

Université de Montréal

Étude des mécanismes moléculaires menant à la migration cellulaire  
associée à Rac1 et ARF6.

par

Mathieu Cotton

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Décembre 2008

© Mathieu Cotton, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des mécanismes moléculaires menant à la migration cellulaire  
associée à Rac1 et ARF6.

Présenté par :  
Mathieu Cotton

est évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean-François Gauchat, président-rapporteur  
Dre Audrey Claing, directrice de recherche  
Dre Graciela Pineyro, membre du jury  
Dre Nathalie Rivard, examinatrice externe  
Dr René Cardinal, représentant du doyen

## Résumé

Le facteur de l'ADP-ribosylation 6 (ARF6) et Rac1 sont des petites protéines liant le GTP qui régulent plusieurs voies de signalisation comprenant le trafic de vésicules, la modification des lipides membranaires et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 et Rac1 agissent de concert afin de contrôler ces différents processus cellulaires restent méconnus.

Dans cette étude, nous montrons que, dans les cellules HEK293, ARF6 et Rac1 sont retrouvées en complexe suite à la stimulation du récepteur à l'angiotensine. Des expériences réalisées *in vitro* nous indiquent que ces deux GTPases interagissent ensemble directement, et que ARF6 s'associe préférentiellement avec la forme inactive de Rac1. L'inhibition de l'expression de ARF6 par interférence à l'ARN entraîne une activation marquée en cellule de Rac1 via le facteur PIX, indépendamment de la stimulation d'un récepteur, ce qui provoque la migration non contrôlée des cellules.

Les arrestines, protéines de régulation de la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G, servent de protéines d'échafaudage pour Rac1 et ARF6, en interagissant directement avec les GTPases et en augmentant leur association stimulée par l'angiotensine. De plus, les arrestines permettent l'activation, en s'en dissociant, de la MAP Kinase p38 qui régule l'activité de ARF6 et son interaction précoce avec les arrestines. Mis ensemble, ces résultats montrent que les arrestines contrôlent l'activité de ARF6, en influençant p38. ARF6 joue un rôle inhibiteur sur l'activation basale de Rac1 pour permettre ensuite son recrutement et son activation dépendante de l'angiotensine.

Cette étude nous a permis de préciser le mode de régulation mis en jeu dans l'initiation de la migration cellulaire, suite à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G. Par le fait même, nous avons identifié certains des acteurs impliqués dans ce processus, offrant ainsi de nouvelles cibles pour le traitement des déséquilibres pathophysiologiques de la migration cellulaire.

**Mots-clés :** Rac1, ARF6, arrestines, p38, Récepteurs Couplés aux Protéines G, migration.

## Abstract

The ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) and Rac1 are small GTP-binding proteins that regulate several signaling events ranging from vesicle trafficking, to modification of membrane lipids and reorganization of the actin cytoskeleton. However, the molecular mechanisms by which ARF6 and Rac1 act in concert to control these different cellular processes remain unclear.

Here, we show that in HEK 293 cells, ARF6 and Rac1 can be found in complex upon stimulation of the angiotensin receptor (ATR). In vitro experiments indicate that these two small G proteins can directly interact together, and that ARF6 preferentially interacts with the GDP-bound form of Rac1. Depletion of ARF6 by RNA interference leads to a marked PIX-dependent Rac1 activation in cells, independently of receptor stimulation, leading to uncontrolled cell migration.

Arrestins, which are known for their role in G protein-coupled receptor desensitization, act as scaffold proteins toward Rac1 and ARF6, by directly interacting with the GTPases and by increasing their agonist-promoted association. Besides, arrestins allow p38 MAP Kinase activation, by releasing it, which regulates ARF6 activity and early association occurring between arrestins and ARF6. Taken together, this study shows that arrestins control ARF6 activity, by managing p38. ARF6 is an inhibitor of basal Rac1 activation to further allow the protein to be recruited and activated following angiotensin treatment.

This study allowed us to precise how cell migration induction is regulated following G protein-coupled receptor activation. As a result, we identified some of the key players implicated in this process, providing new targets in the treatment of patho-physiological imbalance in cell migration.

**Keywords :** Rac1, ARF6, arrestins, p38, G-Protein Coupled Receptor, migration.

## Tables des matières

<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.</b>	<b>14</b>
<b>I.1 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G.</b>	<b>14</b>
<b>I.1.1 Les familles de RCPG : classification.</b>	<b>15</b>
<b>I.1.2 La signalisation des RCPGs via les protéines G.</b>	<b>18</b>
I.1.2.1 La voie $G_s$ .	19
I.1.2.2 La voie $G_{i/o}$ .	19
I.1.2.3 La voie $G_{q/11}$ .	20
I.1.2.4 La voie $G_{12/13}$ .	20
<b>I.1.3 Désensibilisation et internalisation.</b>	<b>21</b>
I.1.3.1 Les GRKs.	21
I.1.3.2 Les PKA et PKC.	24
I.1.3.3 Les arrestines.	26
<i>I.1.3.3.1 Localisation et recrutement des arrestines au récepteur.</i>	<i>27</i>
<i>I.1.3.3.2 Arrestines et internalisation.</i>	<i>30</i>
<i>I.1.3.3.3 Ubiquitination des arrestines.</i>	<i>32</i>
<i>I.1.3.3.4 Les arrestines et l'activation des MAP Kinases.</i>	<i>34</i>
<i>I.1.3.3.5 Les autres voies de signalisation dépendantes des arrestines.</i>	<i>36</i>
<b>I.1.4 L'angiotensine II.</b>	<b>37</b>
I.1.4.1 Le système rénine-angiotensine.	37
I.1.4.2 Les rôles de l'angiotensine II.	37
I.1.4.3 Les récepteurs de l'angiotensine.	39
I.1.4.4 La signalisation de l'angiotensine II.	39
<b>I.2 LES GTPASES MONOMÉRIQUES.</b>	<b>40</b>
<b>I.2.1 Les Rho GTPases.</b>	<b>42</b>

I.2.1.1 Rac1.....	43
<i>I.2.1.1.1 Rac1 et le réarrangement du cytosquelette.</i> .....	44
<i>I.2.1.1.2 Rac1 et le contrôle de la NADPH oxydase.</i> .....	45
<i>I.2.1.1.3 Rac1 et cancer.</i> .....	45
I.2.1.2 Cdc42. ....	47
I.2.2.3 RhoA.....	47
<b>I.2.2 ARF6.....</b>	<b>48</b>
I.2.2.1 ARF6 et les lipides membranaires. ....	49
I.2.2.2 ARF6 et l'endocytose des RCPGs.....	50
I.2.2.3 Rôle d'ARF6 dans la formation de vésicules. ....	50
I.2.2.4 ARF6 et le réarrangement du cytosquelette. ....	51
<b>I.2.3 Les protéines régulatrices des GTPases. ....</b>	<b>52</b>
I.2.3.1 Les RhoGEFs. ....	53
I.2.3.2 PIX.....	53
I.2.3.3 Les Rho GAPs.....	54
I.2.3.4 Les ARF GEFs. ....	55
I.2.3.5 Les ARF-GAPs.....	56
I.2.3.6 GIT.....	56
<b>I.2.4 Relations entre Rac1 et ARF6. ....</b>	<b>57</b>
<b>I.2.5 Le complexe GIT-PIX. ....</b>	<b>58</b>
<b>I.3 LE RÉARRANGEMENT DU CYTOSQUELETTE : MIGRATION ET ADHÉSION. ....</b>	<b>59</b>
<b>I.3.1 Les bases moléculaires de la migration cellulaire. ....</b>	<b>60</b>
I.3.1.1 Le rôle de l'actine dans la migration. ....	60
I.3.1.2 Le rôle des microtubules dans la migration. ....	63

<b>I.3.2 L'adhésion.</b> .....	<b>64</b>
I.3.2.1 Le cycle des points d'adhésion focaux. ....	64
I.3.2.2 Le rôle du cytosquelette d'actine lors de l'adhésion. ...	66
I.3.2.3 Le rôle des microtubules dans l'adhésion.....	66
<b>I.4 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.</b> .....	<b>67</b>
<b>CHAPITRE II: ENDOGENOUS ARF6 INTERACTS WITH RAC1 UPON ANGIOTENSIN II STIMULATION TO REGULATE MEMBRANE RUFFLING AND CELL MIGRATION.....</b>	<b>70</b>
<b>II.1 SUMMARY</b> .....	<b>72</b>
<b>II.2 INTRODUCTION</b> .....	<b>73</b>
<b>II.3 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>76</b>
<b>II.4 RESULTS</b> .....	<b>82</b>
<b>II.5 DISCUSSION</b> .....	<b>89</b>
<b>II.6 FIGURES.</b> .....	<b>94</b>
<b>CHAPITRE III: <math>\beta</math>ARRESTIN MEDIANTE ARF6 AND RAC1 ACTIVATION TO PROMOTE ANGIO-DEPENDENT MEMBRANE RUFFLING.....</b>	<b>113</b>
<b>III.1 INTRODUCTION.</b> .....	<b>115</b>
<b>III.2 MATERIALS AND METHODS.</b> .....	<b>116</b>
<b>III.3 RESULTS.</b> .....	<b>121</b>
<b>III.4 DISCUSSION</b> .....	<b>125</b>
<b>III.5 FIGURES.</b> .....	<b>129</b>
<b>III.6 REFERENCES</b> .....	<b>138</b>



<b>CHAPITRE IV: DISCUSSION.</b> .....	<b>143</b>
<b>IV.1 LE CONTRÔLE DE ARF6 SUR L'ACTIVITÉ DE RAC1.</b> .....	<b>143</b>
<b>IV.2 L'INTERACTION ENTRE RAC1 ET ARF6.</b> .....	<b>146</b>
<b>IV.3 LE RÔLE DES ARRESTINES DANS LA MIGRATION CELLULAIRE.</b> ..	<b>149</b>
<b>IV.3.1 Le complexe composé de Rac, ARF6 et des arrestines.</b>	<b>149</b>
<b>IV.3.2 Arrestines et ondulations de membrane.</b> .....	<b>151</b>
<b>IV.4 LE ROLE DE P38 DANS LA MIGRATION.</b> .....	<b>152</b>
<b>IV.4.1 Le rôle de p38 dans la régulation du complexe entre Rac1 et ARF6.</b> .....	<b>152</b>
<b>IV.4.2 Le lien entre p38 et les arrestines.</b> .....	<b>153</b>
<b>IV.5 CONCLUSION GÉNÉRALE.</b> .....	<b>155</b>
<b>V.6 RÉFÉRENCES.</b> .....	<b>157</b>
<b>ANNEXE:</b> .....	<b>189</b>
<b>G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS STIMULATION AND THE CONTROL OF CELL MIGRATION.</b> .....	<b>189</b>
<b>1. INTRODUCTION.</b> .....	<b>191</b>
<b>2. ACTIVATION OF HETEROTRIMERIC G PROTEINS.</b> .....	<b>193</b>
<i>Receptor coupling to G<sub>i</sub>.</i> .....	193
<i>Receptor coupling to G<sub>s</sub>.</i> .....	194
<i>Receptor coupling to G<sub>q</sub>.</i> .....	194
<i>Receptor coupling to G<sub>12/13</sub>.</i> .....	195
<b>3. MONOMERIC G PROTEINS AS CENTRAL REGULATORS OF ACTIN REMODELING AND CELL MIGRATION.</b> .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<i>Rho GTPases.</i> .....	196
<i>ARF GTPases.</i> .....	199
<b>4. ROLE OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES (GRKs), ARRESTINS AND REGULATORS OF G PROTEIN SIGNALLING (RGS) IN THE CONTROL OF CELL MIGRATION.</b> .....	<b>201</b>
GRKs.....	201
Arrestins.....	203

RGS.....	204
<b>5. TRANSACTIVATION OF TYROSINE KINASE RECEPTORS BY G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, AN ALTERNATIVE MECHANISM LEADING TO CELL MIGRATION. ....</b>	<b>206</b>
<b>6. PERSPECTIVES.....</b>	<b>207</b>
<b>7. FIGURES.....</b>	<b>210</b>
<b>8. REFERENCES.....</b>	<b>214</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les RCPGs, leurs activateurs et leurs effecteurs.....	15
<b>Figure 2</b> : Les différentes classes de RCPGs.....	17
<b>Figure 3</b> : Désensibilisation et internalisation des RCPGs.....	32
<b>Figure 4</b> : Le système Rénine-Angiotensine.....	38
<b>Figure 5</b> : Le mécanisme de régulation des GTPases monomériques.....	42
<b>Figure 6</b> : Les principaux rôles des Rho GTPases lors de la migration cellulaire.....	46
<b>Figure 7</b> : La polymérisation de l'actine.....	62
<b>Figure 8</b> : Les étapes de la migration cellulaire.....	65
<b>Figure 1, Cotton et al. 2007</b> : Ang II promotes the activation of ARF6 and Rac1.....	94
<b>Figure 2, Cotton et al. 2007</b> : AT1R-stimulation promotes the association of ARF6 and Rac1.....	95
<b>Figure 3, Cotton et al. 2007</b> : Activated ARF6 binds directly to the GDP-bound form of Rac1.....	96
<b>Figure 4, Cotton et al. 2007</b> : Depletion of ARF6 increases basal Rac1 activation.....	97

<b>Figure 5, Cotton et al. 2007</b> : Ang II stimulation or ARF6 depletion promotes membrane ruffling in Hep2 cells.....	98
<b>Figure 6, Cotton et al. 2007</b> : Ang II stimulation or depletion of ARF6 promotes HEK 293 cell migration.....	99
<b>Figure 7, Cotton et al. 2007</b> : Ang II stimulation or depletion of ARF6 promotes HEK 293 cell migration.....	100
<b>Figure 8, Cotton et al. 2007</b> : $\beta$ -PIX is localized to the plasma membrane in ARF6-depleted cells.....	101
<b>Figure 9, Cotton et al. 2007</b> : Schematic diagram depicting a potential role for ARF6 and Rac1 in Ang II-stimulated membrane ruffling and cell migration.....	102
<b>Supplemental material figure 1, Cotton et al. 2007</b> : Ang II promotes the activation of overexpressed Rac1.....	103
<b>Supplemental material figure 2, Cotton et al. 2007</b> : AT1R-stimulation promotes Rac1 and ARF6 complex formation.....	104
<b>Supplemental material figure 3, Cotton et al. 2007</b> : Depletion of ARF1 does not affect basal or Ang II stimulated membrane ruffling in HEK 293 cells.....	105
<b>Figure 1, Cotton et al. 2008</b> : Arrestins are essential to both AT <sub>1A</sub> R mediated ARF6 and Rac1 activation, as membrane ruffling.....	129
<b>Figure 2, Cotton et al. 2008</b> : AngII promotes Rac1 and ARF6 interaction with arrestins.....	130
<b>Figure 3, Cotton et al. 2008</b> : Arrestins are essential regulators of Rac1 and ARF6 interaction.....	131
<b>Figure 4, Cotton et al. 2008</b> : SII treatments leads ARF6 activation and to the association of Rac1 and ARF6.....	132
<b>Figure 5, Cotton et al. 2008</b> : Activation of p38 is essential to Rac1 and ARF6 activity to initiate membrane ruffling.....	133
<b>Figure 6, Cotton et al. 2008</b> : p38 is essential to AT <sub>1A</sub> R mediated ARF6 and Rac1 activation.....	134
<b>Figure 7, Cotton et al. 2008</b> : Diagram presenting the potential event chronology linking $\beta$ arrestins, p38, ARF6 and Rac1 following AT <sub>1A</sub> R stimulation.....	135

## Liste des abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

AJ : Jonction d'adhérence

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ang II : Angiotensine II

ARD : Protéine à domaine commun aux facteurs de ribosylation de l'ADP

ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP

ARL : Protéine ARF-like

ARNO : « ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener »

AT<sub>1A</sub>R : Récepteur de type 1A de l'angiotensine II

β<sub>2</sub>AR : Récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique

C-ter : extrémité carboxyl-terminale

DAG : Diacylglycérol

EGF : Facteur de croissance épidermique

GAP : Protéine activant les GTPases

GDI : Inhibiteur de dissociation du GDP

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Facteur d'échange de guanosine

GRK : Kinase des récepteurs couplés aux protéines G

GTP : Guanosine triphosphate

HB-EGF : Facteur de croissance épidermique liant l'héparine

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

JNK : « c-Jun N-terminal kinase »

IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate

LH : Hormone lutéinisante

LPA : Acide lysophatidique du sérum

MAP : Mitogen-activated protein

MDCK : « Madin-Darby kidney cells »

MRCK : Kinase de la dystrophie myotonique liant Cdc42

MT : Microtubule

N-ter : extrémité amino-terminale

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NFκB : Facteur nucléaire κB

PAK : Kinase activée par p21

PAR : Récepteur activé par les protéases

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PI3K : phosphatidyl inositol-3 Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-(3,4,5) biphosphate

PI-(3,4,5)P3 : Phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate

PIX : Facteur d'échange interagissant avec PAK

PKC : Protéine kinase C

PLD : Phospholipase D

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RGS : Régulateur du signal des protéines G

ROK, ROCK : Kinase de Rho

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

RTK : Récepteur tyrosine kinase

SDF-1 : Facteur des cellules stromales de type 1

N-WASP : Protéine du syndrome de Wiskot-Aldrich neuronale

WASP : Protéine du syndrome de Wiskot-Aldrich

## Remerciements

J'aimerais remercier mes parents, Francine et Jean-Michel, ainsi que mon frère Cédric, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces sept années passées loin d'eux.

Je remercie Anne-Cécile qui a toujours été à mes côtés malgré les longues périodes d'éloignement. J'espère que ce sacrifice en a valu la peine et que l'on va enfin pouvoir se retrouver.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire, passés et présents, dont Marie-Eve, Dominique, Tanguy, Pierre-Luc, Zeïnab, Derek, Dario, Ricardo et Danaë. Travailler avec vous fut un plaisir. J'ai appris ce qu'était l'importance d'une excellente ambiance d'équipe, à la fois joyeuse et studieuse, et je vous en suis reconnaissant.

