tape adhesive (PerkinElmer Life Sciences), and the BRET¹ substrate for *Rluc*, coelenterazine-*h*, was added to all wells (5 μ M final concentration), followed by BRET¹ measurement on the Mithras LB940 plate reader, which allows the

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

sequential integration of signals detected in the 480 ± 20 nm and 530 ± 20 nm windows. The BRET¹ signal was calculated as a ratio of the light emitted by EYFP (530 ± 20 nm) over the light emitted by Rluc (480 ± 20 nm). Unless otherwise stated, BRET¹ ratios were corrected by subtracting the background signal detected when β -arrestin-Rluc constructs were expressed in the absence of the EYFP fusion protein or the tested GPCR (in the case of the stable β 2-adaptin-EYFP cell line) to generate BRETnet values. Agonist-promoted BRET¹ was calculated by subtracting the BRET¹ ratio obtained in the absence of agonist addition from the one obtained in the presence of an agonist. In the case of kinetic measurements, coelenterazine-*h* was added simultaneously with the agonist, followed by BRET¹ measurements. Receptor agonists used herein were: AVP for V2R and V1aR, isoproterenol for β 2AR, bradykinin for B2R, vasoactive intestinal peptide for VIP1R, ET1 for ETAR and ETBR, carbachol for M2R, RANTES for CCR5, recombinant C5a for C5aR, prostaglandin E2 for EP4R, and angiotensin II for AT1AR.

Heterodimerizer-promoted β -Arrestin2 Interaction with V2R—HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were transfected with V2R-FKBP and FRB- β -arrestin2-Rluc (34) or with V2R and β -arrestin2-Rluc. Heterodimerization of V2R-FKBP and FRB- β -arrestin2-Rluc was initiated by cell treatment with the heterodimerizer AP-21967 (20 min at room temperature), a chemically modified derivative of rapamycin. AP-21967 is a cell-permeable organic molecule with two separate motifs binding with high affinity to FKBP and FRB fragments, respectively (for details see Ariad on the web).

Concomitant Monitoring of β -Arrestin2 Interactions with V2R and with AP-2 by Combining BRET¹ and BRET²—HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were seeded in 100-mm dishes at a density of 2.5 million cells per plate. The next day, cells were co-transfected with different concentrations of the V2R-Tsapphire plasmid (0.25, 0.5, and 1 μ g) and 0.25 μ g of β -arrestin2-Rluc plasmid. Forty-eight hours post-transfection, cells were washed with PBS-Mg and then gently detached. Total fluorescence measurements were taken in 96-well plates containing \sim 100,000 cells/well, as described above. Cells were then dispensed into 96-well white opaque plates, and BRET¹ or BRET² kinetic measurements were done after the co-addition of 100 nM AVP and either 5 μ M coelenterazine-*h* (Rluc substrate for BRET¹) or coelenterazine DeepBlueC (Rluc substrate for BRET²). BRET² measurements were done using a modified TopCount plate reader that sequentially incorporates emission signals in the 370–450 nm and 500–530 nm ranges. The BRET² signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the V2R-Tsapphire (500–530 nm) over the light emitted by the β -arrestin2-Rluc (370–450 nm). Agonist-promoted BRET² was calculated by subtracting the BRET² ratio obtained in the absence from the one obtained in the presence of agonist. Agonist-promoted BRET¹ was calculated as described above.

Measurement of Cell Surface Receptor Expression by ELISA—Agonist-promoted internalization was assessed as described previously (37). Briefly, the culture medium was removed and replaced with DMEM/0.5% bovine serum albumin/20 mM HEPES in the presence or absence of the specific agonist. After 30-min incubation at 37 °C, the medium was removed and cells

were fixed with Tris-buffered saline/3.7% formaldehyde for 5 min at room temperature. Cell surface expression was measured using anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, for ETAR), anti-Myc (for V1aR, V2R wt, and V2R(R137H)), or anti-FLAG M2 (Sigma, for ETBR) monoclonal antibodies. The percentage of agonist-promoted receptor internalization was determined as follows: $(1 - \text{stimulated/unstimulated}) \times 100$.

β -Arrestin Knock-down—HEK293T cells were transfected with ETAR or ETBR plasmids along with minimal amount of β -arrestin1-Rluc and β -arrestin2-Rluc and either a specific siRNA targeting both β -arrestin1 and β -arrestin2 (AAAGC-CTTCTGCGCGGAGAAT) or a control siRNA (Santa Cruz Biotechnology). 18 h post-transfection, cells were seeded in 24-well plates and incubated at 37 °C for an additional 18–24 h. siRNA efficacy for β -arrestins knock-down expression was assessed by measuring the luminescence obtained from the co-expressed β -arrestin1-Rluc and β -arrestin2-Rluc and expressed as the percentage of luminescence obtained in cells transfected with the control siRNA.

Confocal Microscopy—HEK293T cells were transfected with β -arrestin2-GFP and either ETAR or ETBR constructs and treated with ET1 (10 nM) for the indicated time. β -Arrestin2-GFP images were collected on a Zeiss LSM-510 Meta laser scanning microscope.

RESULTS

Generation and Expression of β 2-Adaptin-EYFP—This study was designed to monitor agonist-induced interaction between β -arrestins and AP-2 in living cells, thus, providing a sensitive detection for the early events of β -arrestin-promoted clathrin-mediated endocytosis of GPCRs. For this, we used a β 2-adaptin-EYFP fusion construct as a suitable BRET¹ partner (EYFP as energy acceptor) for β -arrestins fused to the energy donor Rluc (β -arrestin2-Rluc or β -arrestin1-Rluc). Western blot analyses of HEK293T cells transfected with the β 2-adaptin-EYFP construct confirmed that the protein was efficiently expressed. Indeed, a band migrating at \sim 130 kDa, corresponding to the expected molecular mass of the β 2-adaptin-EYFP fusion protein was recognized by antibodies raised against either β 2-adaptin (Fig. 1A, lane 2) or GFP (that recognizes EYFP; Fig. 1A, lane 5). A lower band of \sim 105 kDa, corresponding to the molecular weight of the endogenous β 2-adaptin, was recognized only by the anti- β 2-adaptin antibody (compare lanes 1, 2, and 5 in Fig. 1A), in both transfected and untransfected cells. Transfection of wild-type β 2-adaptin increased the immunoreactivity of the 105-kDa band (Fig. 1A, lane 3), confirming that this band corresponds to the native protein. To confirm the ability of β 2-adaptin-EYFP to associate with its functional partners (43), co-immunoprecipitation experiments were carried out. As shown in Fig. 1B, immunoprecipitation of the fusion protein, using anti-GFP antibody, led to co-sedimentation of α -adaptin and clathrin, indicating that the fusion of β 2-adaptin with EYFP did not prevent its association with the native AP-2/clathrin complex (Fig. 1B).

Monitoring Agonist-promoted Interaction between β 2-Adaptin/EYFP and β -Arrestin-Rluc in Living Cells by BRET¹—To determine whether GPCR-promoted interaction between

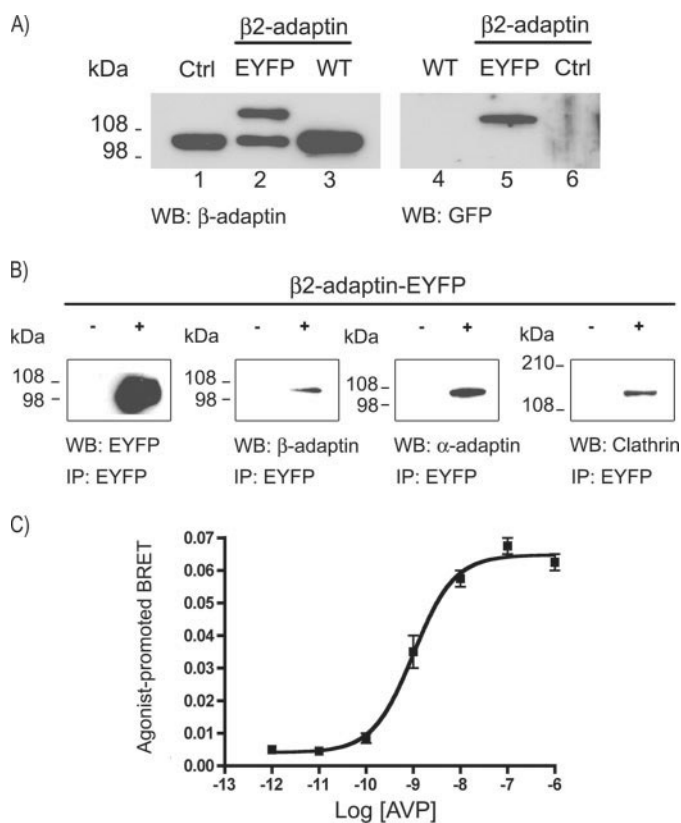
Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

FIGURE 1. Characterization of $\beta 2$ -adaptin-EYFP. *A*, HEK293T cells were transiently transfected or not (Ctrl) with $\beta 2$ -adaptin wild-type (WT) or $\beta 2$ -adaptin-EYFP. Expression level of $\beta 2$ -adaptin in cell lysates was assessed by Western blot using anti- $\beta 2$ -adaptin (left panel) or anti-GFP (right panel) antibodies. *B*, cell lysates from HEK293T expressing (+) or not (-) $\beta 2$ -adaptin-EYFP were immunoprecipitated (IP) using an anti-GFP antibody, and the immunoprecipitates were analyzed by Western blot (WB) using either anti-GFP, anti- $\beta 2$ -adaptin, anti- $\alpha 2$ -adaptin, or anti-clathrin antibodies. *C*, HEK293T/V2R cells were co-transfected with $\beta 2$ -adaptin-EYFP and β -arrestin2-Rluc, and BRET¹ measurements were done after 20-min incubation with the indicated concentration of the V2R agonist AVP. Data shown are representative of two to three experiments (*A* and *B*) or are the mean \pm S.E. of three independent experiments (*C*).

TABLE 1

BRET¹ kinetics of association and comparison of generated EC₅₀ with agonist affinity values obtained from other established assays

Receptor classification with respect to interaction with β -arrestins is indicated under "class" (Refs. 13–17, 51). The half-time ($t_{1/2}$) of the maximal association between β -arrestin2-Rluc and $\beta 2$ -adaptin-EYFP in response to treatment with agonists (100 μ M for M2R and 100 nM for all other receptors) was calculated from non-linear regression analysis of BRET¹ association kinetics curves. BRET¹max represents the agonist-promoted BRET¹ ratio obtained at maximum agonist stimulation. The BRET¹EC₅₀ values were determined from non-linear regression of dose-response BRET¹ curves. BRET¹EC₅₀ values were compared to previously published affinity values for the same agonists. Data are the mean \pm S.E. of 3–5 independent experiments.

Receptor	Agonist	Class	BRET ¹ $t_{1/2}$	BRET ¹ max	BRET ¹ EC ₅₀	Other EC ₅₀ or K_d	Ref.
			min			nM	
V1aR	AVP	A	1.7 \pm 0.3	0.06 \pm 0.002	1.6 \pm 0.5	0.5 \pm 0.2 ^a	(38)
$\beta 2$ AR	Isoproterenol	A	3.5 \pm 0.5	0.05 \pm 0.002	10 \pm 1.3	13.9 \pm 3.9 ^b	(66)
ETAR	Endothelin-1	A	ND ^c	ND	ND	0.2 ^a	(67)
ETBR	Endothelin-1	? ^d	ND	ND	ND	0.3 ^a	(67)
VIP1R	VIP	B	2.9 \pm 0.6	0.13 \pm 0.003	1.9 \pm 0.2	4.0 ^e	(17)
V2R	AVP	B	3.0 \pm 0.1	0.13 \pm 0.004	1.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1 ^b	(66)
AT1aR	Angiotensin II	B	1.8 \pm 0.5	0.07 \pm 0.002	2.8 \pm 0.3	2.0 ^e	(68)
EP4R	PGE2	B	5.3 \pm 1.0	0.07 \pm 0.004	1.3 \pm 0.3	2.2 \pm 0.6 ^b	(16)
C5aR	C5a	B	4.2 \pm 0.9	0.08 \pm 0.003	9.5 \pm 1.0	5.2 \pm 2.5 ^e	(69)
CCR5	RANTES	B	8.9 \pm 0.5	0.09 \pm 0.002	2.7 \pm 0.7	1.0 ^e	(70)
B2R	Bradykinin	C	3.8 \pm 0.5	0.12 \pm 0.009	0.5 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1 ^e	(18)
M2R	Carbachol	? ^d	3.3 \pm 0.3	0.085 \pm 0.005	800 \pm 23	1100 \pm 150 ^f	(71)

^a Phosphatidylinositol hydrolysis.

^b cAMP accumulation.

^c ND, signal not detected.

^d ? = not classified.

^e Radioligand binding.

^f Inhibition of cAMP production.

β -arrestin and $\beta 2$ -adaptin could be detected by BRET in living cells, we initially measured BRET¹ between β -arrestin2-Rluc and $\beta 2$ -adaptin-EYFP that were transiently co-transfected into HEK293T/V2R cells. The BRET¹ signal was measured in the absence and presence of increasing concentrations of the V2R agonist AVP. Fig. 1C shows that AVP promoted a concentration-dependent increase in BRET¹, indicative of an association between β -arrestin2-Rluc and $\beta 2$ -adaptin-EYFP. The EC₅₀ calculated for this agonist-promoted interaction was 1.2 nM, a value in good agreement with the published affinity of AVP for V2R (38). These data validate the use of the $\beta 2$ -adaptin-EYFP/ β -arrestin-Rluc pair as a biosensor to monitor the early event in the receptor-promoted formation of the endocytic complex involving β -arrestin and AP-2.

To develop a robust system that allows monitoring of β -arrestin/AP-2 interaction by distinct receptors, we generated a HEK293T/ $\beta 2$ -adaptin-EYFP cells in which constant amounts of GPCR and β -arrestin-Rluc constructs could then be co-transfected. Twelve GPCRs were selected for this study (Table 1). The GPCRs were chosen to include receptors belonging to classes A, B, and C, as defined by their β -arrestin interaction profile (13, 18). The list also included receptors that were previously proposed to undergo clathrin-dependent or -independent pathways. Agonist activation of VIP1R, V2R, V1aR, B2R, $\beta 2$ AR, CCR5, EP4, C5aR, AT1aR, and M2R resulted in an increase in agonist-promoted BRET¹, indicative of association between β -arrestin2-Rluc and $\beta 2$ -adaptin-EYFP. This effect was selective, because agonist-promoted BRET¹ was detected only when GPCRs were incubated with their respective agonist and not with irrelevant agonists (data not shown). The time and the concentration dependence of the agonist-promoted association are illustrated in Fig. 2 (*A* and *B*) for representative receptors and the parameters ($t_{1/2}$, EC₅₀, and maximal BRET¹ values) of the curves obtained for all tested receptors are presented in Table 1. Although the $t_{1/2}$ varied from 1.7 to 8.9 min between individual receptors, in all cases the BRET¹ signal reached a plateau after 12 min of stimulation with saturating concentra-

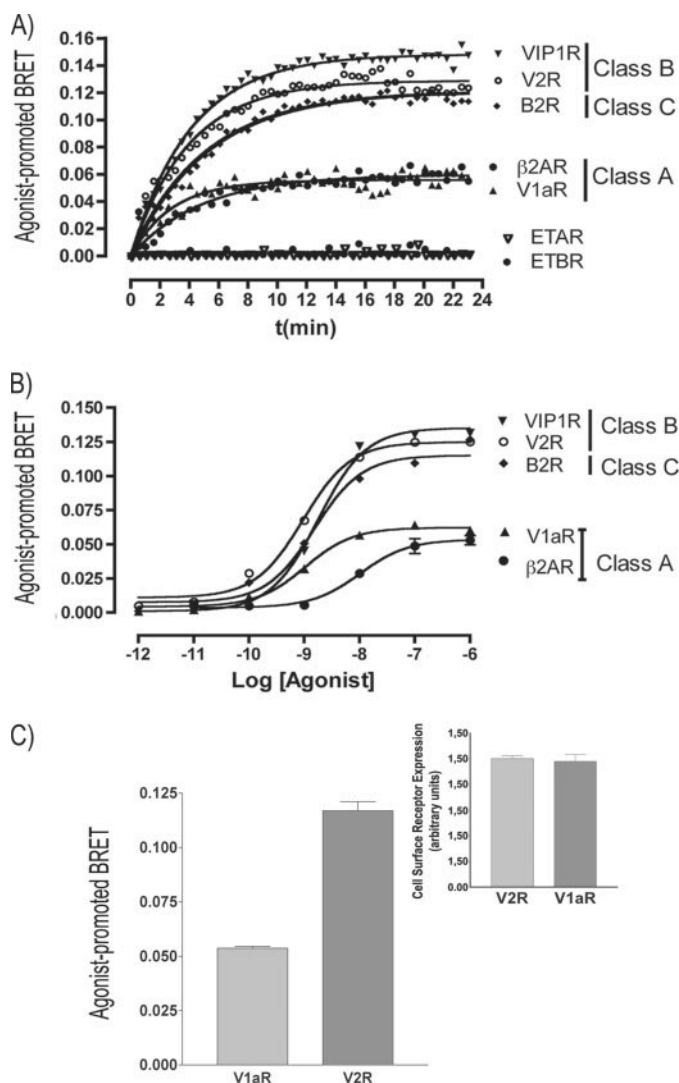
Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

FIGURE 2. Kinetics and dose dependence of agonist-promoted interaction between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-Rluc. HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were co-transfected with β -arrestin2-Rluc and the indicated GPCRs. *A*, real-time BRET¹ measurements were taken at regular intervals for the indicated time period directly after the addition of coelenterazine-h and receptor specific agonists. *B*, cells were stimulated with the indicated concentrations of the receptor-specific agonists for 20 min at room temperature followed by BRET¹ measurements. For the agonist list, see Table 1. *C*, cells were stimulated with 100 nM AVP for 20 min followed by BRET¹ measurement. *Inset*, total cell surface expression of each receptor was assessed by cell surface ELISA assay using anti-Myc antibody.

tion of their respective agonists and remained constant for at least an additional 12 min. Therefore, for subsequent experiments, the BRET¹ signal was measured 20 min after agonist stimulation. For all GPCRs tested, the EC₅₀ values obtained for the concentration-dependent increase in BRET¹ agreed well with the known affinities of the agonists used for each receptor (Fig. 2*B* and Table 1). The maximal BRET¹ signals (BRET¹max) reached varied between 0.05 and 0.13 for the different receptors, with a tendency for class B receptors to promote higher BRET¹max values. Although consistent with the greater propensity of Class B receptors to interact stably with β -arrestin2, it is difficult to directly interpret this difference, because the expression levels between receptors may have differed. However, in experiments where receptor expression levels were

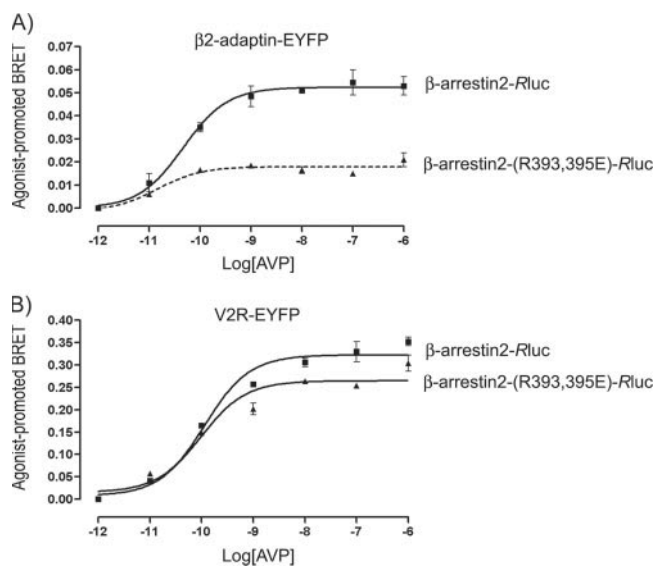


FIGURE 3. Agonist-induced interactions of β -arrestin2-Rluc and β -arrestin2-(R393-395E)-Rluc with β 2-adaptin-EYFP and V2R-EYFP. *A*, HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were transiently co-transfected with V2R and either β -arrestin2-Rluc or β -arrestin2-(R393-395E)-Rluc. *B*, HEK293T cells were co-transfected with V2R-EYFP and either β -arrestin2-Rluc or β -arrestin2-(R393-395E)-Rluc. *A* and *B*, BRET¹ measurements were done after 20-min incubation with the indicated concentrations of AVP. Data are the mean \pm S.E. of three to five independent experiments.

controlled by surface ELISA (using anti-Myc antibodies) for the class A (MycV2R) and class B (MycV1aR), significantly higher BRET¹max signals were promoted by V2R as compared with V1aR. This indicates that the greater affinity of β -arrestin2 to interact with class B receptors can be reflected in the BRET-based β -arrestin/AP-2 interaction assay (Fig. 2*C* and *inset*).

To confirm that the BRET¹ signal observed truly reflects the association between β -arrestin and β 2-adaptin, we took advantage of a mutant form of β -arrestin2, β -arrestin2-(R393E,R395E), which is unable to associate with β 2-adaptin but can still undergo recruitment to the agonist-stimulated receptor (7, 44). For this purpose, HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were co-transfected with the V2R construct and either β -arrestin2-(R393E,R395E)-Rluc or WT β -arrestin2-Rluc. As can be seen in Fig. 3*A*, AVP promoted a robust increase in BRET¹ between β 2-adaptin-EYFP and WT β -arrestin2-Rluc but not β -arrestin2-(R393E,R395E)-Rluc. The ability of β -arrestin2-(R393E,R395E)-Rluc to be recruited to the receptor was confirmed in independent experiments monitoring the agonist-promoted BRET¹ between V2R-EYFP and both WT β -arrestin2-Rluc and β -arrestin2-(R393E,R395E)-Rluc (Fig. 3*B*). The detection of similar BRET¹ signals for the two β -arrestin2 constructs confirmed that the lack of signal between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-(R393E,R395E)-Rluc reflected the loss of association between these two proteins and not an impairment of β -arrestin translocation to the receptor, thus validating the β 2-adaptin-EYFP/ β -arrestin2-Rluc pair as a specific biosensor for the receptor promoted β -arrestin/AP-2 interaction.

Although β -arrestin2 has been studied more extensively than other non-visual arrestins, β -arrestin1 has also been shown to interact with AP-2 upon activation of certain GPCRs (7, 10). Thus, we assessed the ability of the BRET-based assay to

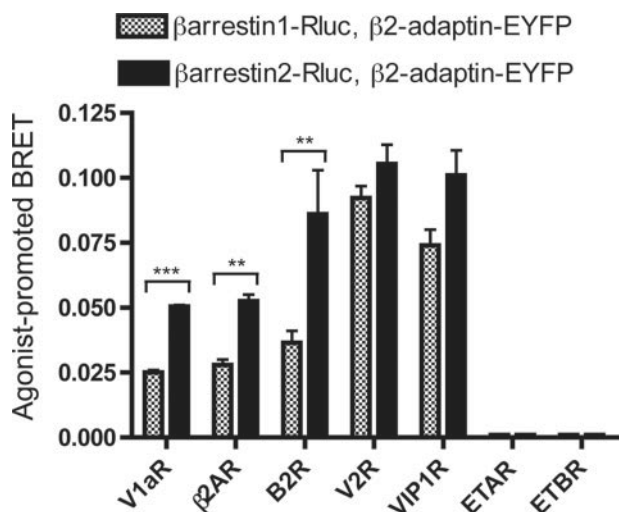


FIGURE 4. Agonist-induced interactions of β -arrestin2-Rluc and β -arrestin1-Rluc with β 2-adaptin-EYFP. HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were co-transfected with either β -arrestin1-Rluc or β -arrestin2-Rluc and the indicated GPCRs. BRET¹ measurements were done after 20-min incubation with 100 nM receptor-specific agonists. Data are the mean \pm S.E. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.005$.

detect this interaction on a representative subset of the GPCRs tested above. As shown in Fig. 4, agonist activation of the V1aR, β 2AR, B2R, V2R, and VIP1R resulted in an increase in BRET¹ between β -arrestin1-Rluc and β 2-adaptin-EYFP, confirming that these receptors can promote the interaction between AP-2 and either β -arrestin1 or -2. Interestingly, the extent of signal generated by β -arrestin1 and β -arrestin2 was identical when promoted by the maximal activation of V2R and VIP1R, two prototypical class B receptors that display identical ability to interact with the two β -arrestins (13). In contrast, maximal activation of the class A receptors, V1aR and β 2AR, led to weaker signals with β -arrestin1 than β -arrestin2, consistent with their reported lower propensity to associate stably with β -arrestin1 (13). For the B2R, although its propensity to colocalize in endosomes with β -arrestin2 (18) suggest a class B receptor, the weaker signal observed between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin1-Rluc as compared with β -arrestin2-Rluc would be more consistent with a class A. This hybrid behavior is consistent with the observation by Simaan *et al.* (18) that, in contrast with prototypical class B receptors, the B2R once in the endosomes can dissociate from β -arrestin2 upon removal of the agonist, allowing the recycling of the receptor to the cell surface. The direct comparison of the interaction profile between β 2-adaptin and the two β -arrestins promoted by different receptors is made possible by the fact that energy donor/acceptor ratio (Rluc/EYFP) can be maintained constant independently of the receptor being expressed. In that respect, the present assay provides an advantage over the direct monitoring of β -arrestins to the receptor, because the identities of the BRET partners used are the same, independently of the receptor being studied. Thus, the β -arrestin-Rluc/ β 2-adaptin-EYFP BRET assay provides a useful tool to classify GPCRs according to their profile of interaction with the β -arrestin/AP-2 complex.

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

Among the receptors tested, only two, ETAR and ETBR, failed to promote the interaction between either β -arrestin2-Rluc or β -arrestin1-Rluc and β 2-adaptin-EYFP (Figs. 2A and 4). No BRET¹ signal could be detected even when agonist stimulation was maintained for 60 min (data not shown). To determine whether the lack of signal could result from the inability of these receptors to recruit β -arrestin, we used Double-Brilliance- β -arrestin (Rluc- β -arrestin2-EYFP), a biosensor that allows monitoring of conformational changes of β -arrestin2 by intramolecular BRET¹ upon translocation to the receptor (42). As can be seen in Fig. 5A, agonist (ET1) activation of HEK293T cells co-transfected with ETAR or ETBR and Double-Brilliance- β -arrestin induced an increase in intramolecular BRET¹, indicating that these receptors recruited β -arrestin2 but failed to promote interaction between β -arrestin and AP-2. In addition, ET1-promoted translocation of β -arrestin2 to the plasma membrane was observed by fluorescence microscopy in HEK293T cells transfected with ETAR or ETBR (Fig. 5B). This is consistent with a previous report indicating that ETAR recruits β -arrestin2 following agonist activation (45). Also consistent with previous observations, ET1 stimulation led to the endocytosis of both ETAR and ETBR, as evidenced by the decrease in the receptor cell surface expression detected by ELISA following agonist treatment (Fig. 5C). Moreover, involvement of β -arrestins in ETAR and ETBR agonist-induced internalization could be demonstrated by interfering with β -arrestins expression by the use of siRNAs targeting β -arrestin1 and β -arrestin2. Indeed, transfection of these siRNAs, which led to a significant reduction in both β -arrestin1 and β -arrestin2 levels, significantly blocked ETAR and ETBR agonist-promoted internalization (Fig. 5C). Selective knock-down of β -arrestin2 led to a similar inhibition of the endocytosis (data not shown), indicating a predominant role for β -arrestin2. Taken together these data indicate that ETAR and ETBR can be endocytosed by a β -arrestin-dependent but AP-2-independent pathway, suggesting a non-clathrin-mediated endocytosis for these receptors.

Agonist-independent Association between β -Arrestin and β 2-Adaptin Reveals Receptor Constitutive Internalization—Recently, mutations leading to constitutive endocytosis in the absence of ligand stimulation have been described for several GPCRs (46). Among those, substitution of arginine 137 by a histidine residue within the V2R has been found to promote the constitutive recruitment of β -arrestin to the receptor and the ensuing endocytosis of the complex (35, 47). To investigate whether constitutive internalization of GPCRs also involves β -arrestin/AP-2 interaction, we performed BRET¹ experiments on HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells transiently co-transfected with β -arrestin2-Rluc and either the wild-type or a constitutively internalizing V2R mutant, V2R(R137H). In the absence of agonist stimulation, V2R(R137H) promoted a slightly higher basal BRET¹ signal between β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP than the wild-type V2R, and this, despite a lower cell surface expression, is consistent with its constitutive endocytosis (Fig. 6). Co-expression of the dominant negative mutant of dynamin I, dynI(K44A), that prevents the pinching off of endocytic vesicles from the plasma membrane further revealed the difference in BRET¹ signal promoted by V2R(R137H) versus WT (Fig. 6).

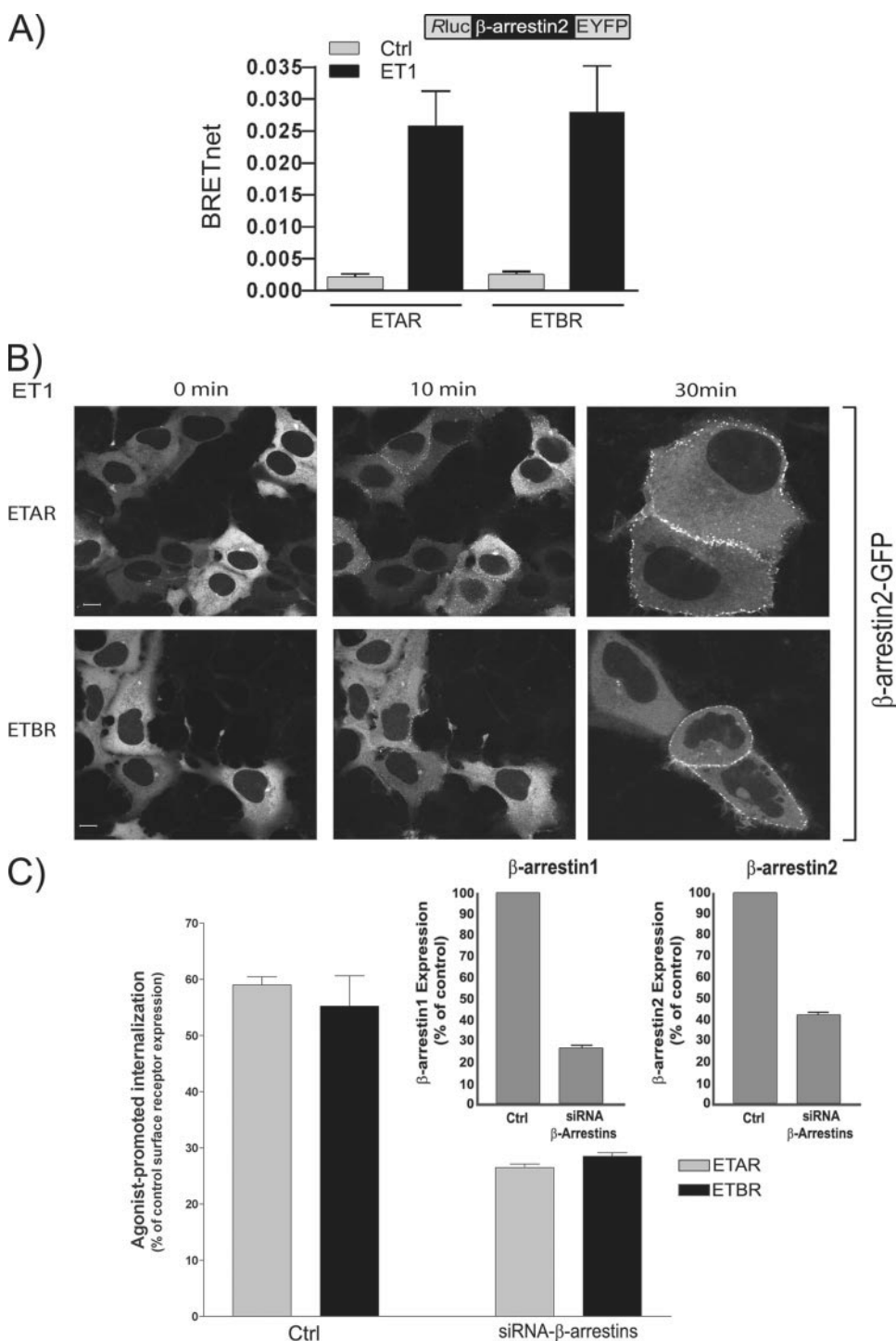
Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

FIGURE 5. Agonist-induced β -arrestin2 recruitment to ETAR and ETBR and receptor internalization. *A*, HEK293T cells were co-transfected with ETAR or ETBR and *Rluc*- β -arrestin2-EYFP (Double-Brilliance), and BRET¹ was measured after 20 min of agonist (+ET1, 10 nM) or vehicle treatment (*Ctrl*). *B*, HEK293T cells were transfected with β -arrestin2-GFP and either ETAR or ETBR and treated with 10 nM of ET1 for the indicated time period. β -Arrestin2-GFP translocation to the plasma membrane was observed using confocal fluorescence microscopy. *C*, HEK293T cells were transfected with HA-ETAR or FLAG-ETBR and either a control siRNA (*Ctrl*) or a siRNA targeting both β -arrestin1 and β -arrestin2 (*siRNA- β -arrestins*). Surface expression of each receptor was assessed by ELISA, in the absence or presence of 10 nM ET1, using anti-Ha (for ETAR) or anti-FLAG (for ETBR) antibodies, and the percentage of agonist-promoted receptor internalization was determined. The effect of siRNA on β -arrestin1 and β -arrestin2 expression levels was assessed by measuring the reduction of luminescence activity originating from low level of co-transfected β -arrestin1-*Rluc* and β -arrestin2-*Rluc*. Data are the mean \pm S.E. (*A* and *C*) of four independent experiments or are representative (*B*) of two independent experiments.