J'aimerais remercier aussi mes amis du Québec, dont mon groupe, Feed The Ghost, composé de Mataï et Mik, ainsi que Fred et Aurélie. Vous allez énormément me manquer, tout comme ce pays dont je rêvais, qui a su m'accueillir et me faire rester.

Je remercie infiniment Audrey Claing pour m'avoir accueilli et fait confiance. J'espère que mon long séjour au laboratoire restera un excellent souvenir comme ça l'est pour moi. Audrey m'a pour ainsi dire tout appris de la science et j'espère lui avoir fait honneur en tant qu'étudiant et disciple.

Enfin, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de corriger cette thèse.

**Dédicace**

Je dédie cette thèse à mes parents et à mes filleuls. J'espère que ce travail vous rendra fier, parce qu'il est aussi le vôtre.

## **CHAPITRE I : INTRODUCTION.**

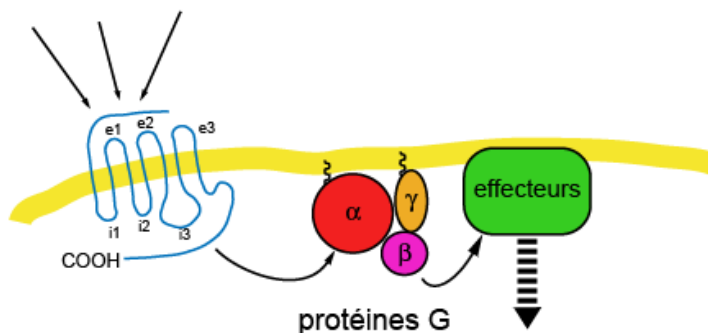
Les récepteurs membranaires sont les intermédiaires de stimuli extérieurs incarnés par des molécules les reconnaissant spécifiquement. Leur rôle est de transmettre une information à l'intérieur de la cellule. La liaison de la molécule à son récepteur induit un changement de conformation de ce dernier entraînant l'activation d'enzymes intracellulaires, comme des kinases et des GTPases, ou encore l'ouverture de canaux ioniques. Plusieurs stratégies moléculaires permettant de transmettre, à travers la membrane, les informations émanant de la liaison d'un agoniste sont apparues de manières évolutives. Ces diverses approches correspondent à différentes classes structurales de récepteurs, parmi lesquels se trouvent les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).

### **I.1 Les récepteurs couplés aux protéines G.**

Les RCPGs sont des protéines membranaires de 40kDa à 200kDa constituant la plus grande famille du génome humain, avec 2000 gènes identifiés jusqu'à maintenant (Fredriksson et al., 2003; Lander et al., 2001) et 799 protéines avérées (Gloriam et al., 2007). Les RCPGs représentent des cibles importantes dans la création de nouveaux médicaments par les compagnies pharmaceutiques (Klabunde and Hessler, 2002) étant donné qu'ils jouent des rôles physiologiques clés, et que plusieurs pathologies sont associées à des anomalies de leurs fonctions (Flower, 1999). Ces récepteurs sont les intermédiaires de l'effet de nombreux ligands comme les neurotransmetteurs, les chimio-attracteurs, les hormones, les cytokines et les stimuli sensitifs tels que les photons et les molécules odorantes (Fig. 1).



- lumière, calcium, phéromones, ...
- acides aminés, peptides, ...
- interleukines, chimiokines, ...



**Figure 1: Les RCPGs, leurs activateurs et leurs effecteurs.**

Les RCPGs sont composés de sept hélices transmembranaires (TM-I à VII) connectées par trois boucles intracellulaires (i1 à i3) et trois boucles extracellulaires (e1 à e3). Divers messagers stimulent ces récepteurs qui convergent néanmoins vers le recrutement et l'activation de protéines G hétérotrimériques.

### I.1.1 Les familles de RCPG : classification.

Les RCPGs sont répartis en six familles selon leur structure et le mode liaison de leurs ligands. Des éléments structuraux distinctifs qui caractérisent les trois principales familles (I, II et III) sont représentés sur la figure 2.

Les récepteurs de la famille I, aussi appelés «rhodopsin-like», s'avèrent appartenir à la plus grande famille. La première famille regroupe des récepteurs activés par des petits ligands, comme les catécholamines (sous-famille Ia). Les agonistes se fixent au niveau d'une poche formée par les troisième et sixième hélices transmembranaires. Dans le cas des récepteurs activés par la lumière, les rhodopsines, la cible des photons, le rétinol, est lié de façon covalente à cette cavité, et son changement de conformation induit par la lumière active le récepteur. Les récepteurs de la sous-famille Ib sont activés par des petits peptides qui interagissent avec leurs boucles extracellulaires et le domaine amino-terminal du récepteur. Cependant, la

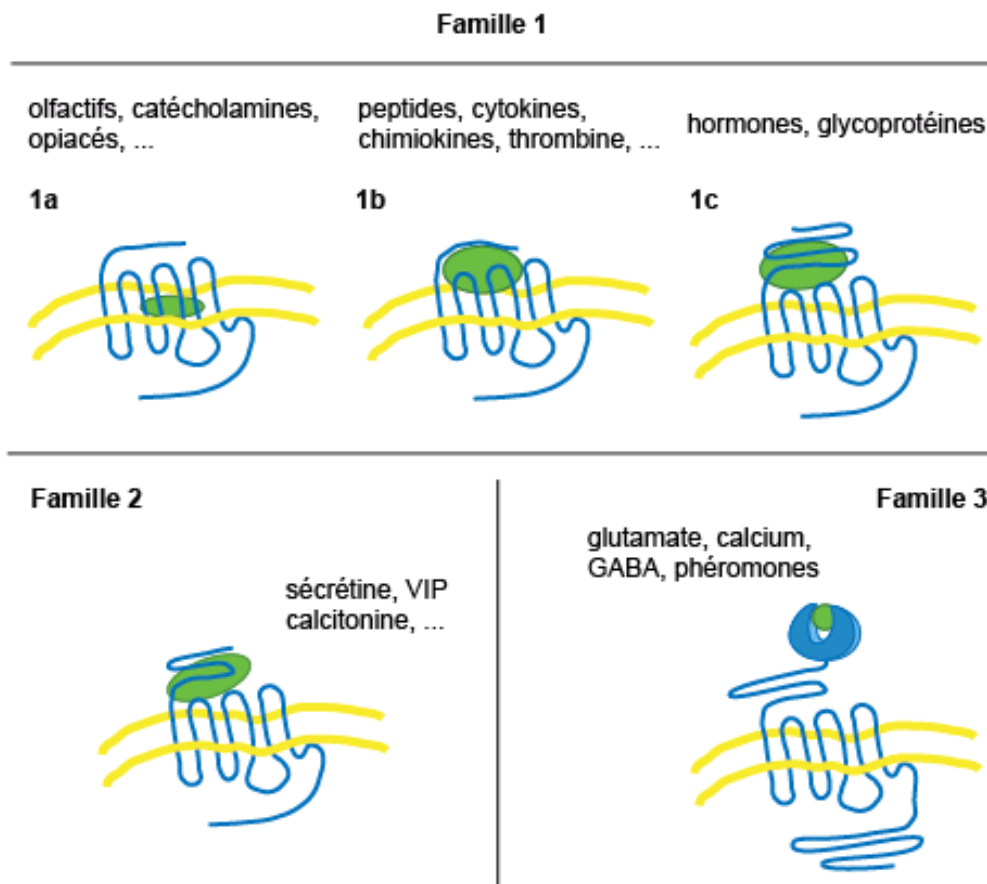
partie C-terminale de ces peptides est soupçonnée d'interagir également avec une cavité similaire à celle des récepteurs Ia (Trumpp-Kallmeyer et al., 1995).

Les récepteurs de classe II, aussi appelés «secretin-like», ont pour ligands des hormones et des neuropeptides et comptent environ vingt récepteurs (Fredriksson et al., 2003). La liaison de l'agoniste requiert aussi bien la partie amino-terminale que les boucles extracellulaires du récepteur, sans qu'une liaison avec les segments intracellulaires n'intervienne.

Chez les récepteurs de la famille III, aussi connus sous le nom de récepteurs métabotropiques du glutamate, la reconnaissance du ligand est assurée par leur très large domaine extra-cellulaire (300-600 résidus). Il est organisé en deux lobes distincts séparés d'une cavité, ce qui permet de capturer le ligand.

Enfin, la famille IV comprend les récepteurs aux phéromones (VNs) associés à  $G_i$  (Dulac and Axel, 1995). La famille V inclut les récepteurs «smoothened» et «frizzled» requis lors du développement embryonnaire et pour assurer la polarité et la segmentation cellulaire.

Depuis plusieurs décennies, beaucoup de laboratoires ont tenté de cristalliser les RCPGs, mais à ce jour, seulement trois l'ont été, à savoir, les récepteurs bovins de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000) et de l'opsine (Park et al., 2008) et la forme humaine du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique ( $\beta$ 2AR) (Rasmussen et al., 2007). L'établissement de la structure cristalline de la rhodopsine a néanmoins permis d'établir, selon des domaines d'homologie entre RCPGs, des prédictions sur les structures d'autres récepteurs. Mais la résolution du  $\beta$ 2AR a révélé des différences significatives entre les deux premiers récepteurs connus, remettant en cause l'utilisation d'un modèle commun à tous les RCPGs (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). La cristallisation de nouveaux récepteurs reste donc toujours un enjeu primordial afin de comprendre la manière par laquelle ceux-ci contrôlent leur signalisation.



**Figure 2: Les différentes classes de RCPGs.**

Les trois familles principales peuvent être facilement identifiées en comparant leur séquence en acides aminés. Les récepteurs de familles différentes n'ont pas de similitudes dans leur séquence mais présentent des structures similaires. La famille I contient la plupart des RCPGs dont les récepteurs olfactifs. Le groupe Ia contient les RCPGs à petits ligands comme les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et de la rhodopsine. Le site de liaison est situé dans les segments transmembranaires. Le groupe Ib contient les récepteurs pour les peptides dont le site de liaison inclut la partie amino-terminale, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des hélices. Le groupe Ic contient les récepteurs pour les glycoprotéines. Ils sont caractérisés pour leur large domaine extracellulaire et leur site de liaison qui y est principalement extracellulaire. La famille II a une morphologie similaire à celle des récepteurs du groupe Ic, mais ils ne partagent aucune homologie de séquence. Leurs ligands incluent les hormones de haut poids moléculaire comme le glucagon, la sécrétine et le VIP. La famille III contient notamment les récepteurs métabotropiques du glutamate et les récepteurs senseurs du  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **I.1.2 La signalisation des RCPGs via les protéines G.**

Les RCPGs ont été nommés ainsi en raison de leur capacité à s'associer à des protéines G hétérotrimériques ( $G\alpha\beta\gamma$ ). Suite à leur liaison aux récepteurs, les agonistes entraînent un changement de conformation de ces derniers et les activent afin d'induire des voies de signalisation qui leur sont associées. Cette transduction de signal s'opère via le recrutement de protéines G hétérotrimériques (Gether, 2000; Lu et al., 2002). Les RCPGs ont la possibilité de s'associer avec plusieurs de ces médiateurs, qui eux même, vont interagir avec une multitude de seconds messagers afin d'amplifier un signal né de la simple stimulation initiale d'un agoniste. Les premières études sur les protéines G ont établis que suite à l'échange de nucléotide (remplacement de GDP par du GTP), les sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  se séparent,  $G\alpha$  quitte le récepteur, tandis que  $G\beta\gamma$  restent étroitement associées (Neer and Clapham, 1988). Récemment, il a néanmoins été démontré que le récepteur serait constitutivement associé aux protéines G hétérotrimériques et que le changement de conformation de ce premier entraînerait l'ouverture du complexe formé de  $G\alpha\beta\gamma$  sans se dissocier (Gales et al., 2006). Ces sous-unités peuvent ensuite interagir avec leurs effecteurs afin de moduler leur activité, comme dans le cas de l'adénylate cyclase, des phospholipases, des MAP Kinases («Mitogen-activated protein kinase»), ou des canaux calciques et potassiques. La signalisation du récepteur est aussi modulée par des modifications entraînées par son activation. Parmi celles-ci, la phosphorylation par des kinases spécifiques ou non de RCPG module les interactions avec plusieurs protéines intracellulaires mises en cause dans l'internalisation et la désensibilisation. En effet, la phosphorylation empêche la liaison de protéines G hétérotrimériques au récepteur et favorise la liaison des arrestines (Kohout and Lefkowitz, 2003; Tsao et al., 2001). Le récepteur peut aussi promouvoir, parallèlement à sa signalisation directe, l'activation de récepteurs de facteur de croissance (Hur and Kim, 2002). Des mécanismes de régulation additionnels

entrent en jeu suite à l'action des protéines G sur des régulateurs du signal de ces protéines G (RGS) (Ishii and Kurachi, 2003).

#### I.1.2.1 La voie $G_s$ .

La voie  $G_s$  fut la première à être décrite et à mettre ainsi à jour les concepts de seconds messagers (Sutherland and Wosilait, 1955), de phosphorylation protéique (Krebs and Fischer, 1956) et de transduction signalétique (Rodbell et al., 1971; Ross and Gilman, 1977). Ses effets sur la cellule sont dus à l'activation de l'adénylate cyclase qui entraîne la production d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC) et la mise en jeu successive de la protéine kinase A (PKA). L'AMPC a aussi pour effet d'activer les facteurs d'échange de la GTPase Rap et, par conséquent, la voie des kinases activées par les facteurs mitogènes (MAPKs) (Bos et al., 2001).

#### I.1.2.2 La voie $G_{i/o}$ .

Cette voie a d'abord été identifiée comme inhibitrice de l'adénylate cyclase. Plusieurs hormones et autres neurotransmetteurs passent par cette protéine G. La signalisation qui en émane est bloquée par la toxine pertussique qui ADP-ribosyle la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha$ , empêchant la liaison de cette dernière au récepteur activé (Hsia et al., 1984). De son côté,  $G_{\beta\gamma}$  se lie directement à plusieurs effecteurs dont la phospholipase  $C\beta$  (Zhu and Birnbaumer, 1996), les canaux potassiques (Krapivinsky et al., 1998) ou encore la kinase de la phosphatidyl inositol 3-Kinase (PI3K) (Maier et al., 2000), et active indirectement la GTPase Ras et les MAPKs. De plus,  $G_i$  et  $G_o$  ont été impliquées dans la régulation du signal de l'oncogène Src, dans le cadre de l'activation du transducteur de signal et activateur de la transcription de type 3 (STAT3) (Corre et al., 1999).

### I.1.2.3 La voie $G_{q/11}$ .

La voie dépendante de  $G_q$  est classiquement activée par des hormones à mobilisation de calcium et stimule la phospholipase C- $\beta$  (PLC $\beta$ ) afin de produire de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 entraîne la relâche de calcium provenant du réticulum sarcoplasmique, et le DAG recrute et active, à la membrane plasmique, la protéine kinase C (PKC) (Berridge, 1993). Par l'intermédiaire de cette dernière enzyme,  $G_q$  active plusieurs isoformes de la phospholipase D (PLD) (Xie et al., 2002). Cette protéines G est aussi liée à l'activation de la PI3K, principalement via les sous-unités  $\beta\gamma$  associées, permettant le recrutement de la p110 $\gamma$ /p101 PI3K $\gamma$  (Brock et al., 2003). Néanmoins, une étude a révélé que la sous-unité  $\alpha_q$  se lie directement à p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$ , une forme de PI3K principalement activée par les récepteurs à activité tyrodine kinase, afin d'inhiber son activité (Ballou et al., 2006). Il semble aussi que cette protéine G régule l'activité du facteur nucléaire NF $\kappa$ B (Shi and Kehrl, 2001). Enfin, la signalisation de cette protéine G est liée à l'activation de RhoA, par liaison directe avec le facteur d'échange p63RhoGEF, se révélant être un effecteur de  $G_q$  (Lutz et al., 2007).

### I.1.2.4 La voie $G_{12/13}$ .

Cette voie, la moins étudiée, semble être impliquée dans la stimulation de la PLD, c-Src et de la PKC, avec pour but l'activation de plusieurs MAPKs telles les kinases du N-ter de c-Jun (JNK) ou la kinase régulée par signal extracellulaire de type5 (ERK5) (Fukuhara et al., 2000; Prasad et al., 1995). De plus, la voie  $G_{12/13}$  a récemment été étudiée quant à son rôle sur l'activation de la GTPase RhoA, impliquée dans la formation de fibres de stress d'acto-myosine et dans la migration cellulaire (Bian et al., 2006).

### I.1.3 Désensibilisation et internalisation.

L'une des plus remarquables caractéristiques des RCPGs est leur capacité à réguler leurs propres voies de signalisation par désensibilisation. En effet, suite à la stimulation soutenue par son agoniste, la récepteur change de conformation afin d'activer les protéines G hétérotrimériques et d'induire ainsi la signalisation qui lui est propre. Entrent alors en jeu les acteurs de la désensibilisation. La première étape se traduit par la phosphorylation de la troisième boucle intra-cellulaire (i3) ou de la queue C-ter du récepteur par une kinase spécifique au récepteur, soit PKA, PKC ou les kinases des RCPGs (GRK) (Hausdorff et al., 1990). Cette phosphorylation va entraîner le découplage fonctionnel de la protéine G hétérotrimérique au récepteur et abroger la signalisation qui en découlait (Benovic et al., 1985).