The increase in the V2R(R137H)-promoted BRET¹ observed in the presence of dynI(K44A) most likely results from the accu-

advantage of a cyclophilin-based approach developed on the ability of a synthetic bivalent heterodimerizer compound,

mulation of the receptor in the clathrin-coated pits at the cell surface (as illustrated by the increase in cell surface receptor detected by ELISA, Fig. 6, *inset*) where the constitutive formation of the V2R(R137H)/ β -arrestin2/AP-2 complex can be detected. This is consistent with the role of dynamin that promotes severing of the clathrin-coated pits but is not involved in the assembly of the early endocytic machinery. The observation, that the BRET¹ signal promoted by V2R(R137H) in the presence of dynI(K44A) is of the same magnitude as that observed following agonist activation of the wild-type receptor by AVP, suggests that the R137H mutation can promote the formation of the receptor/ β -arrestin/AP-2 complex as efficiently as the activated wild-type receptor. Taken together, these results confirm that constitutive endocytosis of V2R(R137H) and agonist-promoted internalization of the wild-type receptor involve the same initial steps of the clathrin-dependent pathway involving the interaction between β -arrestin and AP-2.

Receptor Activity-independent Recruitment of β -Arrestin2 Promotes Interaction between β -Arrestin2 and AP-2—Because it was previously shown that agonist stimulation of the α 1A-adrenergic receptor (48) could directly promote the recruitment of AP-2 (through its μ subunit) to the receptor, one could envisage that the interaction between β -arrestin and AP-2 could follow their independent recruitment to the activated receptor. Alternatively, the interaction between β -arrestin and AP-2 may reflect a direct recruitment of AP-2 to β -arrestin following the translocation of β -arrestin to the receptor. To distinguish between these two possibilities, we assessed whether the recruitment of β -arrestin to the receptor, independently of agonist-promoted receptor activation, is sufficient to promote the interaction between β -arrestin and AP-2. For this purpose, we took

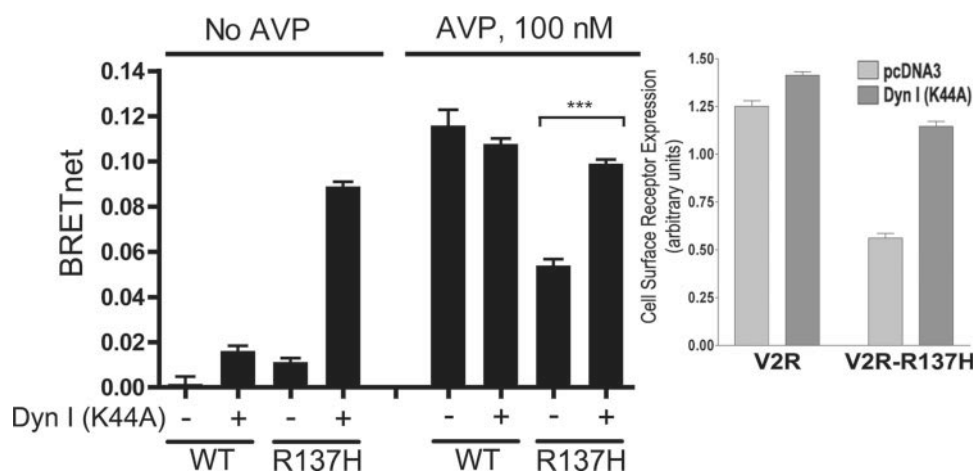


FIGURE 6. **V2R(R137H) promoted interaction between β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP.** HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were co-transfected with wild type (WT) or mutant (R137H) V2R and β -arrestin2-Rluc, with or without dynI(K44A). BRET¹ was measured in the absence or presence of 100 nM AVP (20-min treatment at room temperature). *Inset:* cell surface expressions of Myc-V2R and Myc-V2R(R137H) were assessed by cell surface ELISA assay using anti-Myc antibody. Data are the mean \pm S.E. of three independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. ***, $p < 0.0001$.

AP-21967, to function as a high affinity adaptor to link the cyclophilin FRB and FKBP protein domains. The fusion of FRB to the N terminus of β -arrestin2-Rluc and FKBP to the C terminus of V2R was previously shown to allow the recruitment of β -arrestin to the receptor upon AP-21967 treatment, in the absence of AVP. Such agonist-independent β -arrestin recruitment did not result in G protein activation but induced the internalization of the V2R-FKBP (34). Fusions with the cyclophilin domains were also shown not to affect the functionality of either β -arrestin2 or V2R (34). As shown in Fig. 7, treatment with AP-21967 induced a concentration-dependent BRET¹ between β 2-adaptin-EYFP and FRB- β -arrestin2-Rluc in cells co-expressing V2R-FKBP. No such BRET¹ was observed in cells expressing V2R and β -arrestin2-Rluc not fused to FKBP and FRB, respectively. These data clearly indicate that recruitment of β -arrestin to the receptor, even in the absence of agonist activation, is sufficient to induce β -arrestin/AP-2 association. It has previously been suggested that the interaction between a phosphate sensor within β -arrestin and the phosphorylated tail of the receptor contributes to the conformational rearrangements leading to the engagement of AP-2 (7). Given that the agonist-independent recruitment of β -arrestin promoted by AP-21967 should not promote receptor phosphorylation, our data suggest that β -arrestin conformational rearrangements promoted by its interaction with the receptor, even in the absence of the phosphorylation, may be sufficient to trigger the interaction between β -arrestin and AP-2.

Association Kinetics between V2R/ β -Arrestin2 versus β -Arrestin2/ β 2-Adaptin as Measured by Combining BRET¹ and BRET²—From the above discussion, one would predict that β -arrestin translocation to the receptor would precede β -arrestin/AP-2 interaction. To directly test this prediction, we took advantage of the availability of two different coelenterazine substrates whose oxidation by Rluc results in resolved light emission spectra, allowing differential energy transfer to two different derivatives of GFP (49). Oxidation of DeepBlueC by Rluc (used in BRET²) results in a maximal light emission at 400

nm, thus allowing efficient energy transfer to GFP variants such as GFP² or Tsapphire, whose maximum excitation wavelengths are \sim 400 nm, but permits only marginal energy transfer to EYFP (maximum excitation wavelength: \sim 511 nm). Conversely, Rluc-catalyzed oxidation of coelenterazine-*h* (used in BRET¹), which emits light with a peak emission at \sim 480 nm, allows energy transfer to EYFP but fails to excite Tsapphire. Therefore, it is possible to combine BRET¹ and BRET² in the same cells to follow two different protein-protein interaction events (49). For this, HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells transiently co-transfected with V2R-Tsapphire and β -arrestin2-Rluc were stimulated with AVP.

BRET¹ and BRET² were then used to monitor kinetics of interaction for the β -arrestin2-Rluc/ β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-Rluc/V2R-Tsapphire pairs, respectively. As shown in Fig. 8, the apparent association of β -arrestin2 to the receptor ($t_{1/2}$: 4.2 min) is faster than its interaction with AP-2 ($t_{1/2}$: 10 min). Because association kinetics may vary with different expression levels of the studied interactors, we further calculated the association half-times ($t_{1/2}$) from BRET¹ and BRET² under conditions where we varied the expression levels of V2R-Tsapphire in the presence of fixed levels of β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP (Table 2). Under all conditions, AVP stimulation resulted in β -arrestin2-Rluc/V2R-Tsapphire association that was in average 2.5 ± 0.1 times faster than the interaction between β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP. Taken together, these results are consistent with the notion that the formation of the receptor/ β -arrestin/AP-2 complex is initiated by the recruitment of β -arrestin to the receptor, resulting in conformational changes leading to the association with AP-2.

DISCUSSION

This study was aimed at the development of a live cell approach that makes possible direct detection of the early events leading to β -arrestin- and clathrin-dependent internalization of GPCRs. For this purpose, we developed a BRET-based biosensor to monitor the agonist-induced interaction between β -arrestin-Rluc and β 2-adaptin-EYFP, a needed step for the β -arrestin-mediated targeting of GPCRs to clathrin-coated pits for internalization (7, 8, 10).

Out of the 12 different GPCRs tested, only the ETAR and ETBR were unable to promote β -arrestin association with AP-2 upon agonist-stimulated receptor internalization, indicating an alternative endocytic route for these two receptors. Among the receptors promoting β -arrestin/ β 2-adaptin interactions, those displaying lower and higher affinity for β -arrestins (class A and B, respectively) could be readily differentiated based on the strength of the BRET¹ signals detected between β 2-adaptin-EYFP and both of β -arrestin2-Rluc and β -arrestin1-Rluc. The

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

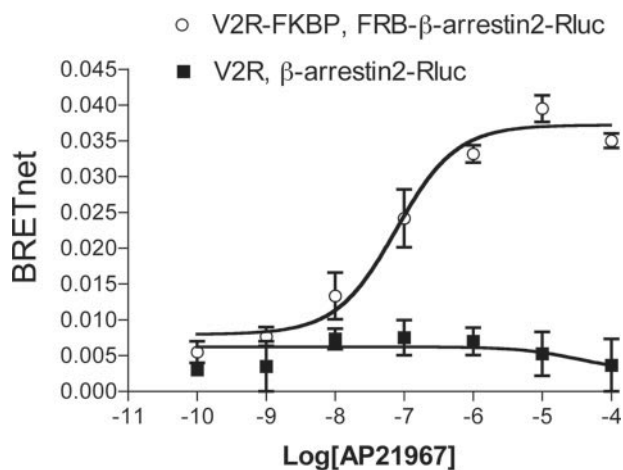


FIGURE 7. AP-21967-induced interaction between β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP in the absence of receptor activation. HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells were co-transfected with either FRB- β -arrestin2-Rluc and V2R-FKBP or with β -arrestin2 and V2R. BRET¹ measurements were performed 20 min following the addition of increasing concentrations of AP-21967. Data are the mean \pm S.E. of three independent experiments.

comparison of the kinetics of association of β -arrestin with the receptor and AP-2, made possible by combining BRET¹ and BRET² in living cells, respectively, indicated that β -arrestin association with the activated receptors precedes and probably triggers the recruitment of AP-2 to the β -arrestin/receptor complex. Consistent with this notion, the recruitment of β -arrestin to a constitutively internalizing mutant of the V2R or forcing its binding to the wild-type receptor in the absence of agonist stimulation (using a cyclophilin-based approach) was sufficient for promoting the interaction of AP-2 with the complex.

The list of receptors tested in this study included GPCRs that were previously proposed to undergo clathrin-dependent or -independent pathways. Agonist activation of VIP1R, V2R, V1aR, B2R, β 2AR, CCR5, EP4R, M2R, AT1aR, and C5aR resulted in an increase in agonist-promoted BRET¹ between β -arrestin and β 2-adaptin, indicative that internalization of these receptors occurs via a β -arrestin- and clathrin-dependent pathway. Studies using pharmacological and biochemical inhibitors previously reported that VIP1R, V2R, V1aR, B2R, β 2AR, CCR5, and EP4R undergo clathrin-dependent endocytosis (6, 17, 50–54). However, the internalization route previously proposed for M2R, AT1aR, and C5aR were more controversial. Indeed, it has been previously reported that the internalization of the M2R is atypical in being both non-clathrin and non-caveolae mediated, because it was not significantly affected by the co-expression of dominant negative mutants of β -arrestin1 (β -arrestin1(V53D)), dynamin (dynI(K44A)), or the heavy chain of clathrin (Hub) (55, 56). These results were surprising, considering that treatment with hypertonic sucrose, a classic inhibitor of clathrin-mediated endocytosis (57), was reported to strongly inhibit M2R internalization (55). Recently, by monitoring the trafficking of an M2R fused to GFP, it was reported that the M2R appeared to internalize initially via a clathrin-independent pathway but then quickly merged with the clathrin-endocytic pathway at the level of early endosomes (58). Our BRET¹ data clearly support the involvement of the

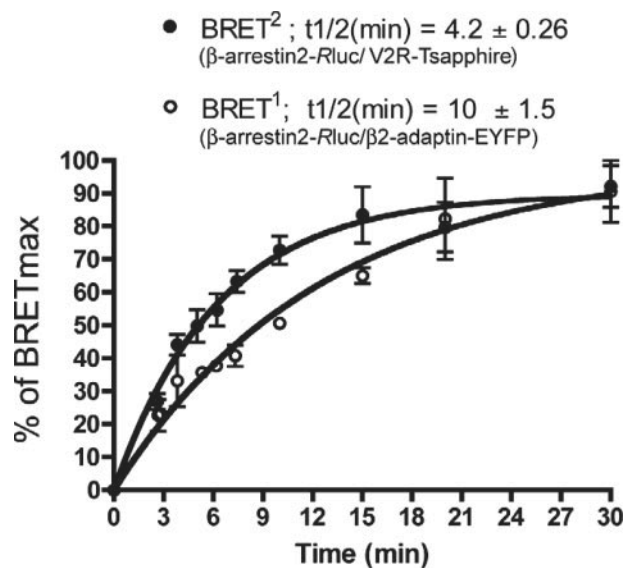


FIGURE 8. Simultaneous detection of agonist-promoted interactions between β -arrestin2-Rluc and both V2R-Tsaphire and β 2-adaptin-EYFP by combining BRET¹ and BRET². HEK293T/ β 2-adaptin-EYFP cells, co-transfected with β -arrestin2-Rluc and V2R-Tsaphire, were stimulated with 100 nM AVP or vehicle alone in the presence of coelenterazine-*h* (BRET¹) or DeepBlueC (BRET²), and the kinetics of the agonist-promoted BRET signals were measured. BRET values presented are the percentage of maximum response obtained from cells expressing the highest tested concentration of V2R-Tsaphire (2931 \pm 81 fluorescence units). The BRET¹ ratio represents the interaction between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-Rluc, whereas the BRET² ratio corresponds to the recruitment of β -arrestin2-Rluc to V2R-Tsaphire. Apparent $t_{1/2}$ (half-time) of maximal association is indicated. Data are the mean \pm S.E. of three independent experiments.

clathrin pathway in M2R internalization and demonstrate that the M2R can promote the formation of the β -arrestin/AP-2 complex involved in the early steps of clathrin-mediated endocytosis. For the AT1aR and C5aR, dominant negative mutants of β -arrestin1 (β -arrestin1(V53D) or β -arrestin2-(319–418)) and dynamin (dynI(K44A)) were initially reported not to inhibit receptor internalization (59, 60). However, later studies showed that the internalization of both AT1aR and C5aR can be inhibited by dominant negative mutants of both dynamin and β -arrestins (51, 61, 62). The results obtained in the present study using the direct BRET¹-based monitoring of the β -arrestin/AP-2 interaction are consistent with the latter studies, indicating that AT1aR and C5aR can undergo β -arrestin- and clathrin-mediated endocytosis.

Taken together, the conflicting results obtained in some studies illustrate the difficulties of interpretations associated with the exclusive use of dominant negative mutants to define the endocytic route used by specific receptors. The expression level of the mutant used and the endogenous levels of the proteins involved in the pathway are among the factors that can explain the contradictory results obtained. In this context, the BRET-based assays, directly monitoring the interactions between components of specific endocytic pathway, offer several advantages. For instance, the behavior of each receptor can be examined in an identical cellular background where the expression level of the components assayed can be selected and monitored in the course of the assay by measuring fluorescence and luminescence levels. Also, the biosensor system used to monitor the endocytic process is kept constant, independently

TABLE 2

Association kinetics determined by combining BRET¹ and BRET²

The different receptor expression levels were determined by fluorescence measurements (excitation 400 nm, emission 511 nm). BRET¹ ratio represents the interaction between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-Rluc, while BRET² ratio corresponds to the recruitment of β -arrestin2-Rluc to V2R-Tsapphire. Apparent $t_{1/2}$ (half-time) of maximal association is indicated. Data are the means \pm S.E. of three independent experiments.

Fluorescence (V2R-Tsapphire)	1244 \pm 9	1851 \pm 186	2931 \pm 81
BRET ¹ , $t_{1/2}$ (min)	16.3 \pm 5	16 \pm 1.8	10.9 \pm 1.5
BRET ² , $t_{1/2}$ (min)	7.25 \pm 2.8	6.13 \pm 0.3	4.17 \pm 0.3
$t_{1/2}$ BRET ¹ / $t_{1/2}$ BRET ²	2.3	2.6	2

of the receptor studied, allowing direct comparison between receptors that are not modified. The assay is thus a direct read-out of the ability of each receptor to engage specific components of the endocytic machinery and to evaluate the potential of the receptor to use specific internalization pathways in a given cell type.

As discussed above, the detection of receptor promoted BRET¹ between β -arrestin and β 2-adaptin is a clear demonstration that this receptor can be internalized via clathrin-coated endosomes. However, a lack of BRET¹, although ruling out a β -arrestin-mediated clathrin-dependent process, does not exclude the possibility of a β -arrestin-independent/clathrin-dependent or a β -arrestin-mediated/clathrin-independent pathway. β -Arrestin-independent/clathrin-dependent endocytosis of GPCRs has been previously suggested for the HCMV-encoded chemokine US28 and 5-hydroxytryptamine 2A receptors (63, 64). Interestingly, direct interaction between a subunit of AP-2 (μ 2-adaptin) and both the α 1b-adrenergic receptor and the protease-activated receptor 1 (48, 72) has been documented. Whether such direct interactions between AP-2 and certain GPCRs could be responsible for the β -arrestin-independent clathrin-mediated endocytosis remains to be investigated.

For ETAR and ETBR, our data strongly suggest a β -arrestin-dependent but clathrin-independent endocytic pathway. This is consistent with previous data suggesting an internalization process involving both caveolae and β -arrestin for ETAR (20). In addition to providing additional support to the hypothesis that β -arrestin could be involved in non-clathrin-mediated endocytosis, these results reinforce the notion that inhibition of endocytosis by β -arrestin dominant negative mutants cannot be used as a marker of clathrin-dependent internalization.

When considering the β -arrestin/clathrin-dependent pathway, our data are consistent with the notion that the recruitment of β -arrestin to the receptor and the ensuing conformational changes are needed for the subsequent association with AP-2 leading to clathrin-mediated endocytosis. In particular, BRET¹ and BRET² clearly indicated that the β -arrestin/AP-2 complexes did not exist in the absence of receptor activation and that the recruitment of β -arrestin to the receptor precedes the association of β 2-adaptin to the complex. Consistent with this notion, the recruitment of β -arrestin to the V2R using the cyclophilin-based recruitment system was sufficient to promote β -arrestin/AP-2 interaction and the consequent endocytosis, suggesting that GPCR/ β -arrestin interaction may be the triggering signal for the recruitment of AP-2 to the complex. However, for ETAR

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

and ETBR receptors, recruitment of β -arrestin was not sufficient for directing these receptors to the AP-2- and clathrin-dependent endocytic pathway. Thus, it is likely that AP-2 association with β -arrestin is determined by specific motifs or conformational rearrangements that are intrinsic to specific GPCR/ β -arrestin complexes.

In addition to allowing detailed analysis of the molecular events involved in GPCR endocytosis, the BRET-based assay developed herein provides a robust tool to monitor the activation of receptors that internalize via the β -arrestin- and clathrin-dependent process. Interestingly, the calculated EC₅₀ values for the agonist-promoted interaction between β -arrestins and β 2-adaptin correlated very well with the agonist affinities reported for GPCR functional assays. The β -arrestin/ β 2-adaptin BRET assay also presents the advantage of being independent of the G protein-coupling preference of the receptor ($G_{i/o}$ -, G_s -, and $G_{q/11}$ -coupled receptors) and does not require modification of the receptor, thus offering a universal functional assay for native GPCRs that internalize via the β -arrestin- and clathrin-mediated pathway. Finally, the present study opens the way to the development of similar BRET-based assays directly assessing the interaction between other partners of the endocytic machineries that will provide useful tools to dissect alternative pathways for GPCR endocytosis.

Acknowledgments—We are grateful to Drs. Audrey Claing and Stefano Marullo for providing some GPCR and β -arrestin2 constructs, respectively, and for their helpful discussions regarding the manuscript. We thank Drs. Joseph Sodroski, Oliver Griesbeck, Kathryn DeFea, and Sylvain Meloche for providing the CCR5, Tsapphire-GFP, β -arrestin1, and the AT1aR plasmids, respectively. We also thank Dr. Christian Le Gouill for his critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Victor Rivera from Pharmaceuticals Ariad for the gift of the expression vectors pC4EN-F₁ (FKBP) and pC4-R_HE vectors (FRB) and for kindly providing the heterodimerizer AP-21967.

REFERENCES

1. Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M., and Harmar, A. J. (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 279–288
2. Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (2002) *Prog. Neurobiol.* **66**, 61–79
3. Marchese, A., Chen, C., Kim, Y. M., and Benovic, J. L. (2003) *Trends Biochem. Sci.* **28**, 369–376
4. Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2005) *Science* **308**, 512–517
5. Edeling, M. A., Mishra, S. K., Keyel, P. A., Steinhauser, A. L., Collins, B. M., Roth, R., Heuser, J. E., Owen, D. J., and Traub, L. M. (2006) *Dev Cell* **10**, 329–342
6. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) *Nature* **383**, 447–450
7. Kim, Y. M., and Benovic, J. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 30760–30768
8. Laporte, S. A., Miller, W. E., Kim, K. M., and Caron, M. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 9247–9254
9. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23120–23126
10. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3712–3717
11. Santini, F., Gaidarov, I., and Keen, J. H. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 665–676
12. Prossnitz, E. R. (2004) *Life Sci.* **75**, 893–899

Monitoring β -Arrestin and AP-2 Interaction by BRET

13. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., and Barak, L. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–17210
14. Terrillon, S., Barberis, C., and Bouvier, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1548–1553
15. Fraile-Ramos, A., Kohout, T. A., Waldhoer, M., and Marsh, M. (2003) *Traffic* **4**, 243–253
16. Neuschaefer-Rube, F., Hermosilla, R., Rehwald, M., Ronnstrand, L., Schulin, R., Wernstedt, C., and Puschel, G. P. (2004) *Biochem. J.* **379**, 573–585
17. Shetzline, M. A., Walker, J. K., Valenzano, K. J., and Premont, R. T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25519–25526
18. Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J. P., and Laporte, S. A. (2005) *Cell Signal.* **17**, 1074–1083
19. Chini, B., and Parenti, M. (2004) *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 325–338
20. Okamoto, Y., Ninomiya, H., Miwa, S., and Masaki, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6439–6446
21. Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1119–1124
22. Heuser, J. E., and Anderson, R. G. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 389–400
23. Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. (1996) *Science* **271**, 363–366
24. Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32507–32512
25. Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 1303–1311
26. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2760–2765
27. Chen, W., Kirkbride, K. C., How, T., Nelson, C. D., Mo, J., Frederick, J. P., Wang, X. F., Lefkowitz, R. J., and Blobel, G. C. (2003) *Science* **301**, 1394–1397
28. Dalle, S., Ricketts, W., Imamura, T., Vollenweider, P., and Olefsky, J. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15688–15695
29. Orem, N. R., Xia, L., and Dolph, P. J. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 3141–3148
30. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. (2006) *Curr. Prot. Neurosci.* John Wiley & Sons, Inc., New York
31. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2004) *Biochem. J.* **85**, 625–637
32. Zapata-Hommer, O., and Griesbeck, O. (2003) *BMC Biotechnol.* **3**, 5
33. Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., and Bouvier, M. (2005) *J. Biomol. Screen.* **10**, 463–475
34. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) *EMBO J.* **23**, 3950–3961
35. Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A., and Caron, M. G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 93–98
36. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16384–16392
37. Rochdi, M. D., and Parent, J. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17827–17837
38. Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., and Bouvier, M. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**, 677–691
39. Freedman, N. J., Ament, A. S., Oppermann, M., Stoffel, R. H., Exum, S. T., and Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17734–17743
40. Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28745–28750
41. Charest, P. G., Oligny-Longpre, G., Bonin, H., Azzi, M., and Bouvier, M. (2006) *Cell Signal.* **19**, 32–41
42. Charest, P. G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 334–340
43. Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J. (2002) *Cell* **109**, 523–535
44. Milano, S. K., Pace, H. C., Kim, Y. M., Brenner, C., and Benovic, J. L. (2002) *Biochemistry* **41**, 3321–3328
45. Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Ferguson, S. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10999–11006
46. Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002) *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 336–343
47. Bernier, V., Lagace, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) *Mol. Endocrinol.* **18**, 2074–2084
48. Diviani, D., Lattion, A. L., Abuin, L., Staub, O., and Cotecchia, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19331–19340
49. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P. G., Aubry, M., and Bouvier, M. (2004) *Nat. Methods* **1**, 203–208
50. Bowen-Pidgeon, D., Innamorati, G., Sadeghi, H. M., and Birnbaumer, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 1395–1401
51. Braun, L., Christophe, T., and Boulay, F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4277–4285
52. Desai, S., and Ashby, B. (2001) *FEBS Lett.* **501**, 156–160
53. Mueller, A., Kelly, E., and Strange, P. G. (2002) *Blood* **99**, 785–791
54. Pizard, A., Blaukat, A., Muller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F., and Rajerison, R. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12738–12747
55. Roseberry, A. G., and Hosey, M. M. (2001) *J. Cell Sci.* **114**(Pt 4), 739–746
56. Vogler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K. H., and van Koppen, C. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12333–12338
57. Hansen, S. H., Sandvig, K., and van Deurs, B. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 61–72
58. Delaney, K. A., Murph, M. M., Brown, L. M., and Radhakrishna, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33439–33446
59. Gilbert, T. L., Bennett, T. A., Maestas, D. C., Cimino, D. F., and Prossnitz, E. R. (2001) *Biochemistry* **40**, 3467–3475
60. Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18302–18305
61. Gaborik, Z., Szaszak, M., Szidonya, L., Balla, B., Paku, S., Catt, K. J., Clark, A. J., and Hunyady, L. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 239–247
62. Suvorova, E. S., Gripentrog, J. M., and Miettinen, H. M. (2005) *Traffic* **6**, 100–115
63. Bhatnagar, A., Willins, D. L., Gray, J. A., Woods, J., Benovic, J. L., and Roth, B. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8269–8277
64. Droese, J., Mokros, T., Hermosilla, R., Schulein, R., Lipp, M., Hopken, U. E., and Rehm, A. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 42–49
65. Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdan, F. F., Wiseman, P. W., Bouvier, M., and Laporte, S. A. (2007) *J. Cell Sci.* **120**, 1723–1732
66. Breit, A., Lagace, M., and Bouvier, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 28756–28765
67. Williams, D. L., Jr., Jones, K. L., Alves, K., Chan, C. P., Hollis, G. F., and Tung, J. S. (1993) *Life Sci.* **53**, 407–414
68. Laporte, S. A., Servant, G., Richard, D. E., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**, 89–95
69. Crass, T., Ames, R. S., Sarau, H. M., Tornetta, M. A., Foley, J. J., Kohl, J., Klos, A., and Bautsch, W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 8367–8370
70. Raport, C. J., Gosling, J., Schweickart, V. L., Gray, P. W., and Charo, I. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17161–17166
71. van Koppen, C. J., and Nathanson, N. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20887–20892
72. Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P., and Trejo, J. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3231–3242

Article 5

Multimerization of Staufen1 in live cells.

Martel C, Dugré-Brisson S, Boulay K, Breton B, Lapointe G, Armando S, Trépanier V, Duchaine T, Bouvier M, Desgroseillers L.

Pour cette article, ma contribution a été au niveau de la du développement d'une nouvelle méthode de mesure d'interaction entre protéines et ARN. Pour ce fait, une petite molécule fluorescente uniquement lorsqu'en interaction avec de l'ARN, SYTO14, a été utilisée comme accepteur d'énergie avec Staufen-1, une protéine impliquer dans le transport d'ARN dans les neurones, fusionné à la Rluc a été utilisé comme donneur d'énergie dans un essai de BRET. Grace à cette méthode, il est possible pour la première fois de suivre une interaction protéine-ARN en cellule viventes ainsi que de confirmer la formation d'ologomère de Staufen-1 en complexe avec de l'ARN.

Multimerization of Staufen1 in live cells

CATHERINE MARTEL,^{1,2,3} SAMUEL DUGRÉ-BRISSON,¹ KARINE BOULAY,¹ BILLY BRETON, GABRIEL LAPOINTE, SYLVAIN ARMANDO, VÉRONIQUE TRÉPANIÉ, THOMAS DUCHAÎNE,^{4,5} MICHEL BOUVIER, and LUC DESGROSEILLERS

Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

ABSTRACT

Transport of mRNA is an efficient mechanism to target proteins to specific regions of a cell. Although it is well documented that mRNAs are transported in ribonucleoprotein (RNP) complexes, several of the mechanisms involved in complex formation and localization are poorly understood. Staufen (Stau) 1, a double-stranded RNA-binding protein, is a well accepted marker of mRNA transport complexes. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-associates in live cells using immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. The double-stranded RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 contributed about half of the signal, suggesting that Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association. Protein protein interaction also occurred, via dsRBD5 and dsRBD2, as shown by *in vitro* pull-down, yeast two-hybrid, and BRET assays in live cells. Interestingly, Stau1 self-association contributes to the formation of oligomeric complexes as evidenced by the coexpression of split *Renilla* luciferase halves covalently linked to Stau1 in a protein complementation assay (PCA) combined with a BRET assay with Stau1-YFP. Moreover, we showed that these higher-order Stau1-containing complexes carry RNAs when the RNA stain SYTO 14 was used as the energy acceptor in the PCA/BRET assay. The oligomeric composition of Stau1-containing complexes and the presence of specific mRNAs have been confirmed by biochemical approaches involving two successive immunoprecipitations of Stau1-tagged molecules followed by qRT-PCR amplification. Altogether, these results indicate that Stau1 self-associates in mRNPs via its multiple functional domains that can select mRNAs to be transported and establish protein protein interaction.

keywords: Staufen; ribonucleoprotein; mRNA transport; mRNA granule; mRNA particle

INTRODUCTION

Cytoplasmic mRNA transport and local translation to defined subcellular domains allow efficient spatial and temporal restriction of genetic expression (Sossin and DesGroseillers 2006; Rodriguez et al. 2008; Martin and Ephrussi 2009). This phenomenon is observed in a large variety of cell types and organisms and has been shown to play an important role in processes such as learning and memory, synaptic transmission, axis formation during development, cell motility, and asymmetric cell division. Evidence supports a model in which

the differential delivery of new mRNAs to subcellular domains occurs in motile ribonucleoprotein (RNP) structures. A compelling framework was suggested about how mRNA localization could be achieved in an ordered, multi-step pathway. It predicted (1) the formation of mRNPs as a functional complex, (2) the transport of these particles to their destination via cytoskeletal elements and motor proteins, and (3) the derepression of translation of the localized mRNAs. RNA-binding proteins (RBP) become associated with mRNAs either in the nucleus or during remodeling of the complex in the cytoplasm, forming a heterogeneous population of transport complexes. While the composition of mRNA transport complexes begins to be elucidated, less is known about the role(s) of these various RBPs in the mechanism of transport.