#### I.1.3.1 Les GRKs.

La famille des kinases des RCPGs est constituée, chez les mammifères, de sept Sérine/Thréonine protéines kinases nommées GRK1 à 7. Elles ont été classées en trois sous-groupes. Le premier (« GRK visuelles ») regroupe GRK1 (rhodopsin kinase) et -7 (cone opsin kinase) qui interviennent dans la régulation du signal photonique de la vue. Le deuxième sous-groupe (« GRK2 ») est constitué de GRK2 et -3 (ou  $\beta$  Adréno-récepteur kinase 1/  $\beta$ ARK1 et  $\beta$  Adréno-récepteur kinase 2/  $\beta$ ARK2) et est associé au contrôle des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. Le dernier sous-groupe (« GRK4 ») contient GRK4, -5 et -6. Les GRKs non visuelles diffèrent aussi selon leur localisation dans l'organisme, puisque si l'expression de GRK2, 3, 5 et 6 est ubiquitaire, celle de GRK4 se restreint aux testicules (Sallese et al., 1997), aux reins et à certaines parties du cerveau (Virlon et al., 1998). Enfin, ces kinases montrent une grande spécificité pour leurs récepteurs cibles (Kohout and Lefkowitz, 2003).

La structure de base des GRKs non visuelles est similaire, et l'on y retrouve un domaine catalytique central de 260 acides aminés. La partie N-ter est aussi une région de grande homologie et elle serait ainsi soupçonnée d'être responsable de la reconnaissance des récepteurs. Il est à noter que les GRKs non-visuelles possèdent aussi un domaine régulateur de la signalisation des protéines G (RGS) en N-ter, ce qui leur confère un rôle potentiel de désensibilisation signalétique indépendant de la phosphorylation du récepteur ciblé, comme il a été montré pour GRK2 et GRK3 (Carman et al., 1999; Dhimi et al., 2002; Sallese et al., 2000). GRK4 à 6 possèdent un site de liaison au phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) dont le rôle serait d'augmenter l'activité catalytique (Sallese et al., 2000). La partie C-ter de GRK2 et GRK3 est plus longue que celle retrouvée dans la sous-famille GRK4 et contient un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH). Ce motif permet la translocation des protéines du cytosol aux membranes suite à l'activation d'un RCPG. Quant à GRK4 et GRK6, leur recrutement membranaire est assuré par leur palmytoïlation post-traductionnelle sur des cystéines présentes en C-ter (Sallese et al., 2000). GRK5 ne comporte pas de modification lipidique mais lie le PIP<sub>2</sub> via un domaine en N-ter et une région polybasique en C-ter (Pronin et al., 1998). Enfin, la localisation membranaire de GRK1 et GRK7 est provoquée suite à leur farnésylation (Inglese et al., 1992).

Les GRKs demeurent à ce jour les kinases prédominantes lors de la désensibilisation des RCPGs. De plus, chaque isoforme a pu être impliquée vis-à-vis de récepteurs particuliers, et ceci grâce à la génération de souris transgénique pour les différentes GRKs. L'absence de GRK1 a montré que la réponse à la lumière du récepteur à la rhodopsine était grandement augmentée (Chen et al., 1999). L'étude des souris ne possédant qu'une seule copie du gène codant pour GRK2, étant donné que les animaux n'exprimant aucune allèle du gène GRK2 ne sont pas viables, démontre une augmentation de la contractilité cardiaque dépendante du  $\beta$ 2AR (Rockman et al., 1998). La



surexpression de GRK2 et GRK3 en cellules conduit à la surphosphorylation des  $\alpha$ 1AR et  $\beta$ AR (Benovic et al., 1991; Diviani et al., 1996). L'absence de GRK3, qui est fortement exprimée au niveau du système olfactif, conduit à l'abolition de la désensibilisation rapide entraînée par les substances odorantes (Peppel et al., 1997) et à l'augmentation de la signalisation cholinergique muscarinique (Walker et al., 1999). GRK4 est impliquée dans la désensibilisation du récepteur dopaminergique de type1 (D1R) (Felder et al., 2002), tandis que GRK5, à l'instar de GRK2, agit plus spécifiquement sur les  $\beta$ ARs (Rockman et al., 1996) et la signalisation cholinergique (Gainetdinov et al., 1999). Enfin, GRK6 est mise en jeu dans les réponses inhérentes au récepteur CXCR4 du facteur des cellules stromales (SDF-1) (Fong et al., 2002).

Dans certains cas, aussi bien les GRKs que les kinases dépendantes de seconds messagers peuvent phosphoryler le même récepteur (Ally et al., 2003; Castro et al., 2002; Hausdorff et al., 1989). Le  $\beta$ 2AR par exemple est phosphorylé en i3 par PKA et en C-ter par les GRKs (Seibold et al., 2000; Yuan et al., 1994). Ces phosphorylation sont indépendantes et semblent être motivées par la concentration d'agoniste appliquée au récepteur : une faible dose conduit au recrutement de PKA, tandis que l'augmentation de la concentration de la drogue entraîne la mise en jeu des GRKs (Tran et al., 2004; Vaughan et al., 2006). Le même phénomène a été répertorié dans le cas de la phosphorylation du récepteur aux chimiokines CCR5 et le recrutement de PKC ou GRK, suivant la quantité d'agoniste disponible à l'activation du RCPG (Pollok-Kopp et al., 2003). Cet aspect de la désensibilisation hyper régulée des récepteurs peut s'expliquer en partie par le fait que dans l'organisme, tous les tissus présentant un récepteur donné ne sont pas en contact avec les mêmes quantités d'agonistes. Le contrôle de la signalisation découlant de l'activation de ces RCPGs doit ainsi être appréhendé de manière adéquate (*i.e.* plus ou moins drastique) et spécifique au tissu cible (Arriza et al., 1992).

Une autre propriété notable des kinases dépendantes des seconds messagers est que celles-ci peuvent moduler la fonction des GRKs. Par exemple, PKC, en phosphorylant GRK2, conduit à son recrutement membranaire (Chuang et al., 1995; Krasel et al., 2001) et par la suite, PKA la phosphoryle à son tour pour permettre à la GRK de lier et désensibiliser le  $\beta$ 2AR (Cong et al., 2001; Li et al., 2006).

#### I.1.3.2 Les PKA et PKC.

La protéine kinase dépendante de l'adénosine mono-phosphate cyclique (PKA) est activée par l'AMPc générée par l'adénylate cyclase, suite à la stimulation d'un GPCR couplé à  $G_s$ . La PKA est une holoenzyme constituée de deux sous-unités catalytiques (C) et d'une sous-unité régulatrice dimérique (R). Il existe trois types de C différentes nommées  $C_\alpha$ ,  $C_\beta$  et  $C_\gamma$  qui ont les mêmes propriétés cinétiques et physiologiques (Taylor et al., 1990). À l'opposé, les sous-unités R (RI et RII) présentent des différences dans leur affinité à l'AMPc et leur localisation. Par exemple, les PKA de type I, constituées d'une RI $\alpha$  et d'une RI $\beta$ , se retrouvent au cytoplasme, tandis que les PKA de type 2, sont liées à des structures cellulaires et des organites. Cette propriété vient du fait de leur association à des protéines d'ancrage à kinase-A (AKAPs) (Scott, 1991).

La PKC, qui fait partie de la même famille ABC que PKA et PKB (Akt), compte au moins dix isoformes réparties en trois groupes suivant leur structure primaire (Newton, 2003). Ces protéines contiennent un domaine régulateur (C1, C2) en N-terminal et un domaine catalytique en C-terminal. La classification des différentes PKC se base ainsi sur la répartition et la présence de domaines C1 et C2. Chez les « PKCs conventionnelles » ( $\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$ ) on retrouve une répétition de domaines C1 riches en cystéine qui opèrent en tant que senseurs de diacylglycérol (DAG) et des domaines C2 liant le  $Ca^{2+}$ . Les « nouvelles PKCs » ( $\delta, \epsilon, \eta, \theta$ ) reprennent les mêmes domaines que les précédentes, à la différence

que C1 et C2 sont inversés, et que ce dernier ne lie pas le calcium. Enfin, les « PKCs atypiques » ( $\zeta, \iota/\lambda$ ) ne contiennent ni domaines C2 ni C1 typique. De plus, elles sont caractérisées par une absence de résidus Ser/Thr, conservés chez les autres sous-familles, qui jouent le rôle d'accepteur de phosphore en C-ter (Barnett et al., 2007). Dans le cas d'une stimulation d'un RCPG couplé à  $G_q$ , le  $Ca^{2+}$  libéré va lier le domaine C2 (dans le cas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta I$ , and  $\beta II$ ) et le domaine C1 va pouvoir interagir avec le DAG généré par la phospholipase C (Kelly et al., 2008).

Ces kinases dépendantes des seconds messagers ont longtemps été perçues comme les seules responsables de la désensibilisation des RCPGs (Benovic et al., 1985) pour ensuite être considérées de moindre importance en comparaison aux GRKs. Néanmoins, il a depuis été montré que ces enzymes jouaient un rôle important auprès de certains récepteurs tels le P2Y1 (Hardy et al., 2005) ou encore, le récepteur D3 à la dopamine (Cho et al., 2007). Il a aussi été montré que le récepteur métabotrope au glutamate de type 4 (mGluR4), couplé à  $G_{i/o}$ , ne se désensibilise ni n'internalise lorsqu'il est stimulé, mais peut accéder à ces mécanismes lorsque la PKC est activée (Mathiesen and Ramirez, 2006). Bien que la contribution de la phosphorylation des RCPG par ces kinases, quant à la création de sites de haute affinité pour les arrestines, n'ait jamais été rigoureusement démontrée, il est néanmoins connu que PKA et PKC ont la capacité de phosphoryler des récepteurs non-activés par leur agoniste. Ce cas de figure a été répertorié comme étant une « désensibilisation hétérologue » (Clark et al., 1988). Lorsque l'activation d'un récepteur couplé à  $G_s$  ou à  $G_q$  entraîne un rétrocontrôle négatif sur leur signalisation, via l'activation respective de PKA ou PKC, on parle de « désensibilisation homologue ».

La phosphorylation des RCPGs, à elle seule, est insuffisante à la désensibilisation adéquate de la signalisation des récepteurs. En effet, le recrutement des arrestines aux récepteurs afin de bloquer le couplage des

protéines G reste une condition primordiale à la terminaison de transductions signalétiques.

### I.1.3.3 Les arrestines.

On retrouve quatre arrestines différentes chez les mammifères : deux formes visuelles (v-arrestine / arrestine1 et c-arrestine / arrestine4, exprimées au niveau des cônes et bâtonnets), et deux formes ubiquitaires ( $\beta$ arrestine1/ arrestine2 et  $\beta$ arrestine2 / arrestine3). Ces protéines sont impliquées dans la désensibilisation des RCPGs, et dans le cas des arrestines visuelles, plus spécifiquement dans celle du récepteur à la rhodopsine. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement aux rôles des  $\beta$ arrestines ( $\beta$ arr). Ces dernières ont été découvertes après que l'on ait observé que l'ajout d'arrestines visuelles, dans un système comprenant des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques ( $\beta_2$ AR) résistants à la seule régulation négative via GRK2, pouvait rétablir la désensibilisation (Benovic et al., 1987). Ce résultat a permis d'envisager que d'autres arrestines existaient dans des tissus non associés à la vue, ce qui a été confirmé par le clonage de deux protéines homologues de l'arrestine visuelle et capable de désensibiliser le  $\beta_2$ AR (Attramadal et al., 1992; Lohse et al., 1990).

Les arrestines contiennent deux domaines, en parties N- et C- ter, séparés par une région de liaison de douze résidus. Les séquences en acides aminés des deux  $\beta$ arrs sont homologues à 78% et la plupart des différences entre les deux isoformes se retrouvent dans la partie C-terminal (Attramadal et al., 1992; Krupnick and Benovic, 1998). La génération de souris n'exprimant qu'une seule des deux  $\beta$ arrs a permis de constater que les phénotypes ainsi obtenus sont viables (Bohn et al., 1999; Conner et al., 1997), tandis que l'absence d'expression des deux isoformes est létale au stade embryonnaire (Kohout et al., 2001).

À l'état basal, les  $\beta$ arrs sont localisées dans le cytoplasme de la cellule, constitutivement phosphorylées. Dans le cas de la  $\beta$ arr1, elle est phosphorylée par les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) ERK1/2 à la sérine 412, et la  $\beta$ arr2 est le substrat de la caséine kinase II, la phosphorylant en thréonine 383 et en sérine 361. Suite à la stimulation d'un RCPG, les arrestines sont recrutées à ce dernier au niveau des sites de haute affinité créés à la boucle intracellulaire en C-ter du récepteur, suite à sa phosphorylation par des kinases spécifiques.

#### I.1.3.3.1 Localisation et recrutement des arrestines au récepteur.

Le fait que l'activation d'un RCPG, initialement le récepteur à la rhodopsine, et sa phosphorylation entraîne la liaison des arrestines visuelles a été établi avant même de connaître le rôle fonctionnel de ce phénomène (Kuhn, 1978; Kuhn et al., 1984). Le mécanisme moléculaire contrôlant l'interaction récepteur/arrestine a été élucidé par l'étude de la liaison entre la rhodopsine phosphorylée et l'arrestine visuelle (Gurevich and Benovic, 1993). Cette dernière interagit spécifiquement avec la forme activée et phosphorylée du récepteur (Fig. 4). Si ces conditions ne sont pas réunies, l'affinité entre les deux protéines reste faible. De plus, la quantité d'arrestines liées au récepteur activé et phosphorylé est plus grande que la somme des arrestines interagissant avec des rhodopsines activées ou phosphorylées, suggérant que l'association arrestine/récepteur est plus complexe qu'une simple liaison entre deux motifs compatibles. Des éléments de réponse ont ensuite été fournis afin d'expliquer ce phénomène. D'abord, l'arrestine1 semble opérer un changement de conformation, traduit par une haute énergie d'activation, afin d'interagir avec sa cible (Schleicher et al., 1989). Ensuite, la liaison de l'arrestine au récepteur, soit phosphorylé ou activé, est inhibée à de hautes concentrations salines, indiquant une mise en jeu d'interactions de type ionique. À l'inverse, dans le cas de la liaison au récepteur activé et phosphorylé, celle-ci est favorisée à des concentrations de 150-200mM de NaCl et reste stable à des niveau de salinité plus élevé, laissant penser que

dans ce cas, la liaison entre les deux protéines est de type hydrophobe (Gurevich and Benovic, 1993). Le modèle découlant de ces observations propose que l'arrestine possède deux sites « senseurs » : l'un sensible à l'activité, liant les motifs du récepteur changeant de conformation, et l'autre sensible aux phosphates nouvellement ajoutés (Gurevich and Benovic, 1993). Ces senseurs, ayant une faible affinité s'ils sont isolés.

Plusieurs éléments suggèrent aussi qu'à l'état basal, les arrestines voient leur capacité de liaison réprimée. À l'aide de mutants dont la partie C-ter de la protéine est déléetée, il est possible de diminuer l'affinité de l'arrestine pour la rhodopsine active et phosphorylée, au même niveau que celle ne réunissant que l'une des deux conditions (Gurevich and Benovic, 1992). Ce résultat indique que le C-ter de l'arrestine joue un rôle régulateur en l'empêchant de lier non spécifiquement les formes inadéquates de récepteur.

Le recrutement des arrestines peut être classifié en trois catégories différentes inhérentes au type de RCPG mis en cause. La classe A se compose des récepteurs liant les arrestines de manière rapide et transitoire. L'affinité des arrestines est donc relativement faible, se désolidarisant après la formation des cages de clathrine et permettant un recyclage rapide du récepteur à la membrane plasmique. On retrouve notamment le  $\beta$ 2AR, le récepteur  $\mu$ -opiacé et le récepteur de type A à l'endothéline. La classe B regroupe les récepteurs ayant une affinité plus élevée pour les arrestines ce qui se traduit par une interaction prolongée entre les deux protéines, restant associées jusque dans les endosomes tardifs et provoquant un recyclage ralenti du récepteur à la membrane. Cette classe se compose du récepteur à l'angiotensine II de type 1A ( $AT_{1A}R$ ), du récepteur de type 2 activé par les protéases (PAR2), du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R) ou encore du récepteur à la neurotensine (Oakley et al., 2000). La classe C est la moins documentée et est caractérisée par une liaison des arrestines jusqu'au trafic du récepteur aux endosomes tout en permettant un recyclage rapide de celui-ci. Cette classe compte le récepteur de type 2 à la bradykinine (B2R) et le récepteur de type 1 à la neurokinine (NK1) (Simaan et al., 2005).

De plus, les isoformes des  $\beta$ arrs n'ont pas toutes les mêmes propriétés vis-à-vis de l'arrêt de signalisation des RCPGs. En effet, il a été démontré que dans le cas du  $\beta$ 2AR,  $\beta$ arr2 est la forme prioritairement responsable de la désensibilisation (Kohout et al., 2001), tandis que dans le cas de PAR1, seule  $\beta$ arr1 est mise en cause (Paing et al., 2002). Un troisième cas de figure a aussi été documenté pour des récepteurs tels  $AT_{1A}R$ , NK1 ou le V2R pour lesquelles les deux isoformes sont aussi efficaces afin de médier l'internalisation (Oakley et al., 2000).

La génération de souris n'exprimant que l'une ou l'autre des isoformes des arrestines, la délétion des deux étant létale à l'état embryonnaire, a permis d'étudier l'effet de ces protéines dans divers systèmes de l'organisme. Par exemple, au niveau du système cardiaque, l'inhibition de l'expression de  $\beta$ arr1 entraîne une augmentation du volume d'éjection due à la diminution de la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Conner et al., 1997). Au niveau du système immunitaire, l'absence de  $\beta$ arr2 mène à une augmentation de la signalisation du récepteur CXCR4 dans les lymphocytes T, ce qui diminue leur capacité à migrer à travers les barrières endothéliales (Fong et al., 2002). Cette déplétion cause aussi l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires via un mécanisme dépendant du récepteur à l'interleukine 1 (Wang et al., 2006b). Au niveau du système respiratoire, les souris dont le gène  $\beta$ arr2 a été invalidé démontrent une diminution du recrutement des lymphocytes T et de la réponse inflammatoire aux voies aériennes, suite à une sensibilisation des souris aux allergènes dans un modèle d'asthme (Walker et al., 2003). Cette isoforme joue aussi un rôle dans le développement osseux et la régulation, dans ce cas, de la signalisation du récepteur à l'hormone parathyroïdienne (Ferrari et al., 2005). Au niveau cérébral, la  $\beta$ arr2 a été mise en cause dans la régulation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes. L'absence de la protéine conduit à une diminution de la nociception chez ces souris, qui serait corrélée avec le manque de désensibilisation des récepteurs aux opiacés (Bohn et al., 1999).