Staufen is a member of the double-stranded RNA-binding protein (dsRBP) family. It was first described in *Drosophila melanogaster* where it is required during development for the localization of the *oskar* and *bicoid* transcripts at the posterior and anterior poles of the oocytes, respectively (St Johnston et al. 1991). Staufen was also shown to be required for translational derepression of *osk* mRNA once properly

¹These authors contributed equally to this work.

Present addresses: ²Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA; ³Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA; ⁴Department of Biochemistry, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada; ⁵McGill Cancer Center, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada.

Reprint requests to: Luc DesGroseillers, Département de Biochimie, Université de Montréal, PO Box 6128, Centre Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada; e mail [REDACTED]; fax: (514) 343 2210.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.majournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.1664210>.

localized (Kim-Ha et al. 1995; Micklem et al. 2000). In mammals, two homologous Staufen genes, *Stau1* and *Stau2*, were identified (DesGroseillers and Lemieux 1996; Buchner et al. 1999; Kiebler et al. 1999; Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999; Duchaine et al. 2002). Stau1 is a multifunctional protein involved in different pathways of RNA metabolism. In neurons, Stau1 is required for the transport and localization of specific mRNAs to dendrites (Kiebler et al. 1999; Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Disruption of Staufen blocks transcription-dependent forms of synaptic plasticity/memory in *Drosophila* (Dubnau et al. 2003), *Aplysia* (Liu et al. 2006), and rodents (Lebeau et al. 2008). In addition to its role in mRNA transport, Stau1 plays additional roles in the regulation of post-transcriptional mRNA expression. When bound to the 3' UTR of mRNAs, Stau1 recruits the nonsense mediated decay (NMD) factor Upf1 and triggers degradation of the bound mRNAs (Kim et al. 2005, 2007). In contrast to the NMD pathway that recognizes and degrades mRNAs with a premature termination codon, Stau1-mediated mRNA decay is not a quality control mechanism but rather a bona fide mechanism of regulation of gene expression modulating the stability of natural mRNAs. In contrast, when bound to the 5' UTR of mRNAs, Stau1 enhances their translational efficiency (Dugre-Brisson et al. 2005).

Stau1 is a modular protein characterized by the presence of two conserved consensus amino acid sequences that fold into a domain involved in double-stranded RNA binding (dsRBD3, dsRBD4) (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999). The α - β - β - β - α structure of this domain interacts with the phosphate backbone of the double helix RNA in its minor and major grooves (Ryter and Schultz 1998; Ramos et al. 2000). Stau1 also contains two truncated dsRBDs (dsRBD2, dsRBD5) in which amino acid sequence conservation is restricted to the C-terminal half of the consensus (Lunde et al. 2007). These domains are unable to bind RNA. A tubulin-binding domain (TBD) is located between dsRBD4 and dsRBD5 and is believed to be involved in mRNA transport on the cytoskeleton (Wickham et al. 1999). Proteomic and cell biological experiments have clearly established that Stau1 is a component of ribonucleoprotein complexes in several cell types (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004).

Although it is well accepted that Stau1 is a marker of mRNA transport complexes and a crucial player for mRNA transport (Kanai et al. 2004; Sossin and DesGroseillers 2006; Vessey et al. 2008), its exact roles within RNPs are still unclear. It is known that several proteins of the dsRBP family such as TRBP2, XlrpA, ADAR2, PACT, and Rnt1p have the capacity to dimerize through their dsRBDs (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). For many of these proteins, structural rearrangements resulting from homo- and/or heterodimerization are required for functional activation, and, therefore, dimerization may serve

as a molecular regulator. Therefore, we tested whether Stau1, in addition to its other roles in mRNA processing, organizes Stau1-containing mRNPs through self-multimerization. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-interacts in live cells to form multimeric structures and identify the molecular determinants involved in this property. We further show that these complexes contain specific RNAs.

RESULTS

Differentially tagged Stau1 are found in common complexes in vivo

To determine whether Stau1 forms complexes in mammalian cells, we used immunoprecipitation of differentially tagged Stau1 proteins. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-HA₃ and either poly(A)-binding protein yellow fluorescent protein (PABP-YFP), Stau1-YFP, or YFP. Western blot experiments indicated that transfected proteins were well expressed and that the levels of expression of Stau1-HA₃ and Stau1-YFP were close to that of endogenous Stau1 (Fig. 1A). Proteins in the cell extracts were then immunoprecipitated using anti-GFP antibody, and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting (Fig. 1A). In these conditions, Stau1-HA₃ was co-immunoprecipitated with Stau1-YFP and to a lesser extent with PABP-YFP. In contrast, Stau1-HA₃ was not co-immunoprecipitated when co-expressed with YFP. Interestingly, endogenous Stau1⁵⁵ was also found in the precipitates, revealing the biological relevance of these interactions. Treatment of the cell extracts with RNase A before immunoprecipitation did not abolish Stau1/Stau1 interactions but prevented PABP-YFP/Stau1-HA₃ interaction. These results show that endogenous and differentially tagged Stau1 are found in common complexes and that, if they are bound to RNA, their association is close enough to be protected from RNase degradation, in contrast to that of Stau1-PABP.

To determine if Stau1 monomers can self-associate in these complexes, we used an in vitro pull-down assay. Bacterially expressed and purified his₆-Stau1 and his₆-NEP, used as negative controls, were loaded on Ni-NTA columns. In vitro synthesized ³⁵S-labeled Stau1 was loaded on the his₆-Stau1 and his₆-NEP columns. After several washing steps, his₆-Stau1 and his₆-NEP were eluted from the columns, and the co-eluted ³⁵S-labeled Stau1 was detected by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 1B). Whereas ³⁵S-labeled Stau1 was retained on the his₆-Stau1 column, it was absent from the his₆-NEP column, showing that Stau1 interacts with itself in this assay. The Stau1-Stau1 interaction experiment was done in the presence of RNase A (50 μ g/mL). In these conditions, ³⁵S-labeled Stau1 still interacted with his₆-Stau1. These results indicate that Stau1 has the capacity to dimerize if not oligomerize and that protein-protein interactions contribute at least in part to Stau1 self-interaction.

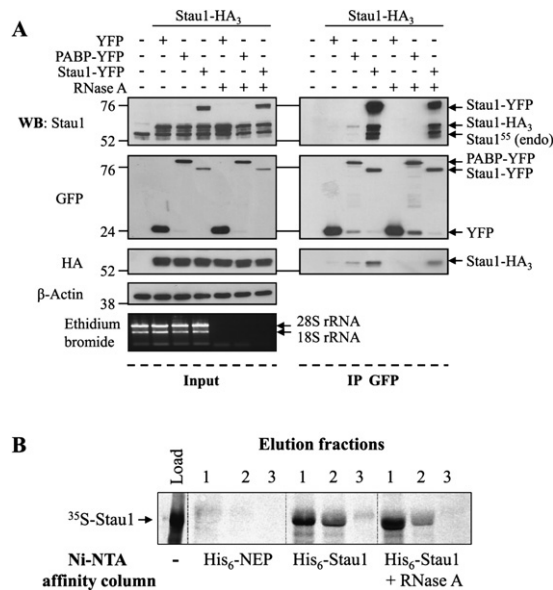


FIGURE 1. Differentially tagged Stau1s are found in common complexes. (A) HEK293T cells were mock transfected or co transfected with Stau1 HA₃ expressor and either YFP, PABP YFP, or Stau1 YFP expressors in the absence or presence of RNase A as indicated. An aliquot of the proteins in the cell extracts was separated by SDS PAGE (left panels, “Input”) and the remaining extracts were immunoprecipitated using anti GFP antibody (right panels, “IP GFP”). Proteins were analyzed by Western blotting using anti Stau1, anti GFP, and anti HA antibodies, as indicated. Anti β actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. As control for RNase A digestion, total RNAs were isolated and separated on agarose gel. Ribosomal RNAs (rRNA) were detected by ethidium bromide staining. (B) Bacterially expressed his₆ Stau1 or his₆ NEP (as control) fusion proteins were fixed on a Ni NTA column and extensively washed. In vitro synthesized ³⁵S Stau1 was loaded onto the columns. Columns were washed and then his₆ Stau1 and his₆ NEP were eluted and collected in three successively fractions (lanes 1–3). The co eluted ³⁵S Stau1 protein was separated by SDS PAGE and visualized by autoradiography. In parallel, his₆ Stau1 and ³⁵S Stau1 preparations were treated with RNase A before loading onto the columns. An aliquot of ³⁵S Stau1 was also loaded on the gel (lane, “Load”) to control for its synthesis and size.

Stau1 self-associates in live cells

Our results indicate that several Stau1 monomers are found in common complexes in vivo and that direct interaction may contribute to complex formation. In order to confirm the proximity (or interaction) of Stau1 molecules within mRNPs in live cells, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays were used (Fig. 2A). In this technique, one candidate interacting protein is fused to *Renilla* luciferase, a luminescent energy donor, and the other to YFP, a fluorescent energy acceptor. The two fusion proteins are then co-expressed in the same cells. If the two proteins interact, their close proximity allows nonradiative energy transfer (BRET) between the luciferase and the YFP. BRET does not occur if the two proteins are separated by >100 Å, making the technique ideal for monitoring protein–protein interactions in biological systems. Therefore, RLuc and YFP

were fused at the C terminus of Stau1. Fixed amounts of Stau1-Rluc were transfected in combination with increasing amounts of Stau1-YFP (Fig. 2B), PABP-YFP, or YFP to generate BRET saturation curves (Fig. 2C). Co-expression of Stau1-Rluc and Stau1-YFP produced a strong BRET signal

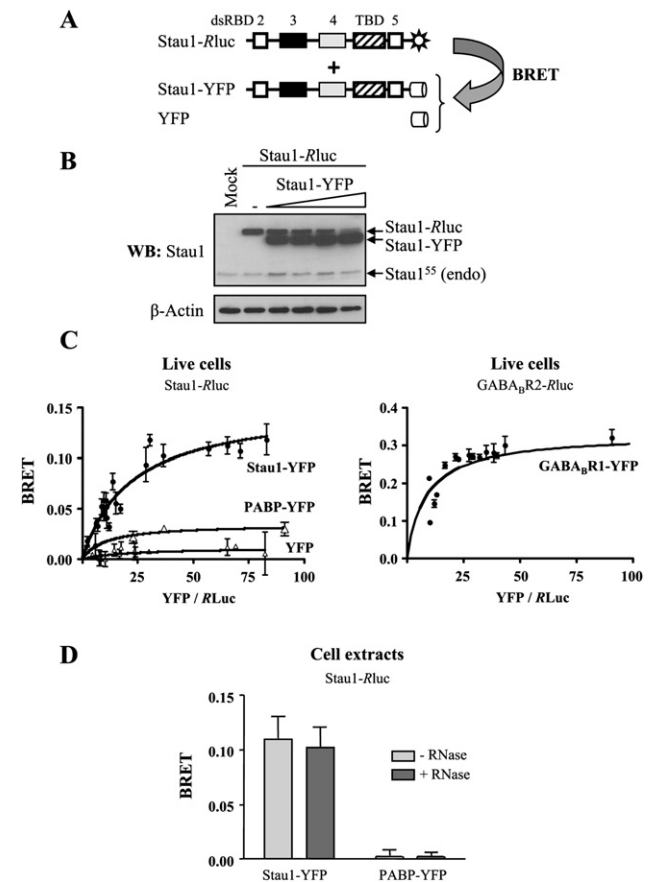


FIGURE 2. Stau1 self associates in live cells as measured by BRET. (A) Schematic representation of the BRET assay. (Black and gray boxes) Double stranded RNA binding domains with major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) dsRNA binding activity, respectively; (white boxes) domains with no demonstrated RNA binding activity (dsRBD2 and dsRBD5); (hatched boxes) tubulin binding domain (TBD). (Sun) RLuc, (cylinder) YFP. (B,C) Plasmids coding for Stau1 RLuc were co transfected in HEK293T cells with various amounts of Stau1 YFP, PABP, or YFP expressors. (B) Expression of Stau1 RLuc and Stau1 YFP proteins using Western blotting with anti Stau1 antibody. β actin antibody was used as a loading control. (C) BRET saturation curves were generated to provide evidence of specific interactions between the proteins in live cells. BRET ratios were defined as described in the Materials and Methods and plotted as a function of the excited YFP activity to total *Renilla* luciferase activity ratio. (Left) Comparison of BRET saturation curves when Stau1 RLuc was co expressed with Stau1 YFP, PABP YFP, or YFP. Error bars correspond to standard deviation. (Right) GABA_B receptor 2 RLuc and GABA_B receptor 1 YFP, two proteins known to form strong functional dimer, were used as a BRET positive control. (D) HEK293T cells were co transfected with Stau1 RLuc and either Stau1 YFP or PABP YFP expressors as described in B. Cells were lysed and cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A for 15 min at room temperature. BRET ratios at saturation in the presence (+) or absence (–) of RNase A are shown. *n* = 3. Error bars correspond to standard deviation.

in live cells comparable to that of proteins known to form obligatory dimers (Fig. 2C, GABA_B receptors), suggesting a close proximity between these two proteins. In contrast, Stau1-Rluc only produced a negligible BRET signal when co-expressed with PABP-YFP or YFP, confirming the specificity of the Stau1-Rluc/Stau1-YFP BRET signal and suggesting that the binding of two RNA-binding proteins on RNA molecules is not sufficient to induce a strong BRET signal. The BRET assay was then performed with cell extracts, allowing us to determine whether the interaction is sensitive to RNase treatment or not. Cells were lysed and the resulting cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A for 15 min at room temperature before fluorescence measurement. There was no significant difference in Stau1-Rluc/Stau1-YFP BRET signals between RNase A-treated and untreated extracts (Fig. 2D).

RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association in live cells

Although Stau1 self-association is resistant to RNase treatment and can occur with purified proteins *in vitro*, it is possible that an RNA molecule may be required during an initial step that triggers Stau1 self-association or that a linker RNA is protected from RNase A degradation by bound Stau1 molecules. To determine whether Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association, RNA-binding-defective Stau1 mutants were fused to YFP and used in the BRET assay described above to determine their ability to interact with the wild-type Stau1-Rluc. Mutations were introduced in Stau1 dsRBD3, a domain shown to carry the major Stau1 RNA-binding activity, and in dsRBD4, a domain carrying a weak RNA-binding activity *in vitro* (Fig. 3A; Wickham et al. 1999). Four mutants were generated by either deletion of the complete dsRBD3 (Stau1^{Δ3}-YFP) or dsRBD4 (Stau1^{Δ4}-YFP) or through point mutations in amino acids required for RNA binding in dsRBD3 (Stau1^{KK}-YFP) or in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}-YFP). In these mutants, lysines 153 and 154 in dsRBD3 and lysines 256 and 257 in dsRBD4 were mutated to alanines. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-Rluc and either one of the mutated fusion proteins (Fig. 3B). BRET signals were calculated in live cells 24 h post-transfection. Following expression of mutants in dsRBD3 alone (Stau1^{KK} and Stau1^{Δ3}), the BRET ratio was weakly affected, being only reduced by ~20% (77% ± 10% and 77.5 ± 0.9%, respectively) as compared with the BRET activity generated with the wild-type Stau1-YFP (Fig. 3C). When mutations were introduced in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}), the BRET ratio was further reduced to 51.8% (± 0.4%) of the one obtained with Stau1-YFP. These results indicate that Stau1 RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association and may be required to select mRNAs in Stau1-containing mRNPs and/or help to initiate or stabilize protein-protein interaction. Nevertheless, protein-

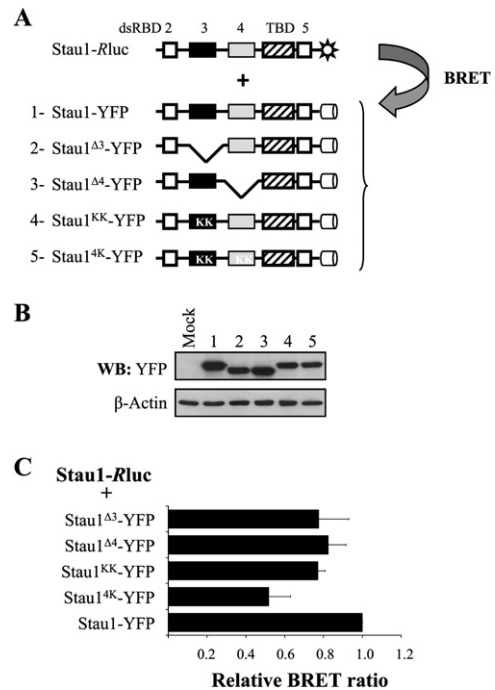


FIGURE 3. Stau1 RNA binding activity is involved in complex formation. (A) Schematic representation of Stau1 mutants. Symbols are described in the legend for Figure 2. (Stau1^{KK}) Mutations K153A and K154A in dsRBD3; (Stau1^{4K} mutant) mutations K153A and K154A in dsRBD3 and K256A and K257A in dsRBD4. (B) Plasmids coding for Stau1 YFP and Stau1 YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti GFP antibody. Anti β actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane correspond to those in A. (C) HEK293T cells were co transfected with Stau1 Rluc and either Stau1 YFP, Stau1^{Δ3} YFP, Stau1^{Δ4} YFP, Stau1^{4K} YFP, or Stau1^{KK} YFP expressors. BRET ratios of wild type Stau1 and RNA binding defective Stau1 mutants were calculated as in Figure 2, and relative BRET ratios were generated with the Stau1 Rluc/Stau1 YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. *n* = 3. Error bars correspond to standard deviation.

protein interaction seems to also contribute to Stau1 self-association in live cells.

Characterization of the protein-protein determinants required for Stau1 self-association

To identify the molecular determinants involved in protein interaction, we first expressed different combinations of wild-type and Stau1 deletion mutants (Fig. 4A,B) fused to either Rluc or YFP and measured their BRET activity in live cells (Fig. 4C–E). When co-expressed with wild-type Stau1, Stau1^{Δ2} or Stau1^{Δ5} expression reduced the BRET activity by ~20% and 50%, respectively, as compared with that obtained with wild-type Stau1 (Fig. 4C). These results suggest that dsRBD5 and dsRBD2 are major and minor determinants involved in the protein-protein aspect of Stau1 self-association, respectively. To further characterize these interactions, we then calculated BRET activity following co-expression of these two fusion proteins: Stau1^{Δ5}-Rluc/Stau1^{Δ2}-YFP,

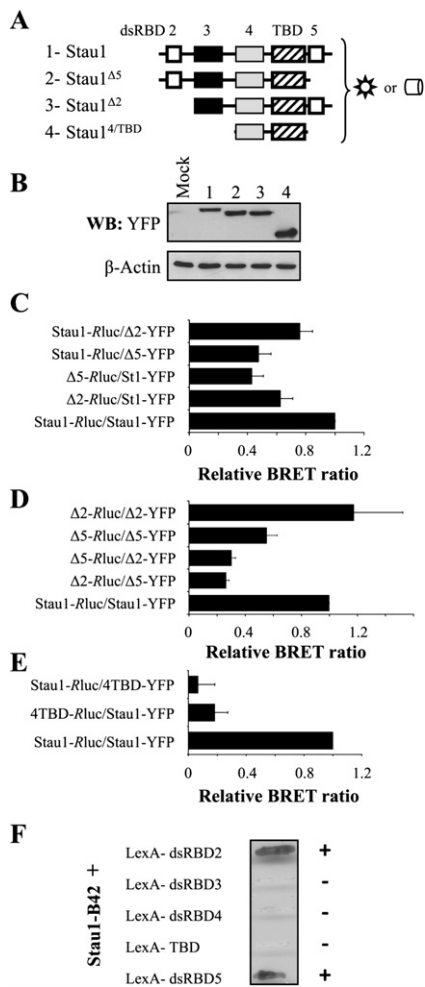


FIGURE 4. Characterization of Stau1 protein protein interaction in live cells. (A) Schematic representation of Stau1 and mutants. Symbols are described in the legend of Figure 2. (B) Plasmids coding for Stau1 YFP and Stau1 YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti GFP antibody. Anti β actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane correspond to those in A. (C E) Cells were co transfected with different combinations of Stau1 and Stau1 deletion mutants fused to either Rluc or YFP as indicated. BRET ratios were calculated as in Figure 2, and relative BRET ratios were generated with the Stau1 Rluc/Stau1 YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. $n = 3$. Error bars correspond to standard deviation. (F) Yeast cells were co transformed with a plasmid coding for Stau1 B42 and different expressors of Stau1 domains fused to LexA, as indicated. Cells were screened for growth on selective medium and β galactosidase expression. Stau1 B42 interacts (+) with Stau1 dsRBD2 and dsRBD5 but not (-) with dsRBD3, dsRBD4, or TBD fused to LexA in a two hybrid assay.

Stau1^{Δ2}-Rluc/Stau1^{Δ2}-YFP, Stau1^{Δ5}-Rluc/Stau1^{Δ5}-YFP, and Stau1^{Δ2}-Rluc/Stau1^{Δ5}-YFP. As shown in Figure 4D, co-expression of Stau1^{Δ5}-Rluc and Stau1^{Δ5}-YFP showed a BRET activity that was reduced to 51.3% ($\pm 0.1\%$), consistent with a significant role of dsRBD5 in Stau1 association. In contrast, co-expression of Stau1^{Δ2}-Rluc and Stau1^{Δ2}-YFP generated a BRET signal that was similar

to that obtained with Stau1-Rluc and Stau1-YFP. Finally, BRET signals generated by the co-expression of the Stau1^{Δ5}-Rluc/Stau1^{Δ2}-YFP or Stau1^{Δ2}-Rluc/Stau1^{Δ5}-YFP pairs were highly reduced, being only $\sim 25\%$ ($32.8\% \pm 0.2\%$ and $24.3\% \pm 0.4\%$, respectively) of the BRET activity generated by the Stau1 wild-type pair (Fig. 4D). Consistently, a Stau1 mutant that carried only the dsRBD4 and tubulin-binding domains (RBD4/TBD) did not generate BRET signal when expressed with wild-type Stau1 (Fig. 4E). Altogether, these results indicate that dsRBD5 is clearly involved in Stau1 self-interaction in live cells, whereas the role of dsRBD2 is less clear.

To confirm that dsRBD5 and dsRBD2 are the molecular determinants involved in Stau1–Stau1 protein interaction, the yeast two-hybrid system was used. The full-length Stau1 protein was fused to the B42 transcription activator, whereas each of the four dsRBDs of Stau1 and the tubulin-binding domain (TBD) were individually fused to the LexA DNA-binding domain. After selection for the presence of both plasmids in the yeast strains, cells were plated on a Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻ medium with galactose and X-Gal. Our results showed that only yeast cells expressing the dsRBD2- and dsRBD5-LexA fusion proteins grew on the selective medium and produced β -galactosidase activity (Fig. 4F). Therefore, both dsRBD2 and dsRBD5 can interact with the full-length Stau1 protein in this assay.

Subcellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants

To determine whether the differential BRET responses obtained with the Stau1 mutants may be explained by major defects in the subcellular distribution of these proteins, Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were expressed in COS-7 cells and their subcellular distribution was observed by fluorescence microscopy. HEK293T cells were not used in this assay because of the small size of their cytoplasm. As previously shown (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999), Stau1-YFP showed a granular distribution in the cytoplasm and nuclear exclusion. Stau1^{Δ5}-YFP, a mutant that produced weak BRET signals (Fig. 4), had a subcellular distribution similar to that of Stau1-YFP (Fig. 5). As compared with Stau1-YFP, Stau1^{KK}-YFP showed an additional weak nucleolar distribution, and mutants in the RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 showed cytosolic granules that are slightly bigger than those observed with Stau1-YFP. However, this cannot explain the difference in the BRET response of Stau1^{4K}-YFP as compared with the others (Fig. 3C). The distribution of 4/TBD-YFP was random and similar to that of YFP alone as previously described (Luo et al. 2002).

Stau1 forms oligomers in live cells

Knowing that Stau1 is present in large mRNP complexes, we assessed the capacity of Stau1 to form higher order

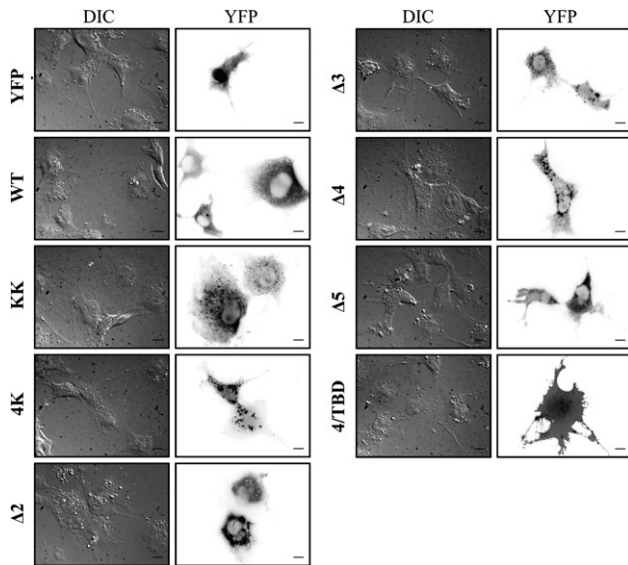


FIGURE 5. Subcellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants. COS 7 cells were transfected with plasmids coding for Stau1 YFP or Stau1 YFP mutants as indicated. YFP expression was observed 24 h later by fluorescence microscopy. Both differential interference contrast microscopy (DIC) and the YFP constructs are shown.

structures in live cells. To this end, we combined protein complementation (PCA) and BRET assays (Fig. 6A). For the PCA assay, Rluc is cut into two nonfunctional halves (Rluc^{F1} and Rluc^{F2}). Each half of the split luciferase protein cannot by itself generate light when expressed in cells. However, their fusion to proteins that interact via protein–protein interactions allows the reconstitution of a functional luciferase and light emission. Therefore, the N-terminal half (Stau1-Rluc^{F1}) and the C-terminal half (Stau1-Rluc^{F2}) of a split Rluc protein were fused at the C terminus of Stau1. Consistent with the BRET assay, co-expression of Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} reconstituted a functional luciferase that produced light (8293 ± 1341 arbitrary units [AU]) via Stau1–Stau1 interaction, whereas expression of either fusion protein alone did not (580 ± 87 and 529 ± 41 AU, respectively). Then, to determine whether additional Stau1 molecules can interact with this complex in live cells, the PCA assay with Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} was repeated in the presence of an increasing concentration of Stau1-YFP for BRET measurement. If Stau1 induces the formation of large complexes, a complete Stau1–Stau1–Rluc will be reconstituted and will transfer energy to the Stau1-YFP that will be present in the same complex. As shown in Figure 6B, co-expression of Stau1-Rluc^{F1}, Stau1-Rluc^{F2}, and Stau1-YFP produced a strong BRET saturation curve, suggesting that at least three Stau1 molecules associate in these complexes. These interactions between Stau1 molecules were resistant to RNase treatment (Fig. 6C), consistent with results shown in Figure 2D. In contrast, Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} did not produce BRET activity when co-expressed with YFP or PABP-YFP (Fig. 6B). Other controls were done with CXCR4,

a protein that does not interact with Stau1. Stau1-Rluc^{F1} and CXCR4-Rluc^{F2} as well as Stau1-Rluc^{F2} and CXCR4-Rluc^{F1} did not produce significant luciferase activity when co-expressed (533 ± 59 and 613 ± 19 AU, respectively); CXCR4-Rluc^{F1} and CXCR4-Rluc^{F2}, two proteins known to interact in live cells (Hamdan et al. 2006), did not transfer energy to Stau1-YFP in the BRET assay (data not shown).

Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs

To determine whether Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs, we modified the live cells assay that combined PCA and BRET to detect RNA–protein interaction (Fig. 7A). In this assay, Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} were co-expressed to reconstitute luciferase activity while SYTO 14, a dye that stains RNA, was used as the energy acceptor. If Stau1-containing oligomers associate with RNA, BRET signal will be generated as a consequence of the close proximity between the reconstituted Rluc and SYTO 14. As shown in Figure 7B, expression of both Stau1-Rluc and the split Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} generated BRET signals when RNA was stained with SYTO 14, indicating that RNAs are present in the Stau1-containing complex. In contrast, Rluc activity resulting from interaction of the split protein kinase A (PKA) regulatory subunit-Rluc^{F1} and PKA catalytic subunit-Rluc^{F2} did not induce BRET signal in the presence of SYTO 14. Whereas luciferase activity generated by interaction of the split Rluc fusion proteins was not impaired by RNase treatment (data not shown; Fig. 6C), the observed Stau1–Stau1–Rluc/SYTO 14 BRET signal was sensitive to RNase treatment, indicating that Stau1-containing complexes indeed contain RNAs (Fig. 7C).

To confirm the formation of RNA-containing Stau1-oligomers, a biochemical approach involving two successive immunoprecipitation steps was used. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1-HA₃ and either YFP, Stau1-YFP, and/or Stau1-Flag (Fig. 8A). The level of expression of these proteins was evaluated by Western blotting. First, Stau1-containing complexes were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and eluted with the Flag peptide. The resulting complexes contained Stau1-HA₃ and Stau1-YFP when co-expressed. Then, Stau1-Flag-containing complexes were re-immunoprecipitated using anti-GFP antibody. The resulting pellet also contained Stau1-HA₃ and Stau1-Flag, indicating that the three tagged-Stau1 proteins were present in the same complexes. As controls, other combinations of transfected Stau1-tagged molecules lacking either Stau1-Flag or Stau1-GFP did not bring down Stau1-HA₃.

To determine whether the Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs, immunoprecipitates obtained from the successive-IPs were treated with TRIzol reagent to isolate putative RNAs, and the resulting material was analyzed by qRT-PCR. Arf1 and PAICS mRNAs, two known Stau1-bound mRNAs (Kim et al. 2005), were specifically amplified from samples of the two successive IPs and were

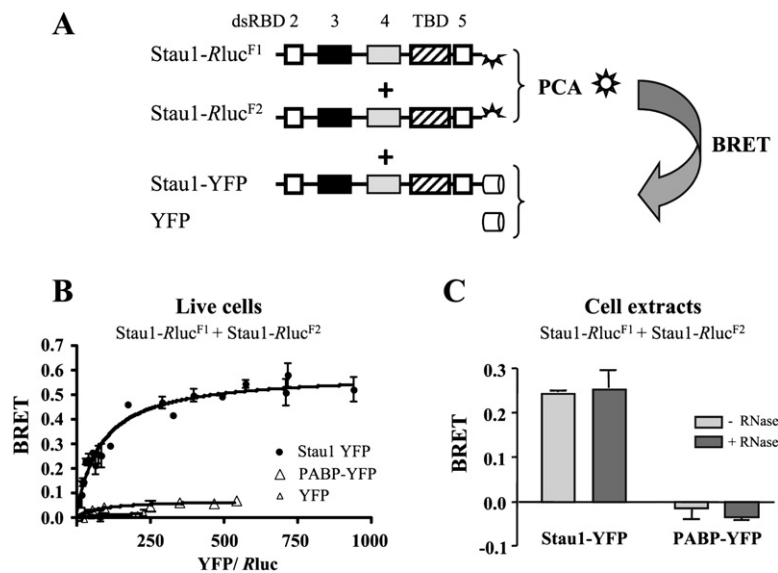


FIGURE 6. Stau1 forms oligomers in live cells. (A) Schematic representation of the BRET PCA assay. Stau1 was fused to either the N terminal (Rluc^{F1}) or the C terminal (Rluc^{F2}) of Rluc. Formation of Stau1 dimers will bring together the two Rluc halves through protein complementation (PCA) and reconstitute a functional luciferase. This enzyme will transfer energy and generate BRET signal if Stau1 YFP is also present in close proximity, suggesting the formation of oligomers. (B) HEK293T cells were co transfected with constant amounts of plasmids coding for Stau1 Rluc^{F1} and Stau1 Rluc^{F2} and increasing amounts of plasmids coding for either Stau1 YFP, PABP YFP, or YFP. The saturation curves provide evidence of specific interactions between at least three Stau1 proteins in live cells. BRET ratios were calculated as in Figure 2. Error bars correspond to standard deviation. (C) Plasmids were transfected as in B. Cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+RNase) or the buffer alone (–RNase) before BRET calculation.

absent from other control IPs (Fig. 8B). To discriminate between specific Stau1-mRNA association and nonphysiological aggregates of mRNPs, we calculated the ratio between the amount of Arf1 and PAICS mRNAs in the successive immunoprecipitates and their amount in the cells before IPs (IP/input). As a control for specificity, we also calculated the ratio of an abundant non-Stau1-interacting mRNA coding for the ribosomal protein RPL22. When the ratio obtained for RPL22 mRNA was arbitrarily normalized to 1, an enrichment ranging from 13- to 20-fold was observed for Arf1 mRNA and from 32- to 43-fold for PAICS mRNA. Altogether, these results indicate that Arf1 and PAICS mRNAs are highly enriched in the multimeric complexes as compared with non-Stau1-interacting controls.