#### I.1.3.3.2 Arrestines et internalisation.

Suite à leur désensibilisation, les RCPGs sont délocalisés de la surface cellulaire via un mécanisme appelé internalisation. Cette séquestration ne semble pas être essentielle à la désensibilisation en tant que telle mais plutôt à la déphosphorylation et au recyclage (Lefkowitz et al., 1998) (Figure 4). Les mutations qui réduisent la phosphorylation du récepteur entraînent une diminution de la liaison des arrestines et de l'endocytose. Par exemple, le changement de tous les sites de phosphorylation des GRKs du  $\beta$ 2AR empêche la séquestration de celui-ci (Hausdorff et al., 1991). Cependant, la surexpression de GRK2 seule, ou associée à  $\beta$ arr contrecarre l'effet de la mutation du résidu tyrosine hautement conservé (Y326A) du  $\beta$ 2AR (Barak et al., 1994; Menard et al., 1996).

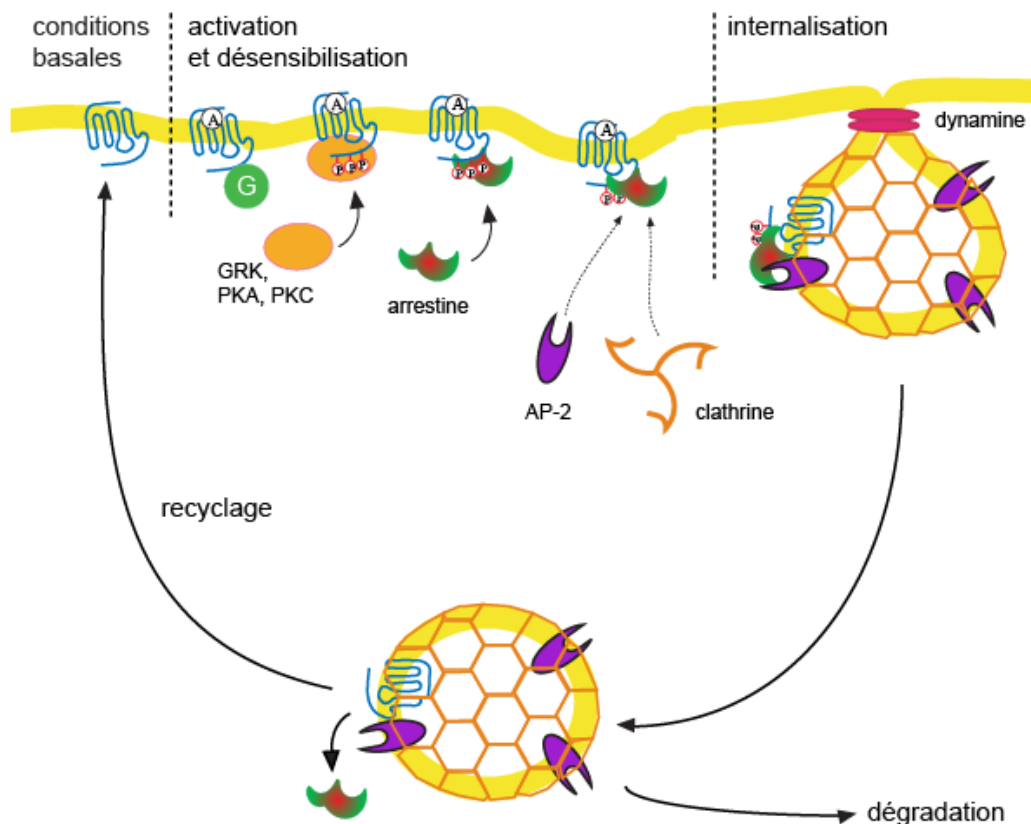
L'internalisation peut être médiée par plusieurs mécanismes dont les vésicules tapissées de clathrine, les caveolae ou encore les vésicules non-tapissées (Claing et al., 2002; Tsao et al., 2001). La voie ainsi empruntée dépend surtout de la nature du récepteur et du type cellulaire dans lequel il se trouve. En majorité, les RCPGs interagissent avec les  $\beta$ arrs pour être séquestrés à l'aide des vésicules tapissées de clathrine (Fig. 4). Cette idée fut supportée par l'observation que le  $\beta$ 2AR colocalise avec les puits de clathrine à la membrane plasmique et que l'expression d'un mutant des arrestines abolit l'internalisation du  $\beta$ 2AR (Ferguson et al., 1996; von Zastrow and Kobilka, 1992). Les arrestines interagissent directement et de manière stœchiométrique avec la chaîne lourde de la clathrine, au niveau des acides aminés 89-100 de la partie terminale de la protéine (Goodman et al., 1996). La région des arrestines impliquée dans cette interaction est un motif LXE/D qui se retrouve près du C-ter chez les isoformes non-visuelles (Goodman et al., 1997; Krupnick et al., 1997). Les  $\beta$ arrs interagissent aussi avec la sous-unité  $\beta$ 2 de l'adaptine (AP-2) qui est une protéine adaptatrice nécessaire à la formation des vésicules de clathrine (Laporte et al.,



2000; Laporte et al., 1999). La région de la  $\beta$ arr2 impliquée dans l'interaction avec AP2 est constituée de deux arginines (394 et 396) en aval de la région de liaison à la clathrine. La mutation de ces résidus n'affecte pas la liaison des arrestines au récepteur, mais empêche la localisation de ce complexe aux puits de clathrine. Les arrestines sont ainsi considérées comme les intermédiaires essentiels entre le récepteur et la machinerie endocytique.

À l'aide de mutagenèse dirigée, il a été possible de déterminer que la forme bovine de  $\beta$ arr2 lie les phosphoinositides aux résidus lysine<sup>233</sup>, arginine<sup>237</sup> et lysine<sup>251</sup> (Gaidarov et al., 1999). L'expression d'un arrestine mutée en ces résidus montre qu'elle est toujours capable d'interagir avec la clathrine et la rhodopsine mais qu'elle n'est plus en mesure d'être recrutée aux puits de clathrine et de médier l'internalisation du  $\beta$ 2AR.

Les arrestines sont aussi trouvées en complexe avec la NSF (protéine de fusion sensible au N-éthylmaleimide) qui est une ATPase mise en cause dans le trafic cellulaire (McDonald et al., 1999). La surexpression de cette protéine en cellule conduit à l'augmentation de l'internalisation du  $\beta$ 2AR. Le facteur d'ADP-ribosylation 6 (ARF6), que nous évoquerons plus tard, est aussi connu comme interagissant, dans sa forme inactive liée au GDP, avec les  $\beta$ arrs suite à la stimulation du  $\beta$ 2AR (Claing et al., 2001a). Il est aussi intéressant de remarquer que  $\beta$ arr2 est capable de se lier de manière constitutive au facteur d'échange ouvreuse du site de liaison au nucléotide des ARFs (ARNO), qui catalyse l'activation de ARF6. Une autre protéine activatrice de GTPase compte parmi les interacteurs des arrestines, soit Ral-GDS (stimulateur de la dissociation du GDP des Ral) qui entraîne l'activation de la petite protéine G. Suite à la stimulation du récepteur formyl-Met-Leu-Phe, le complexe composé de  $\beta$ arr et RalGDS est recruté à la membrane plasmique puis se dissocie pour permettre l'activation de Ral et le réarrangement du cytosquelette qui en découle (Bhattacharya et al., 2002).



**Figure 3: désensibilisation et internalisation des RCPGs.**

Suite à leur stimulation et leur activation, les RCPGs sont phosphorylés par les GRKs et les kinases des seconds messagers afin de créer des sites de haute affinité pour les arrestines. La liaison de ces dernières empêche le couplage des protéines G au récepteur et, de ce fait, inhibe sa signalisation. Les arrestines recrutent ensuite les composants essentiels de l'internalisation, AP-2 et clathrine, qui formeront, en combinaison à l'invagination de la membrane plasmique, des puits de clathrine. Une fois ces cages établies, la GTPase dynamine dissocie ces structures nouvellement formées du reste de la membrane. Selon le type de récepteur ainsi endocyté et l'ampleur de sa stimulation, il sera soit redirigé dans des endosomes, recyclé à la membrane ou dégradé au lysosome (Claing et al., 2002).

#### I.1.3.3.3 Ubiquitination des arrestines.

Les arrestines sont ubiquitinées suite à l'activation des GPCRs. Cette modification intervient suite à un processus enzymatique en trois étapes selon lequel une ubiquitine est ajoutée de manière covalente à des résidus lysine de la

protéine ciblée (Haas et al., 1982). Trois enzymes sont alors mises en jeu. Tout d'abord, E1 active un résidu glycine en C-ter de l'ubiquitine. Cette dernière va ensuite être transférée à une enzyme E2 de transport pour finalement lier, à l'aide d'une ligase E3, un groupement amine de la cystéine du substrat à modifier. Ce processus a été originalement interprété comme étant un signal de destruction, via le protéasome, de la protéine ubiquitinée. Cette modification semble pourtant être aussi impliquée dans le trafic et la signalisation (Welchman et al., 2005; Wojcikiewicz, 2004).

Il a été montré que la stimulation du  $\beta$ 2AR résulte en l'ubiquitination des arrestines, médiée par l'E3 ligase Mdm2 et que celle-ci est nécessaire à l'internalisation rapide du récepteur (Shenoy et al., 2001). Comme évoqué précédemment, la durée et l'affinité de l'interaction entre les  $\beta$ arrs et les GPCRs ont permis d'établir une classification des récepteurs. Il apparaît que ceux appartenant à la classe A, offrant une liaison rapide et de courte durée vis-à-vis des arrestines, entraînent une ubiquitination tout aussi courte de leur  $\beta$ arr associée. À l'inverse, les récepteurs de la classe B restant en complexe plus longtemps avec les arrestines, contribuent à l'ubiquitination soutenue de ces dernières (Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy and Lefkowitz, 2005). Il a aussi été montré que des arrestines mutantes constitutivement ubiquitinées changent le comportement de récepteurs de classe A, restant associés à la protéine mutée et trafiquant ainsi vers les endosomes, tels des récepteurs de classe B. Ces résultats démontrent que l'ubiquitination est impliquée lors de l'interaction entre les arrestines et le récepteur, et qu'en retour, cette association dicte le destin du récepteur devant être dégradé ou recyclé à la membrane.

Il est à noter que les  $\beta$ arrs peuvent être aussi impliquées dans l'ubiquitination des RCPGs eux-mêmes (Martin et al., 2003).

#### I.1.3.3.4 Les arrestines et l'activation des MAP Kinases.

La cascade des kinases activées par des facteurs mitogènes (MAPK) sont des voies incluant les MKKK (MAPK kinase kinase), les MKK (MAPK kinase) et les MAPK terminales. De plus, des protéines d'échafaudage contribuent à regrouper des composantes d'une cascade à des endroits spécifiques de la cellule (McKay and Morrison, 2007). La première MKKK caractérisée fut la kinase à cible sérine et thréonine, pro-oncogène, Raf-1 (Wellbrock et al., 2004). Raf-1, ainsi que A-Raf et B-Raf, interagit avec Ras sous forme active, menant à plusieurs modifications sur Raf-1 afin de l'activer (Muslin, 2005). Cette dernière va ensuite phosphoryler et activer MKK1 ou MKK2 (MEK1/2) qui fera de même avec la kinase régulée par signal extracellulaire de type 1 (ERK1) ou de type 2 (ERK2). Cette ultime étape influencera aussi bien l'activité des protéines du cytosol, ancrées aux membranes ou situées dans le noyau.

Il existe trois autres cascades majeures : les JNK, les p38 et ERK5 (Raman et al., 2007b). Ras, sous forme liée au GTP, peut activer indirectement les voies JNK et p38 par l'intermédiaire de la PI3K et de Rac1 (Nimnual et al., 1998). Les modes d'activation canoniques de JNK et p38 mettent en jeu des MKKKs telles MEKK1-4, la kinase de régulation du signal apoptotique (ASK1), la kinase activée par le facteur de transformation  $\beta$  (TAK1) et la kinase de lignage mêlé de type 3 (MLK3) (Davis, 1999; Zarubin and Han, 2005). Dans la cascade JNK, MKK4 et MKK7 sont les deux principales enzymes activatrices des protéines JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) et JNK3 (MAPK10) (Davis, 1999). Au sein de la cascade p38, deux enzymes sont responsable de l'activation de la MAPK : MEK3 et MEK6. Il existe quatre isoformes de p38 nommées  $\alpha$  (MAPK14),  $\beta$  (MAPK11),  $\gamma$  (MAPK12) et  $\delta$  (MAPK14) (Zarubin and Han, 2005). ERK5, aussi connue sous le nom de *big* MAPK (BMK), se distingue des autres MAPK de par sa taille. Elle est activée par MEK5, elle-même phosphorylée par MEKK2 et MEKK3 (Chao et al., 1999; Sun et al., 2001). La signalisation des MAPKs englobe aussi bien le contrôle de la croissance, de l'apoptose, du

développement, que de l'inflammation ou de la migration cellulaire (Raman et al., 2007b).

La première évidence du rôle des arrestines dans la signalisation cellulaire a été obtenue grâce à l'observation du fait que l'expression d'un dominant négatif de ces protéines bloquait l'activation des MAPKs dépendante de la stimulation du  $\beta$ 2AR (Daaka et al., 1998). Suite à l'activation de ce récepteur, il a été montré que la kinase src interagit avec les  $\beta$ arrs, conférant à ces dernières un rôle potentiel dans l'échafaudage de l'activation des MAPK (Luttrell et al., 1999). D'autres RCPGs ont été montrés comme étant liés aux arrestines dans le but d'activer diverses MAPK. Le récepteur à la neurokinine, suite à sa stimulation à la substance P, ne peut activer ERK1/2 lorsque le mutant précédemment utilisé des arrestines est exprimé (DeFea et al., 2000a). Dans le cas de PAR-2, il apparaît que deux populations différentes de ERK1/2 peuvent être activées soit au cytosol de manière dépendante des arrestines et PKC, soit au noyau, sous l'égide de Ras (DeFea et al., 2000b; Ge et al., 2004). Les récepteurs V2,  $AT_{1A}$  et de l'hormone relâchant la gonadotropine chez le xénope (X-GnRHR) ont aussi été montrés comme nécessitant les arrestines pour l'activation des ERKs (Caunt et al., 2006; Scott et al., 2006; Tohgo et al., 2003; Tohgo et al., 2002). L'étude du récepteur CXCR4 montre que les activations de p38 et de ERK1/2 sont dépendantes de la  $\beta$ arr2 (Sun et al., 2002), ce qui a aussi été démontré, dans le cas de ERK, suite à la stimulation du récepteur aux chimiokine de type 7 à motif C-C (CCR7) (Kohout et al., 2004). Ces études introduisent le concept que les arrestines sont des protéines d'échafaudage nécessaires à l'activation localisée des MAPK qui est essentielle à la distinction entre voie canonique des ERKs, associée à la prolifération cellulaire, et voie dépendante des arrestines, qui semble être reliée à d'autres événements telle la migration cellulaire.

L'étude de l'apport spécifique de l'une des deux isoformes des  $\beta$ arrs par rapport à l'autre quant à l'activation des ERKs permet de différencier deux modes d'action différents. En effet, la stimulation des ERKs via l' $AT_{1A}R$ , ou le V2R, et les

arrestines, montre que  $\beta$ arr2 est activatrice des MAPKs alors que  $\beta$ arr1 est inhibitrice (Ahn et al., 2004; Ren et al., 2005). Ce cas de figure est appelé régulation « réciproque ». La deuxième situation qui peut être rencontrée se traduit par un potentiel activateur de la part des deux  $\beta$ arrs. On appelle cette régulation « codépendante » et elle est mise en jeu suite à la stimulation du  $\beta$ 2AR ou du récepteur de type 1 à l'hormone parathyroïdienne (Gesty-Palmer et al., 2006; Shenoy et al., 2006).

Les arrestines sont aussi liées à d'autres MAPKs que les ERKs. Il a été montré que la  $\beta$ arr2 se retrouve dans le même complexe que la kinase c-jun N-ter de type 3 (JNK3) et sa protéine activatrice, la kinase de type 1 activant le signal apoptotique (ASK1) (McDonald et al., 2000). Peu après cette même arrestine a été impliquée dans la formation d'un complexe comprenant MEK1, ERK2 et c-Raf1 qui serait influencé par la stimulation de l' $AT_{1A}R$  (Luttrell et al., 2001).

#### I.1.3.3.5 Les autres voies de signalisation dépendantes des arrestines.

La stimulation du récepteur D2 à la dopamine entraîne la formation d'un complexe composé de  $\beta$ arr2, de la phosphatase 2A (PP2A) et d'Akt (PKB), qui, s'il est inhibé, réduit les comportements associés à la dopamine chez la souris, comme la locomotion (Beaulieu et al., 2005). Nous avons mentionné plus tôt que les arrestines jouaient un rôle dans l'activation de Ral, via l'interaction avec RalGDS (Bhattacharya et al., 2002). Une autre GTPase, RhoA, est régulée par  $\beta$ arr1 et  $G_q$  parallèlement suite à la stimulation de l' $AT_{1A}R$ , afin de contrôler la formation de fibres de stress (Barnes et al., 2005a). Toujours dans le contexte du remodelage du cytosquelette d'actine, les arrestines sont associées à la cofiline, la chronifine et la LIM Kinase dans les protrusions membranaires (Zoudilova et al., 2007). Sous l'égide de PAR-2,  $\beta$ arr active la cofiline qui dépolymérise les filaments d'actine aux extrémités (-) ou « pointées ».