DISCUSSION

Many proteins self-associate to generate dimers and/or oligomers, and this structural reorganization is essential to control their function, structure, and/or regulation (Marianayagam et al. 2004). Enzymatic regulation, cell signaling, DNA binding, and regulation of gene expression are a few examples among all the molecular activities that are regulated by protein self-interaction. Especially, proteins of the dsRBP family such as PKR, TRBP2, XlrpA, ADAR2, PACT, and Rnt1p are known to form homo- and/or

heterodimers (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Lemaire et al. 2005; Valente and Nishikura 2007). The structural rearrangement resulting from dimerization is required for their functional activation, and therefore dimerization serves as a molecular regulator (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). In this study, we show that Stau1, like other members of the dsRBP family, self-associates. Using novel approaches in live cells, we further showed that Stau1 generates multimeric complexes through both RNA-binding activity and protein-protein self-interaction and that these complexes contain specific RNAs. Our results suggest that Stau1 has the potential to act as a scaffolding protein that organizes mRNAs into functional mRNPs.

Molecular determinants for mRNP formation

Our BRET assays indicate that Stau1 RNA-binding activity or intact dsRBD3 and dsRBD4 contributes for ~50% of

the Stau1 self-association (Fig. 3). Several biochemical studies (Nanduri et al. 2000) as well as NMR and crystallographic structures of bacterially expressed dsRBDs (Bycroft et al. 1995; Kharrat et al. 1995; Ryter and Schultz 1998; Nanduri et al. 2000; Ramos et al. 2000) indicate that RNA-binding competent dsRBDs behave as monomeric forms. Therefore, it is likely that the contribution of these domains to Stau1 self-interaction depends on their capability to bind RNA and not on putative protein-protein interaction. In addition, our observation that protein interactions occur via other domains that do not bind RNAs *in vitro* (Wickham et al. 1999) supports a model in which dsRBD3 and dsRBD4 are free to interact with mRNAs. Stau1 RNA-binding activity may then be used to recognize and select mRNAs to be included in mRNPs. Subsequently, it may facilitate the association of Stau1 monomers on a dsRNA structure and then facilitate the recognition, formation, and/or maintenance of protein-protein interaction mediated by dsRBD5 and dsRBD2.

The RNA-binding activity is nevertheless not essential for subsequent protein-protein interaction. Indeed, ~50% of the BRET activity is still detectable when RNA-binding deficient Stau1 mutants are expressed *in vivo* (Fig. 3). Accordingly, Stau1 self-association can be detected *in vitro* using purified proteins in the presence of RNase (Fig. 1B), revealing the intrinsic property of Stau1 to self-associate.

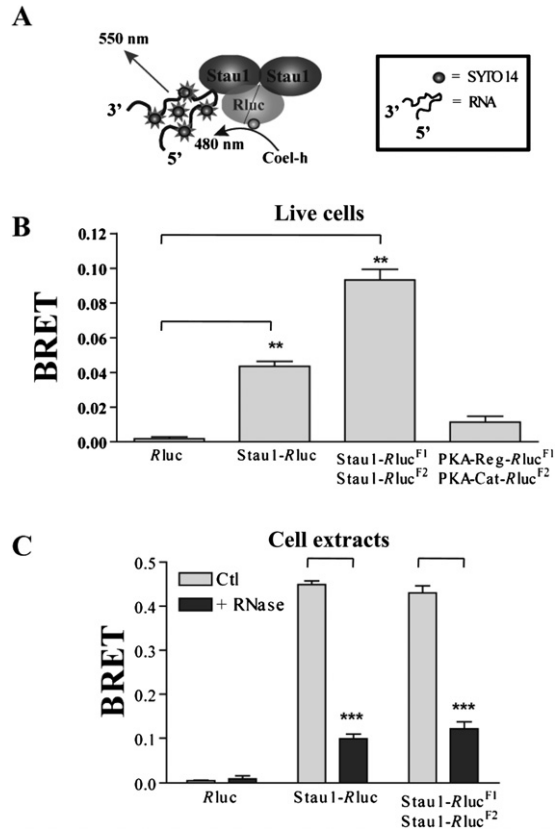


FIGURE 7. Stau1 oligomers contain RNA in live cells. (A) Schematic representation of the PCA BRET assay for protein-RNA interaction. As described in Figure 6, Stau1-Rluc^{F1} and Stau1-Rluc^{F2} were transfected in HEK293T cells to reconstitute a functional luciferase as a consequence of Stau1-Stau1 interaction. Then cells were treated with SYTO 14, a fluorescent dye that stains RNA. Energy transfer can occur from the reconstituted Rluc to SYTO 14 if in close proximity and generate BRET signal. (B) BRET ratios at saturation are indicated for each association between monomeric (Rluc, Stau1-Rluc) or split (Stau1-Rluc^{F1} + Stau1-Rluc^{F2}, PKA-reg-Rluc^{F1} + PKA-cat-Rluc^{F2}) Rluc and SYTO 14. Error bars are standard deviation. (**)*P* < 0.01 (ANOVA and post test Dunnett). (C) Transfected HEK293T cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+RNase) or the buffer alone (Ctl) before adding SYTO 14 for the BRET assay. (***)*P* < 0.001 (*t* test). Note that the BRET values are higher in cell extracts than those in live cells probably due to the better availability of SYTO 14 in cell extracts.

This is consistent with previous studies in which dsRBPs form dimers through both dsRBDs and other domains not involved in RNA binding (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Valente and Nishikura 2007). Our results identified dsRBD5 as the major determinant for protein-protein interaction, contributing to ~50% of the Stau1 self-interaction (Fig. 4C). Homophilic interaction between dsRBD5s may contribute to stabilize particle formation on mRNAs. The role of dsRBD2 is less clear. Although it can interact with Stau1 in the yeast assay (Fig. 4F), its deletion has no impact on the BRET signal in live cells (Fig. 4C). Interestingly, heterophilic interactions between dsRBD5 and the N-terminal end of Stau1 (in-

cluding dsRBD2) were observed in the yeast two-hybrid assay (data not shown). This observation would permit generating large multimeric complexes through homo- and heterophilic interactions between dsRBDs. Moreover, it opens the additional possibility that Stau1 structure and/or functions may be regulated by intramolecular interaction between the N-terminal domain and dsRBD5. A similar regulatory mechanism has been described for Rnt1p, a member of the dsRBP family in yeast, in which an N-terminal domain established intramolecular interaction with the C-terminal dsRBD (Lamontagne et al. 2000). Competition between intramolecular Nter-dsRBD5 interaction and intermolecular homophilic binding of dsRBD5 may control Stau1 self-association and, as a consequence, Stau1 structure/functions. Alternatively, deletion of dsRBD2 may somehow destabilize dsRBD3-mediated RNA-binding activity.

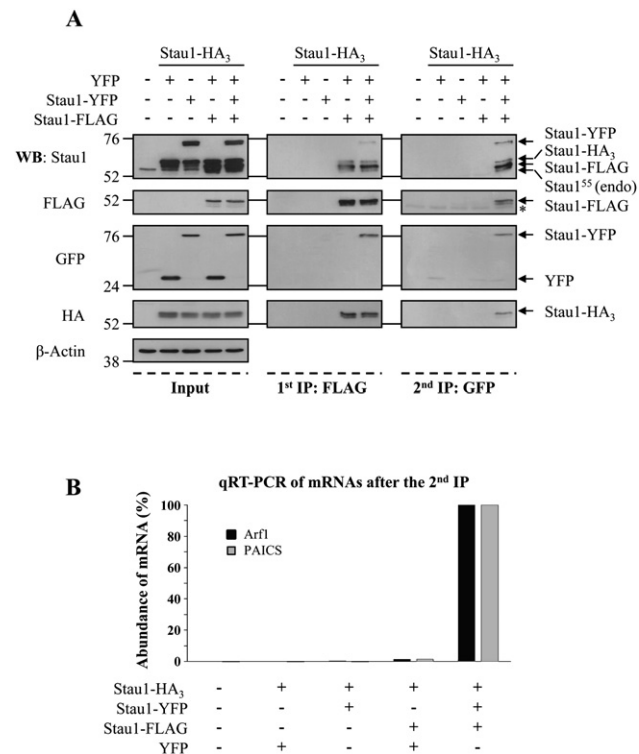


FIGURE 8. Stau1 forms RNA containing higher order complexes. (A) HEK293T cells were mock transfected or co transfected with Stau1 HA₃ expressor and either YFP, Stau1 YFP, or Stau1 Flag expressors as indicated. Proteins in the cell extracts were separated by SDS PAGE (left panels, Input) or successively immunoprecipitated by first using anti Flag antibody (middle panels, 1st IP: FLAG) and then using anti GFP antibody (right panels, 2nd IP: GFP). Proteins were analyzed by Western blotting using anti Stau1, anti Flag, anti GFP, and anti HA antibodies, as indicated. Anti β actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. (B) Immunoprecipitates obtained after the second round of immunoprecipitation were treated with TRIzol reagent to isolate putative Stau1 bound RNAs. RNAs were qRT-PCR amplified using oligonucleotide primers for ARF1 and PAICS mRNAs, two known Stau1 bound mRNAs (Kim et al. 2005). This figure is representative of three independent experiments.

This may not be crucial in the presence of functional dsRBD5 (Fig. 4C,D, Stau1-Stau1^{Δ2}, Stau1^{Δ2}-Stau1^{Δ2}), but it may explain why Stau1^{Δ2} and Stau1^{Δ5} only poorly interact in live cells (Fig. 4D) when dsRBD5-mediated protein–protein interactions are prevented.

Stau1 and the organization of mRNP complexes

The involvement of both Stau1 RNA-binding activity and protein–protein interaction for Stau1 self-multimerization suggests that Stau1 may act as an organizer of mRNP formation. In this model, Stau1 recognizes and binds specific mRNAs to be transported via its RNA-binding domains and organizes these mRNAs into functional mRNP complexes through protein–protein interaction involving dsRBD5 and likely dsRBD2. Interestingly, two of the known Stau1 RNA substrates are known to form homodimers: *bicoid* mRNAs in *Drosophila* (Ferrandon et al. 1997) and HIV-1 genomic RNA in humans (Darlix et al. 1990). Therefore, complexes may be formed through both Stau1 and RNA self-association. This novel function of Stau1 in complex formation would be complementary to other known downstream functions of Stau1 in mRNA transport, translation, and decay. Moreover, Stau1 was shown to make direct protein–protein interaction with tubulin (Wickham et al. 1999), ribosomes (Luo et al. 2002; Brendel et al. 2004), the nonsense mediated factor Upf1 (Kim et al. 2005; Gong et al. 2009), and protein phosphatase I (Monshausen et al. 2002), proteins known to be present in Stau1-containing mRNPs. Therefore, not only Stau1 can organize mRNPs through self-association, it can also attract additional RNP-associated proteins through direct interaction. Interestingly, all these interactions were mapped within the Stau1 TBD domain, a region that is not involved in RNA binding or Stau1 self-association. Therefore, Stau1 has the capability to select mRNAs, organize multimeric mRNA–protein structures, and attract additional proteins to form functional mRNPs.

Several data in the literature are consistent with this model. First, Stau1 is known to co-localize with mRNAs in mRNP complexes (Kiebler et al. 1999; Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001; Mallardo et al. 2003; Kanai et al. 2004; Furic et al. 2008) and directly bind mRNAs through a specific *cis*-acting element (Wickham et al. 1999; Kim et al. 2007), indicating that Stau1 has the capability to select mRNAs to be transported and form functional mRNPs. Second, biochemical and proteomic studies have shown that Stau1 is a component of large complexes that contain mRNA and protein cofactors (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004). Its capacity to bind both mRNAs and specific mRNP-associated proteins via protein–protein interaction (see above) will facilitate the coordination between the fate of Stau1-bound mRNAs and proteins required to fulfill the functions. Third, relatively few Stau1 molecules were detected as monomers or dimers (Mallardo et al. 2003),

indicating that Stau1 forms higher-order structures. The biochemical and BRET/PCA results (Figs. 6–8) that show the ability of Stau1 to form oligomers in live cells support this conclusion. Fourth, *in situ* hybridization using Stau1-bound mRNA sequences as probes revealed that, as a consequence of Stau1 down-regulation, the amount of granules containing these specific mRNAs is reduced in dendrites (Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Although these data can be interpreted as an indication that Stau1 down-regulation impairs mRNA transport, they may also indicate that Stau1 down-regulation also impairs mRNPs formation. Finally, the oligomeric nature of Stau1-containing particles in dendrites was exemplified in mouse with a loss-of-function allele for Stau1 (Stau1^{tm1Apa}). Whereas a transport-defective ΔStau1-YFP was not properly transported in dendrites following transfection in hippocampal neurons derived from Stau1^{tm1Apa} mouse, it was normally transported in neurons from wild-type mouse (Vessey et al. 2008). This result indicates that wild-type Stau1 can rescue the transport of ΔStau1, likely through an interaction that forms functional mRNPs to be transported in dendrites. A similar mechanism can be used to control the functions of mRNP complexes. Of particular interest is Stau1ⁱ, a Stau1 isoform that contains an insertion of six amino acids in dsRBD3 that impairs its ability to bind RNA and causes the formation of RNA-binding-defective particles (Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001). Its association with Stau1 in mRNPs modulates the RNA content of Stau1-containing mRNPs and their functions.

In conclusion, our results suggest that the formation of large Stau1-containing mRNP complexes may be initiated by Stau1 itself through both RNA-binding and homophilic and heterophilic protein–protein interactions. This mechanism may represent a first step for the regulation of downstream Stau1 functions such as mRNA transport and localization (Kanai et al. 2004), nuclear transit (Martel et al. 2006), translation regulation (Dugre-Brisson et al. 2005), interaction with the cytoskeleton (Wickham et al. 1999), and Stau1-mediated mRNA decay (Kim et al. 2005, 2007). Using sensitive and novel approaches, we were able for the first time to show that Stau1 dimers and most likely oligomers are associated with mRNAs. These techniques will contribute to our understanding of mRNA particle formation and transport and of how their misregulation may impair Stau1-mediated cellular functions.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Goat polyclonal and mouse monoclonal anti GFP antibodies were obtained from Rockland and Roche Applied Science, respectively. Mouse monoclonal anti β actin clone AC 74 and mouse monoclonal anti Flag M2 were obtained from Sigma Aldrich. The mouse monoclonal anti Stau1 (clone 11C6) and anti HA (clone

12CA5) antibodies were previously described (Dugre Brisson et al. 2005). Anti mouse and anti goat polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from DakoCytomation. X gal and imidazole were purchased from Bioshop. Western blot signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences).

cDNA construction

YFP fused Stau1 mutants (Luo et al. 2002), Stau1 Rluc (Chatel Chaix et al. 2004), Stau1 HA₃, Stau1^{Δ2} his₆ plasmids (Wickham et al. 1999), GABA_BR1 YFP, GABA_BR2 Rluc (Perroy et al. 2003), and PKAreg Rluc^{F1} and PKAcadRluc^{F2} (Stefan et al. 2007) were previously described. Stau1^{Δ2} Rluc and Stau1^{Δ5} Rluc were constructed from Stau1 Rluc by the all around technique. Oligonucleotides used to generate these constructs are listed in Table 1. The 4K mutant was constructed from the 2K mutant (Dugre Brisson et al. 2005) by the all around technique (Table 1). The PCR fragment corresponding to PABP was digested with BamHI and cloned in pCMV YFP topaz (Packard Bioscience/PerkinElmer LifeSciences).