Le recrutement et la signalisation des arrestines peut aussi antagoniser certaines voies activées par les protéines G. Suite à la stimulation de PAR-2, PI3K est activée selon un mécanisme dépendant de  $G_q$  et du calcium intracellulaire. L'augmentation du niveau d'expression de  $\beta$ arr inhibe cette activation (Wang and DeFea, 2006; Wang et al., 2007). De même, l'activation de NF $\kappa$ B par le  $\beta$ 2AR est contrée par l'action de la  $\beta$ arr2. Pour pouvoir être activée, NF $\kappa$ B doit se dissocier d'I $\kappa$ B suite à divers stimuli. Suite à la stimulation du  $\beta$ 2AR,  $\beta$ arr2 interagit avec I $\kappa$ B qui ne peut donc pas être phosphorylée et dégradée pour permettre l'activation de NF $\kappa$ B (Gao et al., 2004) (Chandrasekar et al., 2004; Parameswaran et al., 2006). La balance du niveau d'expression des arrestines reflète encore une fois le contrôle pluripotent de ces protéines.

#### I.1.4 L'angiotensine II.

##### I.1.4.1 Le système rénine-angiotensine.

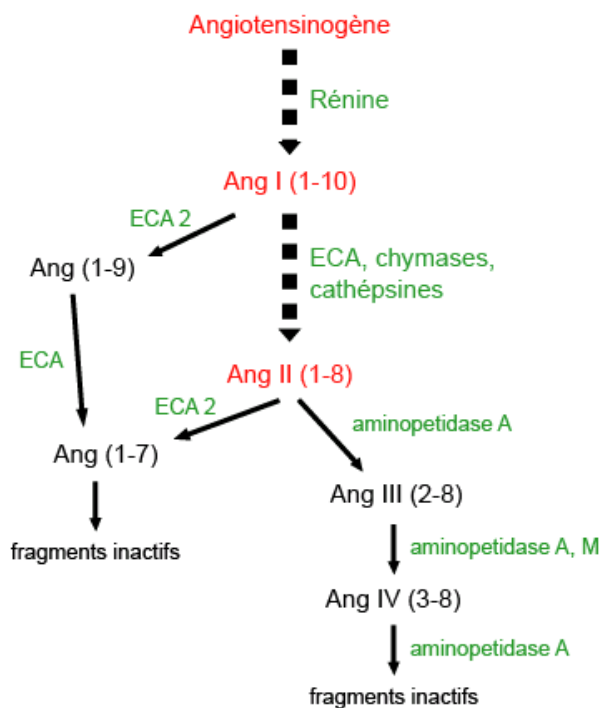
Le système rénine-angiotensine (SRA) est composé de trois éléments circulants dont la rénine, sécrétée par le rein, l'angiotensinogène, produite par le foie et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), fournie par le poumon. Le SRA permet de produire l'angiotensine II (Ang II), qui est le composé actif de ce système (**Fig. 4**). Les éléments du SRA peuvent aussi se retrouver au niveau de tissus tels le cerveau, les reins, le cœur et les vaisseaux (Dzau et al., 2002).

##### I.1.4.2 Les rôles de l'angiotensine II.

L'Ang II est connue pour son rôle dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée, la fonction rénale et la pression artérielle. Suite à une chute de pression sanguine, la génération d'Ang II, qui est un peptide vasoconstricteur, entraîne une augmentation des résistances périphériques et de la réabsorption du sodium directement et par l'intermédiaire de l'aldostérone. En effet, elle en

stimule la sécrétion par le cortex surrénalien, restaurant ainsi une pression artérielle acceptable. L'Ang II provoque aussi une vasoconstriction par stimulation centrale du système sympathique et libération de noradrénaline, ce qui renforce encore l'effet immédiat sur les artérioles.

Il a aussi été montré que l'Ang II stimule l'expression de molécules d'adhésion chez les leucocytes, la production de cytokines inflammatoires et augmente le stress oxydatif. L'Ang II agit aussi comme facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires induisant leur hyperplasie et elle peut jouer un rôle dans la néoangiogenèse (Schmieder et al., 2007).



**Figure 4: Le système rénine-angiotensine.**

Cette voie métabolique permet la production des différentes hormones agissant notamment sur les récepteurs à l'angiotensine. L'angiotensinogène est d'abord dégradé par la rénine en angiotensine I (AngI), qui est par la suite transformée en angiotensine II (AngII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). D'autres enzymes, représentées en vert, sont responsables de la génération de formes alternatives de l'angiotensine.



#### I.1.4.3 Les récepteurs de l'angiotensine.

Chez les mammifères, l'Ang II médie ses effets par au moins deux récepteurs à haute affinité de la membrane plasmique, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Mukoyama et al., 1993; Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). De plus, deux sous-types du récepteur AT<sub>1</sub>, AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>, ont été décrits chez le rat et la souris, ayant plus de 95% d'homologie de séquence nucléique (Iwai and Inagami, 1992). Deux autres récepteurs à l'Angiotensine II (Ang II) ont été décrits, à savoir, les sous types AT<sub>3</sub> et AT<sub>4</sub> (Chaki and Inagami, 1992; Iwai and Inagami, 1992; Swanson et al., 1992). Cependant, la pharmacologie de ces récepteurs n'a pas encore été entièrement caractérisée et les sous types AT<sub>3</sub> et AT<sub>4</sub> ne sont donc pas inclus dans la classification définitive des récepteurs AT, telle que définie par l'Union Internationale du sous comité à la nomenclature des récepteurs à l'Angiotensine (de Gasparo et al., 1995).

#### I.1.4.4 La signalisation de l'angiotensine II.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux mécanismes moléculaires activés afin de promouvoir la migration de différents types cellulaires. Des études précédentes ont démontré que la stimulation à l'Ang II pouvait entraîner l'activation de petites protéines G importantes pour le remodelage du cyosquelette d'actine (Barnes et al., 2005a). Comme mentionné précédemment, nous nous sommes intéressés aux effets du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>R) sur la migration. Le récepteur AT<sub>1</sub>, un récepteur à sept passages transmembranaires de classe Ia, est l'intermédiaire de la plupart des fonctions physiologiques connues de l'Ang II dont la sécrétion d'aldostérone, la vasoconstriction et la chimiotaxie (de Gasparo et al., 2000; Sadoshima, 1998; Touyz and Schiffrin, 2000). En plus de ses effets dans les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'hypertrophie du ventricule gauche et la resténose (Phillips and Kagiyama, 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2000), l'Ang II peut entraîner un processus inflammatoire (Suzuki et al., 2003).

Par exemple, l'Ang II contribue au recrutement des cellules inflammatoires dans les tissus via la régulation de molécules d'adhésion et de chimiokines, et par l'activation directe de la chimiotaxie (Phillips and Kagiyama, 2002; Riaz et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2000) dans différents types cellulaires dont les monocytes (Ahn et al., 2004), les cellules musculaires vasculaires lisses (Meloche et al., 2000), les fibroblastes cardiaques néonataux (Graf et al., 2000), les péricytes rétinaux (Nadal et al., 2002), les cellules T (Weinstock et al., 1987) et les neutrophiles (Elferink and de Koster, 1997). La signalisation inhérente à l'AT<sub>1</sub>R est généralement dépendante de protéines G hétérotrimériques et est reconnue pour être principalement associé à G<sub>αq/11</sub> et parfois à G<sub>αi</sub> et G<sub>αo</sub> (Berk, 2001; de Gasparo et al., 2000; Touyz and Schiffrin, 2000). Elle est très rapide, notamment en contexte de contraction vasculaire, et emprunte différentes voies. La transmission immédiate du signal inclue différents processus, comme l'activation de la phospholipase C qui mène à l'hydrolyse le l'inositol triphosphate (IP3) et à l'accumulation de diacylglycérol (DAG), l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre, l'activation de la protéine Kinase Cβ, l'alcalinisation du milieu intracellulaire due à la stimulation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, le changement des concentrations intracellulaires de Na<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, et l'activation des protéines kinases de la famille de Src (Touyz and Schiffrin, 2000).

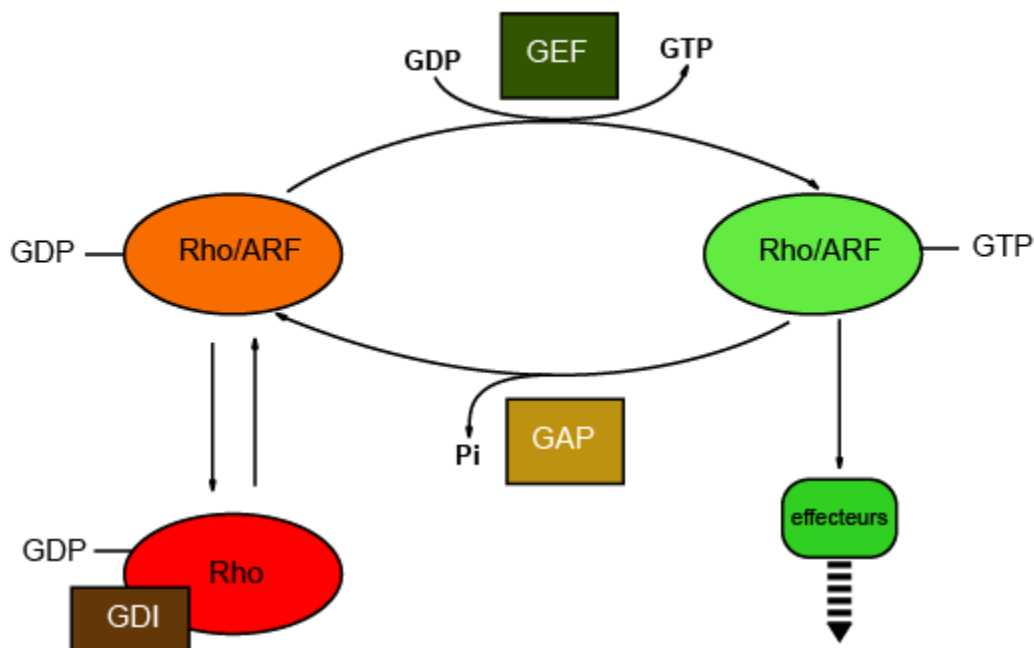
## **I.2 Les GTPases monomériques.**

Les GTPases de la superfamille Ras sont connues pour leur rôle dans la régulation d'un grand nombre d'évènements cellulaires tels la prolifération, la différenciation, la migration, la maturation, l'apoptose ou encore le réarrangement du cytosquelette (Jaffe and Hall, 2005). Ces protéines ont été regroupées en cinq classes, selon leur séquence en acides aminés et leurs fonctions biologiques. On retrouve ainsi les Ras, les Rho, les Rab, les Ran et les ARF. Néanmoins, certaines protéines ainsi identifiées par homologie de séquence n'ont pas encore été étudiées et leur regroupement au sein des familles demeure arbitraire.

Ces protéines ont pour particularité d'osciller entre deux formes : l'une inactive liée au GDP et une autre active, liée au GTP. Le transit entre les deux états d'activation peut être catalysé par des facteurs d'échange, pour lesquels nous accorderons une plus grande attention dans une section ultérieure. Rapidement, les protéines responsables de l'activation sont les facteurs d'échange de guanine (GEFs) qui intervertissent le GDP lié de la protéine G pour du GTP. L'inactivation est prise en charge par les protéines régulatrices de l'activité GTPasique (GAPs) qui vont entraîner l'augmentation de l'hydrolyse du GTP en GDP, qui est la capacité intrinsèque de la GTPase. Il existe une troisième catégorie de protéines régulatrices, appelées inhibitrices de la dissociation de la guanine (GDI), qui semblent bloquer l'activation spontanée des protéines G (Olofsson, 1999). Il est à noter que les Rnd et RhoH n'ont pas d'activité GTPasique intrinsèque détectable ce qui les distingue du reste des membres de la famille des Rho (Figure 5).

Ces GTPases peuvent aussi être phosphorylées (Loirand et al., 2006) et ubiquitinées (Visvikis et al., 2008; Wang et al., 2006a; Wilkins and Carpenter, 2008). Ces protéines comportent aussi des modifications lipidiques permettant leur localisation à diverses membranes. Les Ras sont farnésylées et/ou palmitoïlées, tandis que les Rho et Rab sont géranyl-géranylées (Wennerberg et al., 2005). Certaines ARFs sont myristoïlées (D'Souza-Schorey and Stahl, 1995), tandis que les Ran n'ont pas de modification lipidique et ne requiert pas d'être recrutées aux membranes (Wennerberg et al., 2005).

C'est à travers leur forme active que les GTPases sont capable de relayer la transduction d'un signal émanant d'un stimulus externe. Elles peuvent ainsi interagir avec différents effecteurs incluant des protéines d'échafaudage, des kinases à cibles lipidiques, sérines/thréonines ou encore, tyrosines (Bishop and Hall, 2000).



**Figure 5: Le mécanisme de régulation des GTPases monomériques.**

Les petites protéines G se retrouvent sous deux formes: une activée, liée au GTP, et une autre, inactive, liée au GDP. La transition entre ces deux états s'effectue à l'aide, dans le cas de l'inactivation, de GAPs, stimulant l'activité GTPasique intrinsèque des protéines et menant à l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GEFs sont en charge de réguler l'échange de GDP pour du GTP et d'ainsi activer les GTPases qui pourront alors interagir avec leurs effecteurs. Dans le cas des protéines Rho, une autre entité régulatrice, la GDI, peut séquestrer la petite protéine G sous forme inactive.

### I.2.1 Les Rho GTPases.

Les GTPases de la famille de Rho appartiennent à la superfamille des Ras. On dénombre vingt-deux membres dont trois isoformes RhoA, B et C, trois isoformes Rac1, 2 et 3, trois isoformes Rnd1, 2 et 3(RhoE), Miro-1 et 2, Cdc42, RhoD, RhoG, TC10, TCL, RhoH (TTF), Chp Wrch-1, Rif, RhoBTB1 et 2 (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

### I.2.1.1 Rac1.

Dans cette sous-famille, on compte Rac1, 2 et 3 partageant 88% d'homologie et divergeant au niveau de leur C-ter. Un homologue de Rac1, Rac1b, résultant d'un épissage alternatif, diffère dans sa région *switch II* et est principalement exprimé dans les cancers du colon et du sein (Jordan et al., 1999; Matos et al., 2003). Rac1b est constitutivement suractivée du fait de l'augmentation intrinsèque de l'échange de GTP et de son activité GTPasique réduite (Fiegen et al., 2004). Elle est aussi incapable de s'associer à un quelconque GDI ce qui a pour résultat d'accroître sa liaison à la membrane plasmique (Matos et al., 2003). Rac1b se comporte ainsi telle une Rac1 suractivée mais ne semble pas intervenir dans les mêmes voies de signalisation que son homologue. Il a de plus été observé que cette version « mutante » possède une affinité moindre pour l'effecteur de choix de Rac1, la sérine/thréonine kinase activée par p21, PAK (Fiegen et al., 2004; Matos et al., 2003).

L'expression de Rac1 est ubiquitaire, tandis que celle de Rac2 se cantonne aux cellules hématopoïétiques. Les souris dont le gène de Rac1 a été invalidé meurent à l'état embryonnaire (Sugihara et al., 1998). Rac3 se retrouve habituellement dans le cerveau (Haataja et al., 1997) mais est suractivée dans certains cancers du sein (Mira et al., 2000). Il est à noter que l'invalidation du gène Rac1 chez la souris est létal à l'état embryonnaire dû au fait que les couches de cellules germinales ne peuvent adhérer, et que la migration cellulaire nécessaire à la gastrulation et à l'organogénèse est inhibée (Sugihara et al., 1998).

Les Rac comportent deux domaines *switch* nécessaires à leur activation (Jezyk et al., 2006; Worthylake et al., 2000) et sont géranyl-géranyllées au niveau de leur motif CAAX, afin de promouvoir leur recrutement à la membrane (Wennerberg et al., 2005).

#### I.2.1.1.1 Rac1 et le réarrangement du cytosquelette.

Les Rac sont connues pour leur rôle dans la formation des lamellipodes et des ondulations de membrane, qui serait attribuable à leur interaction avec un complexe multiprotéique contrôlant la polymérisation de l'actine (Fig. 6) (Eden et al., 2002). Le mutant dominant négatif de Rac1 inhibe ce réarrangement de cytosquelette dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales, les fibroblastes, les lymphocytes T ou encore les macrophages (Ridley, 2001). Les Rac contrôlent la polymérisation de l'actine suivant différents modes opératoires. Tout d'abord, elles peuvent activer le complexe Arp2/3 via les protéines de la famille WASP, homologues de la verproline (WAVE) et les formines mDia (Jaffe and Hall, 2005). Les Rac peuvent aussi jouer un rôle sur la disponibilité de monomère d'actine nécessaire à l'élongation des filaments.

Au niveau neuronal, les Rac sont à l'origine de la croissance des dendrites, et à une moindre mesure de la croissance axonale. Rac1 serait plus particulièrement impliquée lors du guidage axonal, qui est le prolongement orienté de l'axone (Chen et al., 2007a).