PCR fragments corresponding to dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4, and dsRBD5 of Stau1 (Table 1) were digested with EcoRI and XhoI enzymes and cloned into pLexA pre digested with EcoRI and XhoI. The PCR fragment corresponding to the TBD domain was digested with MunI and XhoI and cloned into pLexA pre

digested with EcoRI and XhoI. Full length Stau1 was obtained by PCR amplification (Table 1) and digested with XhoI. This fragment was cloned into pB42AD pre digested with XhoI.

Recombinant protein production and purification

Bacterially expressed his₆ Stau1 and neutral endopeptidase his₆ NEP were purified as previously described (Wickham et al. 1999). Aliquots of the purified proteins were stored at -80°C until use. Protein concentration was determined by the Bio Rad dye reagent and BSA as a standard. For the pull down assays, his₆ Stau1 and his₆ NEP (as control) were immobilized on a Ni NTA agarose matrix and in vitro translated ³⁵S labeled Stau1 was loaded onto the column. After extensive washings, bound proteins were eluted with 300 mM imidazole, and three successive elution fractions were analyzed by SDS PAGE and autoradiography. In parallel, the in vitro translated ³⁵S Stau1 extract was treated with 20 pg/mL RNase A for 1 h prior to loading.

Yeast two-hybrid assay

The EGY48 strain was transformed with the pLexA or pB42 plasmids containing the Stau1 fragments of interest. Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media.

TABLE 1. Primers used for PCR amplification

Domain	Orientation	Restriction	Sequence
Stau1 ^{Δ2} Rluc	Sense		5' GAGGTGAATGGAAGAGAATCCGAA 3'
	Antisense		5' CATAAGCTTGATATCCTGCAGACG 3'
Stau1 ^{Δ5} Rluc	Sense		5' ATCCCACCGGCTAGAGCCACC 3'
	Antisense		5' CTCAGAGGGTCTCGTGAGAGG 3'
Stau1 ^{4K} Rluc	Sense		5' GCACCAACGCGCGGTGGCCA 3'
	Antisense		5' TGGCCACCGCCGCTTGGTGC 3'
Stau1 Rluc ^{F1/F2}	Sense	NotI	5' TAGCAT GCGGCCG CATGAACTTGGAAAAAACC 3'
	Antisense	Clal	5' AGAGAT ATCGAT GCACCTCCACACACA -3'
PABP YFP	Sense	BamHI	5' ACA AGGATCC GCCACCATGAACCCAGTGCC 3'
	Antisense	BamHI	5' TTGT GGATCC GCAACAGTTGGAACACCGGT 3'
dsRBD2 pLexA	Sense	EcoRI	5' TAGATAT CGAATTC GCCGCCATGGGATACCCATTCCAG 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCCAGGATCCTCAA 3'
dsRBD3 pLexA	Sense	EcoRI	5' TAGATAT CGAATTC GCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCAACTGCAGTGCAGG 3'
dsRBD4 pLexA	Sense	EcoRI	5' TAGATAT CGAATTC GCCGCCATGGGAAATCCGATTAGC 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCAAGGATCTCCAG 3'
dsRBD5 pLexA	Sense	EcoRI	5' TAGATAT CGAATTC GCCGCCATGGGACCCTCTGAGCAA 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCGCACCTCCACACAC 3'
TBD pLexA	Sense	MunI	5' TAGATAT CAATTG GCCGCCATGGGAAAACCCGCACT 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCGGCAGTTACCGTGGC 3'
Stau1 pB42AD	Sense	XhoI	5' GATG CTCGAG ATGAACTTGGAAAAAACC 3'
	Antisense	XhoI	5' TATA CTCGAG GATATCGCACCTCCACACAC 3'
Arf1	Sense		5' TCAACGTGGAACCGTGGAGTACA 3'
	Antisense		5' AGATCAGGCCTTGTGTCTGGGA 3'
PAICS	Sense		5' TTTGGGACCAAGTGTCTGGGAA 3'
	Antisense		5' TTGAACAGCAAGACCACTGGGTA 3'

Restriction sites are underlined and shown in boldface.

Cell culture, transfection, and BRET assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone). Transfections were carried out with the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). BRET experiments were carried out as described (Chatel Chaix et al. 2004, 2007). Briefly, cells were plated into 12 well plates at 120,000 cells per well. Twenty four hours later, cells were transfected with constant amounts of plasmids coding for Rluc tagged fusion protein (10 ng) and increasing amounts of plasmids coding for YFP tagged proteins (0–500 ng) as indicated. BRET assays were performed 24 h post transfection in live cells. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature and diluted to 10^6 cells per mL. Coelenterazine H (NanoLight Technology) was added to 90 μ L of cells at a final concentration of 5 μ M. A saturation curve can be drawn when the Rluc tagged protein becomes saturated by YFP tagged proteins, and an optimal BRET ratio can be calculated at saturation for a specific protein-protein interaction. Luminescence (440–500 nm) as well as total and transmitted fluorescence (510–590 nm) emissions were measured using a Fusion α FP apparatus (PerkinElmer). The BRET ratio was defined as [(emission at 510 to 590 nm) – (emission at 440 to 500 nm) \times Cf]/(emission at 440–500 nm), where Cf corresponds to (emission at 510 to 590 nm)/(emission at 440 to 500 nm) when Rluc fused protein is expressed alone. The total YFP activity/Rluc activity ratio reflects the relative levels of activity of the two fusion proteins in the cells. When BRET was carried out in cell extracts, cells were lysed in 200 μ L of lysis buffer (0.1 M Tris Cl at pH 7.9, 0.5% Nonidet P40, 1 mM DTT) and incubated for 15 min at room temperature with or without 30 μ g/mL of RNase A (Fermentas).

For BRET between Stau1 Rluc and RNA, 1 μ L of SYTO 14 (Invitrogen), an RNA selective fluorescence dye used as energy acceptor, was added to 100,000 cells or to cell extracts and was incubated for 20 min at room temperature. Because the emission of SYTO14 is shifted to the red compared with that of YFP, a 550 long pass filter (Chroma) was used as acceptor filter. The BRET ratio was calculated as described before by making the ratio of the acceptor filter over the donor filter.

Microscopy

COS 7 cells were transfected with plasmids (500 ng) coding for different Stau1 mutants using PEI as previously described (Guerra Crespo et al. 2003). Cells were fixed in a freshly made 4% paraformaldehyde solution in PBS for 20 min at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton X 100 in PBS. Coverslips were mounted on microscope slides using DAKO fluorescent medium and images were taken on a Nikon TE2000U equipped with a CoolSnap fx CCD camera, a 60 \times objective (Pan Apo, N.A. 1.4), and a YFP filter cube (Chroma #41028). Images were treated in ImageJ 1.43d. The YFP channels were gamma corrected (0.5), the black level was subtracted (modal value), and the brightness and contrast were set to 0.5% saturation.

Immunoprecipitation and qRT-PCR

HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were harvested 24 h post transfection, washed three times in ice cold PBS, and lysed in buffer (50 mM Tris Cl at pH 7.5, 1% Triton X 100, 15 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, Complete EDTA free

protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]) supplemented or not with RNaseOUT RNase inhibitor (Invitrogen). Lysates were cleared by centrifugation at 17,000g for 15 min. The supernatant was incubated with or without 30 μ g/mL RNase A for 10 min at 37°C and then pre cleared with protein G sepharose (GE Healthcare) for 45 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with goat polyclonal anti GFP antibodies for 2 h at 4°C and then with protein G sepharose for 90 min at 4°C. Immune complexes were washed three times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating for 5 min at 95°C in 2 \times protein loading buffer (125 mM Tris Cl at pH 6.8, 10% glycerol, 3.3% SDS, 0.2 M DTT, and 0.04% bromophenol blue). Proteins were analyzed by SDS PAGE and Western blotting using monoclonal antibodies against the indicated proteins.

For the successive immunoprecipitation experiments, lysates were prepared as described above except that DTT and RNase inhibitor were omitted. The first immunoprecipitation was carried out with anti Flag M2 affinity gel (Sigma Aldrich) and eluted with the Flag peptide (Sigma Aldrich) as described previously (Chatel Chaix et al. 2008). The eluate was then pre cleared with protein G sepharose and the second immunoprecipitation was performed with polyclonal anti GFP as described above. One third of the immune complex was analyzed by SDS PAGE and Western blotting and two thirds was used for qRT-PCR analysis. To this end, RNA was isolated from the immunoprecipitates using the TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 μ L of water and digested with DNase using the TURBO DNA free kit (Ambion). Reverse transcription reactions were done with 4 μ L of RNA using the MuLV RT enzyme from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Specific antisense primers used to produce the cDNAs were 5' AGATCAGGCCTTGTGTGTTCTGGA 3' for Arf1 and 5' TTGAACAGCCAAGACCACTGGGTA 3' for PAICS. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche). Sense and antisense primers are described in Table 1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francis Goyette, Phu Vinh On, Monique Vasseur, Louise Cournoyer, and Linda Huang for technical assistance. C.M., T.D., V.T., and S.D. B. were supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and K.B. received studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work was supported by a grant from NSERC to L.D.G.

Received March 30, 2009; accepted November 19, 2009.

REFERENCES

- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S. 2004. Characterization of Stau1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**: 239–246.
- Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. 1999. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* stau1 protein in the chromosome 8q13 q21.1 region. *Genomics* **62**: 113–118.
- Bycroft M, Grunert S, Murzin AG, Proctor M, St Johnston D. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from

- Drosophila* staufen protein reveals homology to the N terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J* **14**: 3563–3571.
- Chatel Chaix L, Clement JF, Martel C, Beriault V, Gatignol A, DesGroseillers L, Moulard AJ. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* **24**: 2637–2648.
- Chatel Chaix L, Abrahamyan L, Frechina C, Moulard AJ, DesGroseillers L. 2007. The host protein Staufen1 participates in HIV 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol* **81**: 6216–6230.
- Chatel Chaix L, Boulay K, Moulard AJ, DesGroseillers L. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV 1 assembly via its N terminus. *Retrovirology* **5**: 41. doi: 10.1186/1742-4690-5-41.
- Daher A, Longuet M, Dorin D, Bois F, Segeral E, Bannwarth S, Battisti PL, Purcell DF, Benarous R, Vaquero C, et al. 2001. Two dimerization domains in the *trans* activation response RNA binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV 1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* **276**: 33899–33905.
- Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, Barre Sinoussi F. 1990. *Cis* elements and *trans* acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV 1. *J Mol Biol* **216**: 689–699.
- DesGroseillers L, Lemieux N. 1996. Localization of a human double stranded RNA binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **36**: 527–529.
- Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, et al. 2003. The Staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long term memory. *Curr Biol* **13**: 286–296.
- Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. 2000. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* **20**: 5592–5601.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. 2002. Staufen2 isoforms localize to the somato dendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* **115**: 3285–3295.
- Dugre Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel Chaix L, Moulard AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**: 4797–4812.
- Ferrandon D, Koch I, Westhof E, Nusslein Volhard C. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR STAU-FEN ribonucleoprotein particles. *EMBO J* **16**: 1751–1758.
- Furic L, Maher Laporte M, DesGroseillers L. 2008. A genome wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1 and Staufen2 containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* **14**: 324–335.
- Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: Effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & Dev* **23**: 54–66.
- Guerra Crespo M, Charli JL, Rosales Garcia VH, Pedraza Alva G, Perez Martinez L. 2003. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* **127**: 179–192.
- Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M. 2006. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). In *Current protocols in neuroscience* (ed. D Sibley), Chap. 5, Unit 5.23. Wiley, New York.
- Hitti EG, Sallacz NB, Schoft VK, Jantsch MF. 2004. Oligomerization activity of a double stranded RNA binding domain. *FEBS Lett* **574**: 25–30.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA transporting granule. *Neuron* **43**: 513–525.
- Kharrat A, Macias MJ, Gibson TJ, Nilges M, Pastore A. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *EMBO J* **14**: 3572–3584.
- Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, Ortin J, Dotti CG. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: Implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**: 288–297.
- Kim YK, Furic L, DesGroseillers L, Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**: 195–208.
- Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J* **26**: 2670–2681.
- Kim Ha J, Kerr K, Macdonald PM. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA binding protein, is essential. *Cell* **81**: 403–412.
- Krichevsky AM, Kosik KS. 2001. Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation dependent translation. *Neuron* **32**: 683–696.
- Lamontagne B, Tremblay A, Abou Elela S. 2000. The N terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double stranded RNA cleavage. *Mol Cell Biol* **20**: 1104–1115.
- Lebeau G, Maher Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, DesGroseillers L, Lacaille JC. 2008. Staufen1 regulation of protein synthesis dependent long term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* **28**: 2896–2907.
- Lemaire PA, Lary J, Cole JL. 2005. Mechanism of PKR activation: Dimerization and kinase activation in the absence of double stranded RNA. *J Mol Biol* **345**: 81–90.
- Liu J, Hu JY, Wu F, Schwartz JH, Schacher S. 2006. Two mRNA binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* **26**: 5204–5214.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007. RNA binding proteins: Modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 479–490.
- Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen ribosome association. *Biochem J* **365**: 817–824.
- Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA. 2003. Isolation and characterization of Staufen containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 2100–2105.
- Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. 2004. The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* **29**: 618–625.
- Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**: 2212–2219.
- Martel C, Macchi P, Furic L, Kiebler MA, DesGroseillers L. 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* **393**: 245–254.
- Martin KC, Ephrussi A. 2009. mRNA localization: Gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**: 719–730.
- Mickle DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D. 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J* **19**: 1366–1377.
- Monshausen M, Putz U, Rehbein M, Schweizer M, DesGroseillers L, Kuhl D, Richter D, Kindler S. 2001. Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *J Neurochem* **76**: 155–165.
- Monshausen M, Rehbein M, Richter D, Kindler S. 2002. The RNA binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase 1. *J Neurochem* **81**: 557–564.
- Nanduri S, Rahman F, Williams BR, Qin J. 2000. A dynamically tuned double stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* **19**: 5567–5574.

- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M. 2003. Phosphorylation independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* **22**: 3816–3824.
- Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC. 2001. Modular structure of PACT: Distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol* **21**: 1908–1920.
- Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, Freund S, Bycroft M, St Johnston D, Varani G. 2000. RNA recognition by a Staufen double stranded RNA binding domain. *EMBO J* **19**: 997–1009.
- Rodriguez AJ, Czaplinski K, Condeelis JS, Singer RH. 2008. Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 144–149.
- Ryter JM, Schultz SC. 1998. Molecular basis of double stranded RNA protein interactions: Structure of a dsRNA binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J* **17**: 7505–7513.
- Sossin WS, DesGroseillers L. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**: 1581–1589.
- St Johnston D, Beuchle D, Nusslein Volhard C. 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**: 51–63.
- Stefan E, Aquin S, Berger N, Landry CR, Nyfeler B, Bouvier M, Michnick SW. 2007. Quantification of dynamic protein complexes using *Renilla* luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 16916–16921.
- Valente L, Nishikura K. 2007. RNA binding independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *J Biol Chem* **282**: 16054–16061.
- Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, Wieczorek K, Vendra G, Riefler J, Tubing F, et al. 2008. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1 RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 16374–16379.
- Villace P, Marion RM, Ortin J. 2004. The composition of Staufen containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**: 2411–2420.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. 1999. Mammalian staufen is a double stranded RNA and tubulin binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**: 2220–2230.