L'un des événements importants dans l'initiation de la migration cellulaire est le contrôle de l'adhésion intercellulaire entre la matrice et la cellule. L'utilisation d'un dominant négatif de Rac a permis de montrer que son expression inhibe l'adhésion des lymphocytes T aux intégrines suite à la stimulation de la cellule par des chimiokines (Garcia-Bernal et al., 2005). Il a aussi été montré que Rac1 entraîne la perte des jonctions d'adhérence, contribuant ainsi à l'acquisition d'un phénotype migratoire (Mertens et al., 2005; Sander et al., 1998). Comme mentionné auparavant, Rac contrôle la formation de lamellipodes mais contribue aussi à l'invasion en régulant la production de métalloprotéases (Lozano et al., 2003). Rac est mise en cause dans d'autres phénomènes liés au réarrangement du cytosquelette, comme la phagocytose d'antigènes et de corps apoptotiques (Erwig and Henson, 2008; Underhill and Ozinsky, 2002), ou

au contrôle d'activité enzymatique, comme celle de la NADPH oxydase afin de détruire les corps phagocytés par génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Dinauer, 2003).

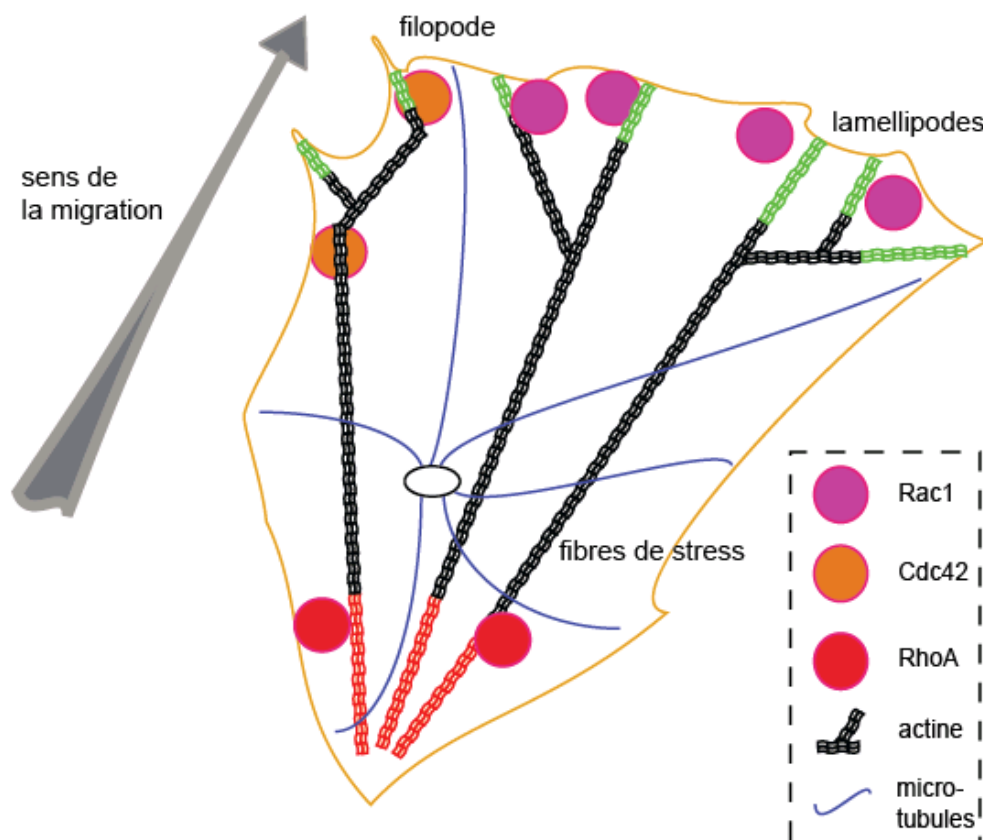
#### I.2.1.1.2 Rac1 et le contrôle de la NADPH oxydase.

La gamme de stimuli induisant la production de ROS inclut les facteurs de croissance, l'inflammation, les intégrines et le stress mécanique (Sundaresan et al., 1996). La plupart de ces ROS sont supposées être dérivées des diverses NADPH oxydases (NOXs) (Tojo et al., 2005). Rac est mise en cause dans la production de ROS suite à la stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGF) et dérivés des plaquettes (PDGF) ainsi qu'au facteur de nécrose tumorale de type  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) et à l'interleukine 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) dans les fibroblastes (Sundaresan et al., 1996). Dans les cellules HeLa, la production de ROS dépendante de Rac1 et IL1- $\beta$  contribue à activer le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et la signalisation qui en découle (Sulciner et al., 1996). Dans les cellules endothéliales, il a été montré que le stress mécanique induit l'activation de ERK de manière dépendante de Rac et des ROS (Yeh et al., 1999). Le mécanisme d'activation des NOXs met en jeu des sous-unités régulatrices, dans le cas par exemple de NOX2, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> qui doivent être phosphorylées, et Rac, sous forme activée (Heyworth et al., 1991; Levy et al., 1990). Rac va recruter p67<sup>phox</sup> qui va pouvoir interagir avec p47<sup>phox</sup> et la partie cytochrome du complexe NOX2 pour l'activer (Dang et al., 2002).

#### I.2.1.1.3 Rac1 et cancer.

Rac1 est retrouvée sous forme mutée dans certaines tumeurs, se traduisant par des modifications au niveau de son domaine effecteur lui conférant des propriétés qui rappellent la suractivation (Hwang et al., 2004). Peu de données

existent sur le rôle de Rac1 dans la progression tumorale *in vivo*. Dans un modèle de cancer du poumon chez la souris, Rac1 semble nécessaire à la tumorigénécité reliée à la signalisation de K-Ras (Kissil et al., 2007). En utilisant une approche différente, *i.e.* en bloquant l'expression de la GEF de Rac, Tiam1, il a été possible de constater que dans un modèle de cancer de la peau lié à Ras, les souris développent moins de tumeurs (Malliri et al., 2002).



**Figure 6: Les principaux rôles des Rho GTPases lors de la migration cellulaire.**

Les Rho GTPases ont des rôles et des localisation bien spécifiques dans la cellule afin d'orchestrer la migration cellulaire. Rac1 sous forme active se situe au front de migration de la cellule afin de contrôler les ondulations de membranes. Cdc42, située à l'avant et sur les cotés, induit la formation des filopodes. RhoA est la seule à se situer majoritaire au niveau de la queue de la cellule. Elle contrôle, en partenariat avec la myosine, la rétraction de la portion arrière du cytosquelette.



### I.2.1.2 Cdc42.

Cdc42 contrôle la formation des filopodes (Fig. 6), via son association avec les protéines du syndrome de Wiscott-Aldrich (WASP) (Machesky and Insall, 1998; Miki et al., 1998). Il existe deux isoformes de Cdc42 qui proviennent de l'épissage de l'exon d'un même gène et diffèrent en C-ter (Marks and Kwiatkowski, 1996; Nicole et al., 1999). La forme la plus étudiée, Cdc42a, est exprimée de manière ubiquitaire tandis que la localisation de Cdc42b est restreinte au cerveau. Ces GTPases sont post-traductionnellement géranyl-géranyllées. L'expression de Cdc42 est augmentée dans certains cancer du sein (Fritz et al., 1999) et la diminution de celle-ci accroît le développement de cancer du foie (van Hengel et al., 2008), suggérant que le rôle de Cdc42 peut être spécifique au tissu étudié. *In vitro*, Cdc42 stimule la transformation cellulaire reliée à l'activation de Ras, et ce phénomène a été associé à un rôle potentiel dans le trafic et la dégradation du récepteur à l'EGF (Wu et al., 2003). Parmi toutes les Rho, seule Cdc42 affecte la ségrégation des chromosomes lors de la mitose, ce qui résulte en la formation de cellules polynucléées (Yasuda et al., 2006). Elle est aussi impliquée dans la polarisation cellulaire via le complexe polarisant Par3/Par6/aPKC, qui contrôle ensuite l'activité de Rac1 via Tiam1 (Braga and Yap, 2005).

### I.2.2.3 RhoA.

RhoA, ainsi que RhoB et RhoC, sont impliquées dans la formation des fibres de stress lorsqu'elles sont surexprimées en cellules (Fig. 6) (Wheeler and Ridley, 2004). La fonction de Rho dans les réponses cellulaires a longtemps été étudiée à l'aide de de la C3 transférase, qui est une enzyme clostridiale inhibant les Rho en les modifiant. Étonnamment, il n'existe pas d'étude de souris dont le gène encodant pour RhoA a été invalidé, alors que les mutants pour RhoB et C sont disponibles (Hakem et al., 2005; Liu et al., 2001). Ces derniers sont viables

et l'étude au niveau cellulaire montre que les Rho sont impliquées lors du trafic vésiculaire et du développement de cancers.

RhoA est mise en jeu dans la plupart des étapes menant au cancer. Elle serait impliquée lors de la prolifération des cellules tumorales et leur survie. Dans des cellules épithéliales normales, RhoA contribue à la polarité et à la jonction cellulaire (Braga and Yap, 2005) mais affecte aussi la disruption lors de la progression des tumeurs. Comme mentionné plus haut, RhoA est essentielle dans la migration cellulaire. La signalisation induite via l'un de ses effecteurs, la kinase ROCK, contribue à la contractilité reliée à l'actomyosine entraînant la rétraction de l'arrière d'une cellule (Friedl and Wolf, 2003). De plus, RhoA contrôle la production de métalloprotéases qui sont impliquées lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, nécessaire à l'invasion de la cellule en mouvement (Lozano et al., 2003).

### 1.2.2 ARF6.

La famille des facteurs de ribosylation de l'ADP (ARF) appartient à la superfamille des Ras. Ces ARFs sont ubiquitaires et ont d'abord été identifiées selon leur rôle de cofacteur dans l'ADP-ribosylation de G $\alpha$ s induite par la toxine cholérique (Kahn and Gilman, 1986). Comme les Rho, ces protéines se retrouvent sous deux formes, active ou inactive, et sont régies par des protéines régulatrices GEFs et GAPs au même titre que les Rho, sans toutefois être influencées par les GDI. Les ARFs sont en général post-traductionnellement myristoilées afin de pouvoir être recrutées à différentes membranes de la cellule (Amor et al., 1994). Les ARFs, qui comptent six isoformes, sont classées dans trois groupes en fonction de leur séquence en acides aminés (Kahn et al., 2006). On retrouve dans la classe I, ARF1, 2 et 3, partageant 96% d'homologie et qui sont surtout connues pour l'activation d'enzymes à cibles lipidiques, et la régulation de l'assemblage de complexes mis en jeu dans le bourgeonnement

des vésicules de sécrétion (Bonifacino and Glick, 2004). La fonction de ARF4 et 5, qui composent la classe II, reste peu étudiée mais ces protéines sont toutefois impliquées dans le transport inter-golgien (Volpicelli-Daley et al., 2005). La classe III est représentée par ARF6 qui contrôle le trafic des endosomes, l'internalisation ou encore le remodelage du cytosquelette d'actine (Donaldson, 2003). La génération de souris transgéniques pour ARF6 a permis de montrer l'implication de cette GTPase au niveau du développement hépatique. En effet, les embryons dont les cellules n'expriment pas ARF6 montrent un développement anormal du foie causé par une absence de réponse au facteur de croissance hépatique (Suzuki et al., 2006). Il est aussi à noter que ARF2 n'est pas exprimée chez l'homme (Hosaka et al., 1996). Toutes les ARFs partagent au moins 60% d'homologie de séquence (Tsuchiya et al., 1989; Tsuchiya et al., 1991). La structure moléculaire des ARF1 et 6 a été résolue et révèle l'existence de deux régions « switches » adoptant des conformations différentes lorsque les protéines sont liées au GDP, mais semblables lorsque ARF1 et ARF6 sont liées au GTP (Pasqualato et al., 2001). Ces régions font partie de quatre domaines consensus, et un dernier motif G2, en N-ter, est le site de myristoylation des ARF (Moss and Vaughan, 1995). Concernant leur localisation, ARF1 se retrouve principalement au Golgi tandis que ARF6 est majoritairement à la membrane plasmique (Peters et al., 1995). De plus, une étude réalisée en déplétant par paire ARF1, 3, 4 et 5 a permis de mettre à jour le rôle de chacune de ces ARFs dans le trafic vésiculaire s'étalant du réticulum endoplasmique aux endosomes de recyclage (Volpicelli-Daley et al., 2005).

#### I.2.2.1 ARF6 et les lipides membranaires.

Le fait qu'ARF6 soit la seule de sa classe et retrouvée en périphérie cellulaire dénote le caractère particulier de cette isoforme. Contrairement aux GEFs pour ARF1, celles de ARF6 sont insensibles à la bréfeldine A (BFA), un antibiotique initialement identifié comme inhibiteur du transport des protéines du

réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (Nebenfuhr et al., 2002). Le rôle de cette ARF à la membrane s'explique premièrement par son effet sur le métabolisme lipidique. ARF6 active la phospholipase D (PLD) (Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994), qui produit l'acide phosphatidique qui se trouve être un cofacteur de la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase de type 1 (I-PIP5K) (Honda et al., 1999; Krauss et al., 2003), aussi activée par ARF6. Cet effet synergique sur la PIP5K contribue à une large augmentation de PIP2 en périphérie cellulaire, nécessaire à l'initiation de l'endocytose dépendante de la clathrine (Wenk and De Camilli, 2004) et au maintien de la polarité des cellules épithéliales (Santy and Casanova, 2001).

#### I.2.2.2 ARF6 et l'endocytose des RCPGs.

ARF6 est impliquée dans l'internalisation des RCPGs (Houndolo et al., 2005). Il a été montré que le  $\beta$ 2AR et le récepteur à l'hormone lutéinisante mènent à l'activation de la GTPase, qui interagit avec les arrestines, suivie de l'endocytose des récepteurs via les puits de clathrine (Claing et al., 2001a; Mukherjee et al., 2000). Dans certains types cellulaires, ARF6 est aussi retrouvée dans des domaines riches en cavéoles (Ikeda et al., 2005). Celle-ci peut être aussi mise en jeu dans l'internalisation de molécules n'empruntant pas les voies classiques, telles les intégrines  $\beta$ 1, le récepteur M2 muscarinique ou encore le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (Donaldson, 2003).

#### I.2.2.3 Rôle d'ARF6 dans la formation de vésicules.

Les ARFs sont généralement imaginées comme agissant sur le recrutement à la membrane de protéines cytosoliques d'enrobage afin de faciliter la formation de vésicules. La capacité de la forme active de ARF1 à recruter une grande variété de protéines d'enrobage aux membranes de l'appareil de Golgi a

été largement étudiée *in vitro* et en cellules (Donaldson and Jackson, 2000). Par opposition, jusqu'à maintenant, aucune protéine d'enrobage qui soit recrutée aux membranes par ARF6 activée n'a été identifiée, bien que la liaison de ARF6-GTP à la protéine adaptatrice AP-1 et à d'autres protéines cytosoliques d'enrobage ait été démontrée *in vitro* (Austin et al., 2002; Takatsu et al., 2002)].

#### I.2.2.4 ARF6 et le réarrangement du cytosquelette.

Le rôle de ARF6 lors du remodelage du cytosquelette se traduit par la génération de pseudopodes et d'ondulations de membranes (Radhakrishna et al., 1996), la croissance dendritique (Albertinazzi et al., 2003), la migration cellulaire (Santy and Casanova, 2001) et la phagocytose (Niedergang et al., 2003; Zhang et al., 1998).

Dans beaucoup de cas, il apparaît que ARF6 change la structure de l'actine à la membrane plasmique via l'activation de Rac1. Il a été montré, jusqu'à maintenant, que ARF6 est requise pour former les ondulations de membrane et facilite leur génération (Radhakrishna et al., 1999). De plus, l'expression de EFA6, une GEF spécifique d'ARF6, génère des protrusions et des ondulations via l'activation de cette GTPase (Brown et al., 2001; Franco et al., 1999). En effet, des évidences suggèrent qu'ARF6-GTP entraîne l'activation de Rac1 (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999), mais le mécanisme régulant ce phénomène est encore inconnu.

Les effets d'ARF6 sur la composition de la membrane en lipides peut aussi entraîner des changements du cytosquelette, peut être de manière synergique avec Rac1. Les phosphoinositides, PIP2 en particulier, peuvent recruter et influencer l'activité de bon nombre de protéines liant l'actine et entraînant le remodelage du réseau existant (Yin and Janmey, 2003). PIP2, PIP5-kinase et ARF6 sont présentes ensemble à la membrane plasmique et à celle des

endosomes. Une stimulation accrue de l'activation d'ARF6 entraîne la formation de protrusions riches en PIP<sub>2</sub>, résultant de la polymérisation de l'actine (Brown et al., 2001; Honda et al., 1999) et, l'internalisation et le recyclage rapide de membrane (Brown et al., 2001). Enfin, à des niveaux d'expression bas, la PIP<sub>5</sub>-kinase et ARF6 agissent en synergie pour former des protrusions (Brown et al., 2001).

ARF6 est aussi impliquée dans le renouvellement des jonctions d'adhérence (AJ) des cellules MDCK polarisées et régule la distribution spatiale et le trafic de la cadhérine-E ainsi que les composants jonctionnels liés à la cadhérine, alors que ARF6 ne perturbe pas les jonctions serrées (Palacios et al., 2001). L'effet d'ARF6-GTP sur le désassemblage des AJ se fait via le trafic de vésicules, mais est indépendant du remodelage de l'actine et du métabolisme des phospholipides. Il a aussi été démontré que l'activation d'ARF6 par ARNO est requise lors de la migration haptotactique (*i.e.* induite par un gradient) des cellules et la dispersion des cellules canines MDCK induites par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF). Ceci est dû au désassemblage des AJs plutôt qu'à une influence sur la machinerie migratoire médiée par les intégrines.

### 1.2.3 Les protéines régulatrices des GTPases.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les protéines G ont la capacité d'osciller entre un état inactif et un autre actif. La balance entre ces deux conformations est contrôlée par les facteurs d'échange de guanine (GEFs) et les protéines activatrices de l'activité GTPasique (GAPs).

### I.2.3.1 Les RhoGEFs.

L'isolation de l'oncogène Dbl est à l'origine de la découverte des GEFs. Par homologie de séquence, cette protéine a été comparée à Cdc24 qui se trouve être un activateur de Cdc42 chez la levure (Bender and Pringle, 1989; Eva and Aaronson, 1985; Ron et al., 1991). La région homologue à Dbl a ainsi été nommée DH et apparaît nécessaire à l'activité GEF (Hart et al., 1994). Par la suite, soixante-neuf protéines contenant ce motif ont été isolées chez l'humain. Il est à noter qu'hormis trois régions CR conservées, les domaines DH n'ont que peu de ressemblance entre eux. De plus, pour les RhoGEF ayant ou non un même substrat, il n'existe jamais plus de 20% d'homologie entre ces facteurs d'échange. Néanmoins, des études cristallographiques ont permis de montrer que les domaines DH de Trio,  $\beta$ PIX et Sos1 ont les mêmes forme et orientation (Rossman et al., 2005). Plusieurs GEFs identifiées ont été analysées quant à leur capacité à catalyser l'échange de nucléotide. Certaines se sont avérées hautement spécifiques à une GTPase, telles Fgd1 pour Cdc42 (Zheng et al., 1996) et p115RhoGEF pour Rho (Hart et al., 1996), tandis que Vav1 par exemple, n'a pas de préférence entre Rac, Cdc42 et Rho (Olson et al., 1996).

### I.2.3.2 PIX.

Le facteur d'échange interagissant avec PAK (PIX), aussi appelé « cool », s'associe directement à Cdc42 et Rac1. Il existe deux isoformes :  $\alpha$ , exprimée dans les cellules hématopoïétiques et  $\beta$ , retrouvée dans tout l'organisme (Manser et al., 1998). Il existe deux formes pour  $\beta$ -PIX, 1 et 2, et la première est matérialisée par trois variants a, b et c (Kim et al., 2000). De plus,  $\beta$ 1-PIX peut être retrouvée en deux formats de 50 et 85 kDa (Bagrodia et al., 1998). Comme toute RhoGEF, il est composé d'un motif Dbl et d'une région PH, ainsi que plusieurs domaines d'interactions protéiques afin de réguler ses fonctions et localisation (Zeniou-Meyer et al., 2005). La liaison avec PAK s'effectue via un

domaine SH3 (Bagrodia et al., 1998), qui médie aussi l'association à l'ubiquitine ligase c-Cbl (Flanders et al., 2003) et à Rac1 (ten Klooster et al., 2006). Un motif « coiled-coil » est responsable de la dimérisation (Koh et al., 2001) pour la plupart des formes de PIX. Ces dernières comportent aussi un domaine de liaison à GIT (Premont Perry 2004), et une région riche en proline pour la liaison aux phosphatases POPX1 et 2, qui inactivent PAK (Koh et al., 2002).

Sous forme de dimère,  $\alpha$ -PIX est une GEF spécifique de Rac1, tandis que la forme monomérique agit aussi bien sur Cdc42 que Rac (Baird et al., 2005; Feng et al., 2004). Il a de plus été montré que la sous-unité  $\beta\gamma$  des protéines G, qui est associée à PAK, entraîne la dissociation du dimère de  $\alpha$ -PIX pour activer Cdc42 (Feng et al., 2004).

#### I.2.3.3 Les Rho GAPs.

La première GAP spécifique aux Rho GTPases a été purifiée biochimiquement d'une rate humaine et de glandes surrénales bovines (Garrett et al., 1991; Garrett et al., 1989; Morii et al., 1991). Cette protéine, appelée p50 Rho-GAP, possède une activité pour Rho/Rac/Cdc42 *in vitro* (Langille et al., 1999). Un nombre croissant de protéines ayant une activité GAP, pour les trois Rho GTPases principales, ont été trouvées dans les cellules de mammifères : p190 Rho-GAP, Graf, myr5, Bcr, n-Chimaerine, 3BP-1, ou encore, Abr, les deux dernières étant spécifiques à Rac1. Ces protéines partagent une séquence de 140 acides aminés, mais n'ont pas de ressemblance significative avec les Ras-GAP. Leur spécificité pour les GTPases varie chez toutes les Rho-GAPs. En effet, leur activité s'avère très ciblée lorsqu'elles sont étudiées en cellule. Par exemple, le spectre de substrat de p50 Rho-GAP *in vitro* comprend les protéines Rho/Rac/Cdc42. Cependant, *in vivo*, il est seulement restreint à Rho (Ridley et al., 1993).



#### I.2.3.4 Les ARF GEFs.

Les membres des GEFs reliées aux ARFs peuvent être classés en deux sous-familles principales en se basant sur la similarité de leur séquence en acides aminés et sur leurs différences de fonction (Jackson and Casanova, 2000). La sous-famille des ARF-GEFs à haut poids moléculaire inclut Sec7, Gea1 et Gea2, chez les levures, et BIG1/p200, BIG2 et GBF1, chez les mammifères. Elles sont composées de 1400 à 2000 acides aminés (Takai et al., 2001).

La seconde sous-famille, celle des GEFs à bas poids moléculaire, contient ARNO, cytohésine-1, GRP1 et cytohésine-4 (Jackson and Casanova, 2000). Celles-ci sont d'origine mammifère et il n'existe aucun homologue chez les levures. Ces protéines sont constituées d'environ 400 acides aminés et ont en commun une région « coiled-coil » en partie N-ter, un domaine sec7 central, et un domaine PH en partie C-ter. Le domaine sec7 est connu pour être l'unité minimale de GEF capable de lier et d'activer les ARFs (Chardin et al., 1996; Goldberg, 1998). De plus, contrairement aux GEFs de haut poids moléculaire, elles sont insensibles au métabolite fongique BFA. EFA6, une GEF spécifique pour ARF6 (Franco et al., 1999), est aussi classée dans cette famille malgré un poids moléculaire légèrement plus élevé. Bien que certaines études aient démontré ARNO, cytohesin-1 et GRP1 comme étant des GEFs préférentielles pour les ARFs de classes I et II, d'autres études plus récentes ont révélé que ces petites GEFs colocalisaient avec ARF6 en périphérie cellulaire et qu'elles contribuaient à son activation (Frank et al., 1998a; Frank et al., 1998b; Langille et al., 1999).

### I.2.3.5 Les ARF-GAPs.

Chez les mammifères, il existe vingt-quatre gènes encodant des protéines à domaines ARF-GAP. Celles-ci sont classées en deux groupes, selon la localisation du domaine GAP en N-ter (type ARF GAP1) ou placé entre un motif d'homologie à la plekstrine et un autre, nommé ankyrine (AZAP). Les six gènes encodant les ARF GAP1 sont dispatchés en deux sous-groupes : ARF GAP1 et GIT (partenaire d'interaction des GRKs) (Randazzo and Hirsch, 2004). Dans le premier sous-groupe, on retrouve ARF GAP1/3 et SMAP1/2 (protéine stromale associée à la membrane) (Tanabe et al., 2006). Dans le deuxième sont classées GIT1 et 2, dans lesquelles se concentrent trois domaines ankyrine, un domaine d'homologie Spa et un autre à la paxilline (Vitale et al., 2000).

Il existe vingt gènes encodant les AZAPs, dont les protéines associées sont divisées en quatre sous-groupes. Les ASAPs sont représentées par ASAP1, 2 et 3 (Andreev et al., 1999; Brown et al., 1998), et tiennent leur nom d'un domaine d'homologie à Src de type 3 (SH3) en C-ter, à l'exception de ASAP3, qui partage une grande homologie avec les deux autres membres (Fang et al., 2006). Les ACAPs tirent leur nom d'un domaine « coiled-coil » en N-ter (Jackson et al., 2000) et on retrouve deux isoformes, 1 et 2. Les AGAPs contiennent un domaine voisin des GTPases (GLD) (Xia et al., 2003) et les ARAPs, un domaine Rho GAP (Nie and Randazzo, 2006). Enfin, d'autres protéines comme la centaurine  $\alpha$ 1/2 sont des ARF GAPs, mais font figure d'exception dans la présente classification (Thacker et al., 2004).

### I.2.3.6. GIT.

GIT tire son nom du fait qu'elle interagit avec GRK2 (Premont et al., 1998) afin de réguler le trafic du  $\beta$ 2AR. Comme mentionné précédemment, il en existe deux isoformes, soient GIT1 et GIT2, qui se retrouvent sous de multiple variants (Premont et al., 2000). GIT1 est exprimée au niveau des poumons, du foie et du

cerveau, alors que GIT2 est ubiquitaire (Schmalzigaug et al., 2007). Le domaine ARFGAP de ces protéines est localisé en N-ter (Premont et al., 1998) et, en accord notamment avec leur rôle sur le cytosquelette d'actine (Di Cesare et al., 2000) et leur localisation membranaire (Frank et al., 2006), elles semblent spécifiques à ARF6, malgré le fait qu'*in vitro*, leur activité GAP s'opère aussi bien sur ARF1 que ARF6 (Vitale et al., 2000). La forme courte de GIT2 est néanmoins localisée au niveau de l'appareil de Golgi et cible ainsi préférentiellement ARF1 (Mazaki et al., 2001). Le motif d'homologie à Spa2 (SHD) permet la liaison à PIX, MEK1, la kinase d'adhésion focale (FAK) et PLC $\gamma$  (Haendeler et al., 2003; Premont et al., 2004; Yin et al., 2004; Zhao et al., 2000). Il est d'ailleurs à noter que l'association de PIX et GIT est nécessaire pour l'activation de la PLC (Jones and Katan, 2007). À la manière de PIX, GIT1 et GIT2 peuvent homo- et hétéro-dimériser via un domaine « coiled-coil » (Kim et al., 2003; Premont et al., 2004).

#### I.2.4 Relations entre Rac1 et ARF6.

Les effets de ARF6 sur le remodelage du cytosquelette d'actine ont souvent été reliés à un possible contrôle de l'activité de Rac1. Dans certains types cellulaires, ARF6 entraîne la relocalisation de Rac1 des endosomes vers la membrane plasmique (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999). La GEF pour ARF6, ARNO, semble contrôler l'activation de Rac en recrutant le complexe DOCK180-ELMO, qui est une GEF de cette dernière (Santy et al., 2005). De plus, le partenaire de Rac1 (POR1) interagit avec ARF6 (D'Souza-Schorey et al., 1997) afin de promouvoir le remodelage de l'actine qui n'est toutefois pas inhibé par l'expression du mutant dominant négatif de Rac. Enfin, un autre partenaire commun aux deux GTPases est l'arfaptine. Celle-ci interagit préférentiellement avec les ARFs liées au GTP, tandis qu'elle se lie à Rac1 sans que l'état d'activation de cette dernière soit impliqué dans leur affinité (Tarricone et al., 2001).

Concernant leur activation comparée, quelques études ont été réalisées à l'aide de différents systèmes. Dans des cellules canines MDCK, des cellules traitées afin qu'elles se séparent et migrent, on observe deux profils d'activation différents sur plusieurs heures. Une première chute de l'activité de Rac1 est rapportée qui s'expliquerait par une perte de signalisation dépendante de Rac au niveau du maintien des jonctions inter-cellulaires. Par la suite, l'augmentation graduelle de l'activité de ARF6 entraînerait une autre phase d'activation de Rac1 qui confère la phénotype migratoire finalement attendu (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003). La diminution de l'activité de Rac1 serait en lien avec le fait que ARF6 recrute NM23-H1 (Palacios et al., 2002), une protéine qui séquestrerait Tiam1, une GEF pour Rac1 (Otsuki et al., 2001). Il a aussi été montré que le recyclage des endosomes à la membrane nécessite l'activation de ARF6 pour ensuite mener à celle de Rac1 (Balasubramanian et al., 2007). De plus, la stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) (Krugmann et al., 2006) ou endothélio-vasculaires (VEGF) (Ikeda et al., 2005) provoque aussi l'activation combinée de ces deux GTPases.

#### 1.2.5 Le complexe GIT-PIX.

Le complexe GIT-PIX a d'abord été étudié pour son implication dans la régulation de l'adhésion cellulaire à la matrice. Ici est présentée une brève introduction sur ce processus. L'adhésion requiert l'agencement spécifique de protéines et de dérivés de l'acide phosphatidique à la membrane plasmique afin de créer un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Carragher and Frame, 2004). Cette connexion est un ancrage de la cellule qui permet par la suite de transmettre des signaux conduisant à la migration. Lorsqu'une cellule est en mouvement, des complexes focaux se forment au front de migration afin que les protrusions formées s'attachent à l'environnement extérieur (Lock et al., 2008).

Suite à la mise en jeu des intégrines, la paxilline, composante essentielle des complexes focaux, interagit via GIT (appelé à l'époque p95PKL) avec PIX (Turner et al., 1999). La paxilline possède des domaines riches en leucine qui sont phosphorylés par PAK afin de recruter GIT1 (Nayal et al., 2006). Il a de plus été montré que GIT2 est phosphorylée via FAK et Src pour ensuite interagir avec la paxilline (Brown et al., 2005). FAK est impliquée dans la phosphorylation de PIX afin de promouvoir le recrutement et l'activation de Rac1 aux complexes focaux (Chang et al., 2007). Il a été montré que la surexpression de GIT entraîne l'activation de Rac1 et Cdc42, et les changements morphologiques qui leur sont associés (Manabe et al., 2002). Cette observation peut être corrélée avec le fait que cette ARFGAP est par définition effectrice d'ARF6, qui est connue pour son rôle dans le recrutement, aux membranes, de Rac1 (Al-Awar et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999). La nouvelle localisation de Rac1 lui permettrait ainsi d'être activée par l'intermédiaire de la GEF PIX.

### **I.3 Le réarrangement du cytosquelette : migration et adhésion.**

La migration cellulaire est un phénomène essentiel au développement tissulaire et à l'homéostasie du système immunitaire, incluant la migration des macrophages et d'autres cellules dans les tissus (Dormann and Weijer, 2003; Schneider and Haugh, 2006). Cette motilité est modulée par la capacité des cellules à reconnaître les chimioattractants comme les chimiokines ou encore les facteurs de croissance. De plus, la migration cellulaire est importante au niveau pathologique, comme par exemple lors de fermeture de plaies (Schneider and Haugh, 2006). Les cellules tumorales, quant à elles, sont capables de moduler ce processus afin de pouvoir se développer, de survivre et de créer des métastases (Condeelis et al., 2005)

### I.3.1 Les bases moléculaires de la migration cellulaire.

Le déplacement naît de la combinaison entre la polymérisation dynamique de l'actine à l'avant et la contraction de l'arrière d'une cellule. Dans l'organisme, la migration est orientée et les stimuli externes contribuent à la polariser. Comme mentionné plus haut, Rac1 agit via WAVE et Arp2/3 afin de faire évoluer le front de migration en le modelant. La forme active de Rac1 s'accumule ainsi à l'avant de la cellule qui serait soutenu par un effet positif de boucle sur l'activation, mettant en jeu, comme vu chez les neutrophiles, PI3K et la PIP3 (Gardiner et al., 2002; Itoh et al., 2002; Kraynov et al., 2000). En revanche, sur les cotés et l'arrière de la cellule, PIP3 est déphosphorylée par la phosphatase et homologue de la tensine (PTEN) (Merlot and Firtel, 2003). Le choix de la direction de la cellule semble être toutefois assuré par Cdc42, étant donné que l'inhibition de celle-ci chez les macrophages, sans l'abolir en tant que tel, rend le mouvement anarchique (Allen et al., 1998). Cette GTPase, une fois activée, apparaît aussi essentielle au confinement de Rac1 au front de migration (Cau and Hall, 2005).

#### I.3.1.1 Le rôle de l'actine dans la migration.

La contribution des GTPases de type Rho sur le cytosquelette d'actine a été intensivement étudiée. Les effets hautement spécifiques de Rho sur la formation de fibres de stress, de Cdc42 vis-à-vis des filopodes, et de Rac1 dans la génération d'ondulation de membranes, sont reliés de manières différentes aux voies de signalisation agissant sur les filaments d'actine (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Chez les eucaryotes, le renouvellement et l'élongation de ces filaments sont majoritairement dus au complexe Arp2/3 et à la formine.

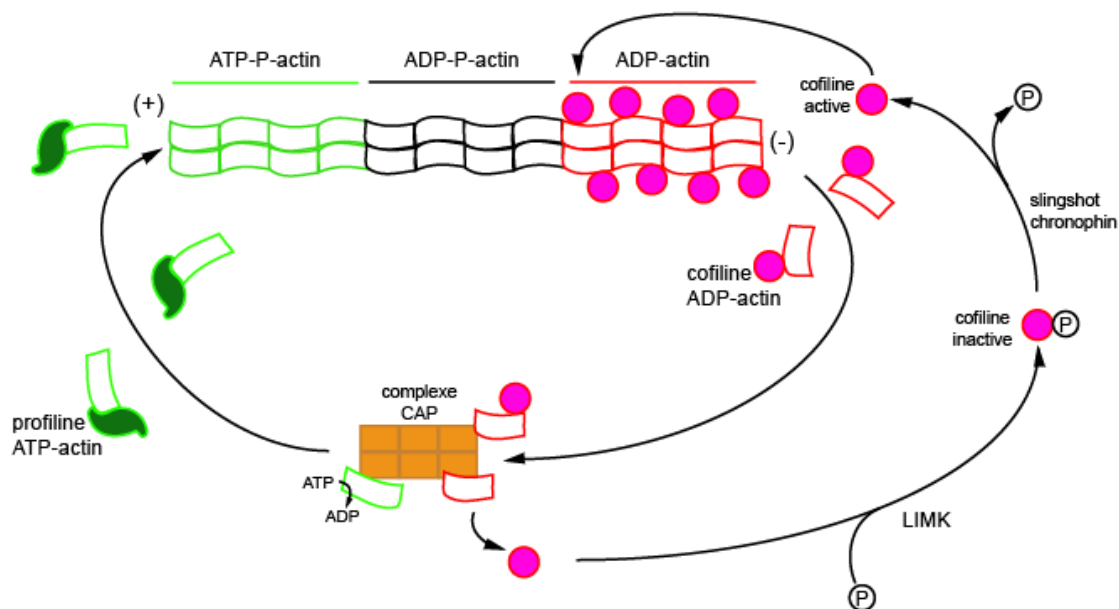
Bien que Rac1 et Cdc42 contrôlent l'établissement de phénotypes cellulaires différents, elles sont toutes deux reliées au complexe de protéines liées à l'actine (Arp2/3). Ce dernier est un heptamère s'associant aux terminaisons de filament ou sur les cotés de filaments préexistants (Millard et al.,

2004). Ce complexe est indirectement activé par les GTPases via les protéines de la famille WASP. La forme active de Cdc42 interagit avec WASP-neuronale ou -hématopoïétique afin de les activer. Ce processus consiste à lever l'inhibition de ces dernières qui en retour révèle un site d'interaction et d'activation de Arp2/3.

Rac1 en l'occurrence, active Arp2/3 via les protéines de la famille WAVE, sans directement interagir ensemble. Néanmoins, WAVE1 se retrouve dans un complexe en compagnie de HSPC300, Nap125 et PIR121, qui s'avère être inactif, dont les deux derniers membres susmentionnés s'associent directement avec des effecteurs de Rac. Cette dernière est soupçonnée d'entraîner le désassemblage du complexe inactif qui permettrait à WAVE de s'associer avec Arp2/3 (Eden et al., 2002).

Les formines sont aussi des composantes majeures impliquées dans la polymérisation de l'actine. Chez les mammifères, il a été montré que Rho stimule le réarrangement du cytosquelette en passant par une formine diaphane (DRF), appelée mDia1 (Watanabe et al., 1999). La liaison de la GTPase lève l'auto-inhibition de mDia afin de révéler un site FH2 se liant ensuite à l'extrémité en croissance d'un filament d'actine, (+) ou *barbed-end*. De plus, un domaine FH1 permet à la formine d'interagir avec un complexe profiline/actine pour ajouter des monomères au filament (Paul and Pollard, 2008).

La cofiline, couplée au facteur dépolymérisant l'actine (ADF), coupe les filaments ou raccourcit les extrémités (-) (DesMarais et al., 2005) afin de libérer des monomères pour l'élongation au (+) (Ghosh et al., 2004). La cofiline est principalement régulée par phosphorylation dépendante de la LIMK, elle-même activée par les protéines effectrices de Rac1/Cdc42, les PAK (Edwards et al., 1999), ou encore de RhoA, ROCK (Ohashi et al., 2000). (Fig. 7)



**Figure 7: la polymérisation de l'actine.**

Les filaments d'actine subissent un échange continu de monomères à leurs extrémités (-) et (+). Le corps du filament se compose d'actine phosphorylée et liée à l'ADP (noir). Le bout positif est composé d'actine phosphorylée et liée à l'ATP (vert). L'extrémité négative est formée d'actine liée à l'ADP (rouge). L'enrichissement de la partie (+) est assuré par la profiline, qui reconnaît l'actine liée à l'ATP pour l'ajouter aux filaments. La dépolymérisation de l'extrémité négative est opérée par la cofiline, qui se lie à l'actine chargée en ADP. La régulation de la cofiline est assurée par la LIMK, inactivant la protéine, et des phosphatases, l'activant. Enfin, l'actine dépolymérisée est recyclée par le complexe CAP, qui permet l'échange d'ADP pour l'ATP et ainsi la réutilisation des monomères aux extrémité (+).

En ce qui concerne l'étape de structuration précise de l'actine afin d'orienter correctement les filaments, l'effet de RhoA est le mieux caractérisé. La kinase ROCK, effectrice de Rho, phosphoryle en sérine/thréonine la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC). Ceci a pour effet d'augmenter la phosphorylation de la MLC qui va encourager le partenariat entre la protéine myosine II et l'actine pour créer les contractions nécessaires à la contraction de la cellule en mouvement (Kawano et al., 1999; Velasco et al., 2002). Dans le cas de Rac1 et Cdc42, le but ultime de leur signalisation est d'orchestrer l'embranchement des filaments en structures relativement complexes pour créer soit des lamellipodes, soit des filopodes. Pour cette dernière architecture, l'actine ne doit pas comporter de ramification, afin de modéliser de véritables « antennes »



émergeant de la cellule. Toutefois, il a été montré que les filopodes naissent tout d'abord d'un réseau de filaments, régulés par Cdc42 et Arp2/3 (Svitkina et al., 2003), et que l'élongation de ces filaments met en jeu une inhibition du « coiffage » de leur extrémité en croissance (+) et leur entrecroisement à l'aide de la fascine (Vignjevic et al., 2003). Dans le cas de Rac1, la dynamique du réarrangement de l'actine au front de migration de la cellule n'a pas encore été élucidée.

### I.3.1.2 Le rôle des microtubules dans la migration.

La forme du cytosquelette est aussi régulée par les microtubules (MTs) polarisés, comme l'actine et partant habituellement du centrosome vers la périphérie cellulaire. Cette structure est mise en jeu aussi bien dans la polarité cellulaire que la localisation des organites dans la cellule. L'effecteur de Rac et Cdc42, IQGAP, agit comme protéine d'échafaudage pour CLIP-170, permettant de lier les GTPases à cette dernière dans le processus de stabilisation de l'extrémité (+) des MTs (Fukata et al., 2002). IQGAP s'avère être un pont entre le contrôle des deux composantes du cytosquelette global. De plus, un autre effecteur de Rac1 et Cdc42, PAK, est impliqué dans la phosphorylation/inhibition d'une famille de protéine, Op18/stathmine, empêchant ainsi cette dernière de désassembler les microtubules (Cassimeris, 2002; Daub et al., 2001). La part de Rho dans la régulation des MTs n'est pas définie dans un contexte général. Dans les neurones, la protéine médiatrice de la réponse à la collapsine de type 2 (CRMP-2) est inactivée par phosphorylation via ROCK, ce qui arrête l'élongation des MTs (Arimura et al., 2000; Fukata et al., 2002).

### I.3.2 L'adhésion.

La migration orientée d'une cellule demande une orchestration finement localisée de son adhésion à la matrice extra-cellulaire. L'assemblage des complexes focaux est ultra-dynamique et constitue un recyclage permanent apparaissant principalement au front de migration (Webb et al., 2002). Différents types de contacts focaux apparaissent selon la phase du mouvement de la cellule. Ceux présents à l'avant imposent une force de traction nécessaire au déplacement cellulaire (Beningo et al., 2001). Ces contacts disparaissent ensuite afin d'en former d'autres aux nouveaux sites de contacts. L'adhésion est aussi mise en jeu à l'arrière de la cellule afin de maintenir l'aplatissement caractéristique d'un phénotype migratoire tout en sachant disparaître pour permettre à la cellule d'avancer et de ne pas rester accrocher au niveau de sa queue (Kirfel et al., 2004). Comme il est présenté en figure 8, plusieurs phases sont indispensables à la migration pour lui permettre de « ramper » de manière logique et efficace.

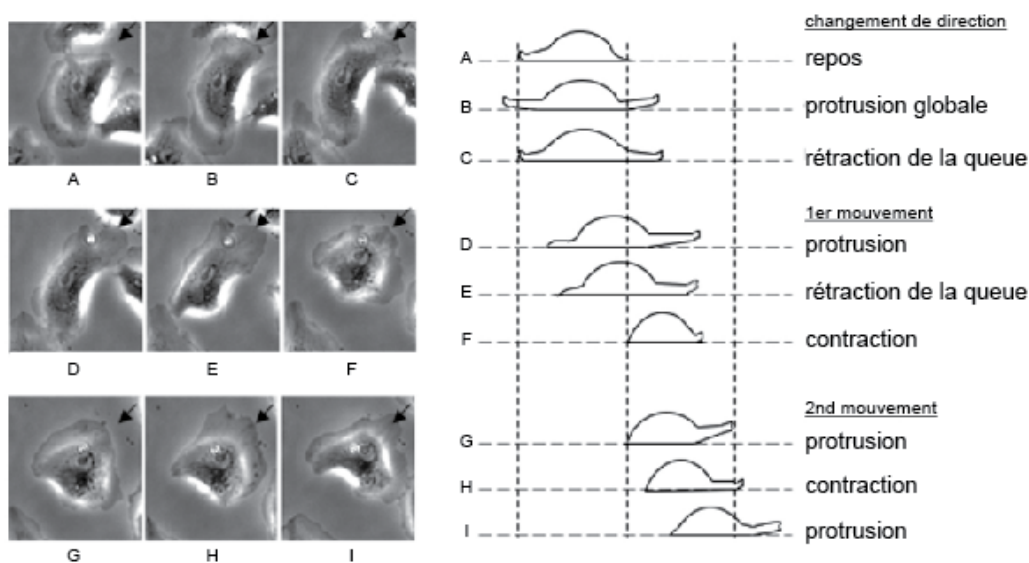
La dynamique d'assemblage/désassemblage des points d'adhésion focaux est bien sûr régulée par des voies de signalisation et les tensions amenées par l'attachement à la matrice.

#### I.3.2.1 Le cycle des points d'adhésion focaux.

Comme expliqué plus haut, une fois formés, les sites de contact sont recyclés ou maintenus. Le destin de l'adhésion est dicté par diverses kinases et phosphatases, mais plus particulièrement par FAK. Par exemple, l'absence de cette enzyme provoque l'apparition de larges points d'adhésion en périphérie cellulaire démontrant son rôle dans le désassemblage des complexes focaux (Ilic et al., 1995). FAK, en activant ERK et la kinase de MLC (MLCK), induit ce désassemblage, qui peut aussi passer par la phosphorylation de Src et p190RhoGAP afin d'inhiber l'activité de RhoA (Schober et al., 2007; Webb et al., 2004). FAK régule ainsi négativement les torsions générées par la myosine à

l'avant de la cellule en agissant sur la MLCK et les GTPases. Elle agit aussi sur la paxilline qui intervient rapidement dans la formation des contacts focaux (Brown et al., 2005).

L'autre phénomène entrant en jeu dans la régulation de l'adhésion est la dégradation protéique. Par exemple, la calpaïne induit la protéolyse de la taline entraînant la dissociation de nombreux composants des complexes d'adhésion focaux telles la paxilline, la vinculine et la zyxine (Franco et al., 2004). Ce mécanisme a été proposé comme permettant de contrebalancer les effets d'assemblage de FAK (Ling et al., 2002).



**Figure 8: les étapes de la migration cellulaire.**

À l'état basal (A), les cellules sont adhérentes à la matrice extracellulaire. Suite à la réception d'un message externe (symbolisé par la flèche), la cellule va partiellement se libérer de son attachement et sa queue se rétracter (B,C). L'initiation du mouvement est traduite par une élongation du front de migration qui va s'adhérer plus loin sur la matrice (D), tandis que la queue et le corps cellulaire se contractent (E,F). Par la suite, le cycle est répété afin que la cellule acquiert un phénotype migratoire efficace (G,H,I). (adaptée de Soon LL, 2007).

### I.3.2.2 Le rôle du cytosquelette d'actine lors de l'adhésion.

L'adhésion et le réarrangement du cytosquelette d'actine sont étroitement liés. Il a été par exemple montré que le complexe Arp2/3 est recruté aux points d'adhésion en interagissant avec la vinculine sous l'égide de la PI3K et de Rac1 (DeMali et al., 2002). La myosine est importante dans le processus de maturation des points d'adhésion (Vicente-Manzanares et al., 2007), du fait que moins la force de contraction exercée sur un point est forte, moins l'assemblage de complexes focaux est requis. Ainsi, les protéines des voies de signalisation impliquées dans cette contraction, telles RhoA et ROCK, agissent sur l'adhésion (Hu et al., 2007).

Au centre de la cellule se trouve des sites d'adhésion matures, *i.e.* plus stables que ceux du front de migration, qui sont régulés par la myosine et Src afin de leur donner une forme plus allongée. Cette transformation est aussi due en partie par la déphosphorylation de la paxilline qui induit un échange d'intégrine  $\alpha V\beta 1$  pour la forme  $\alpha 5\beta 1$  (Zaidel-Bar et al., 2007b).

Au niveau de la queue de la cellule, les mécanismes de contrôle de l'adhésion semblent être les mêmes qu'à l'avant. Les contacts résiduels de la queue ont pour fonction de résister à la tension exercée sur la cellule par la rétraction du front de migration et de conserver ainsi la forme aplatie nécessaire au mouvement (Rid et al., 2005). Pour le mouvement en tant que tel, ces contacts doivent, soit se désassembler, soit suivre la cellule. Pour ce dernier cas de figure, il est probable que les complexes d'adhésion se muent le long des fibres de stress d'actine (Hu et al., 2007).

### I.3.2.3 Le rôle des microtubules dans l'adhésion.

Les microtubules ont une part importante dans la prise de décision de l'orientation de la cellule en mouvement, et donc, dans la polarisation des voies de signalisation. À l'arrière de la cellule et à la frontière du front de migration, les

microtubules sont responsables du désassemblage de l'adhésion (Kaverina et al., 1999). En se remodelant, ils peuvent par exemple relâcher les tensions apposées aux points de contacts. La kinase à cible tyrosine Arg, dont l'activité et la localisation sont régulées par les microtubules, inhibe RhoA et p190RhoGAP, et l'absence de l'enzyme conduit à la fixation de la cellule à son substrat (Peacock et al., 2007). Les MTs peuvent aussi induire la dégradation des protéines des points d'adhésion via la calpaïne (Bhatt et al., 2002). De plus, le désassemblage peut être induit par l'endocytose des composantes adhésives, via la GTPases dynamine et FAK (Ezratty et al., 2005).

À l'arrière de la cellule, la rétraction est bien sûr régulée par la myosine, et plusieurs RhoGEF telles H1 et Lfc sont situées sur les MTs qui, en se dépolymérisant, peuvent les relâcher et ainsi contribuer à activer Rho (Glaven et al., 1999; Kwan and Kirschner, 2005; Zenke et al., 2004).

Les microtubules semblent aussi induire l'assemblage des complexes d'adhésion focaux puisque ceux-ci activent Rac1 (Waterman-Storer et al., 1999). Les facteurs d'échange pour Rac et Cdc42, ASEFs, pourraient être mis en cause dans ce processus puisqu'ils sont contrôlés par APC, une protéine présente aux extrémités croissantes des MTs (Kawasaki et al., 2000).

#### **I.4 Hypothèse de travail.**

Les données amassées jusqu'à maintenant sur les liens fonctionnels unissant Rac1 et ARF6 ont mis en évidence que ces deux GTPases sont régulées de manière précise, lors de l'acquisition par une cellule, d'un phénotype migratoire. En effet, il en ressort que ARF6 activerait Rac1 suite à l'action de signaux extracellulaires variés. Les premiers travaux reliant ces deux GTPases ont montré que la surexpression du mutant mimant la forme inactive de ARF6 bloque l'apparition d'ondulation de membrane générées par un traitement au fluorure d'aluminium, ou suite à l'expression d'un mutant constitutivement actif de Rac (Radhakrishna et al., 1999; Radhakrishna et al., 1996; Zhang et al.,

1999). De même, le réarrangement du cytosquelette d'actine induit par le phorbol ester semble être entraîné par ARF6 et Rac1 par une voie de signalisation commune (Hiroyama and Exton, 2005). Certains facteurs d'échange de ARF6, tels EFA6 et ARNO, semblent agir sur l'activation de Rac par la mise en jeu du complexe DOCK180-ELMO dans le cas de ARNO (Franco et al., 1999; Santy and Casanova, 2001; Santy et al., 2005). De plus, l'activation de ces deux GTPases entraîne leur localisation à la membrane plasmique afin de générer des ondulations de membranes, suite à la stimulation d'un récepteur couplé à G<sub>q</sub> (Boshans et al., 2000).

Ces résultats ayant été obtenus, pour la plupart, à l'aide de mutants de ces protéines, leur cycle d'activation, une propriété indispensable des GTPases, n'a pas été pris en compte. Nous nous proposons donc d'étudier cette régulation à l'aide d'une technique récemment développée dans notre laboratoire, l'interférence à l'ARN, consistant à inhiber l'expression endogène d'une protéine, ARF6 dans notre cas. L'influence de la présence d'ARF6 sera établie dans deux phénomènes associés au réarrangement du cytosquelette d'actine : la formation d'ondulations de membrane et la migration cellulaire en tant que telle.

De plus, bon nombre d'évidences démontrent que ARF6 et Rac1 interagissent avec des protéines communes. La probabilité de les retrouver en complexe durant une étape pré-migratoire est donc élevée. Nous tenterons donc d'établir le lien structurel existant entre les deux petites protéines G.

Dans un deuxième temps, nous évaluerons le rôle des arrestines dans l'initiation du phénotype migratoire. Plusieurs indices fournis par la littérature indiquent que ces protéines d'échafaudage ont la capacité d'intervenir dans la signalisation menant à la migration cellulaire. La première donnée révélant la contribution de ces protéines lors de la migration a été obtenue à l'aide de souris dont le gène codant pour la  $\beta$ arr2 fut invalidé. En effet, les lymphocytes de ces dernières sont incapables d'adopter un phénotype migratoire suite à l'activation de récepteurs aux chimiokines (Fong et al., 2002). Plus récemment, dans notre

système d'étude que sont les cellules HEK293, il a été montré que la chimiotaxie induite par la stimulation des récepteurs CXCR4 et AT1 est dépendante de la  $\beta$ arr2 (Hunton et al., 2005; Sun et al., 2002). Toujours concernant le récepteur AT1, une étude réalisée dans les cellules Hep2 a démontré que les deux arrestines sont nécessaires à l'apparition d'ondulations de membrane et à l'activation des MAPK ERK1/2 au front de migration (Scott et al., 2006). Notre laboratoire a déjà établi que ARF6 et les arrestines interagissent de manière directe afin de potentialiser l'activation de la GTPase via ARNO (Claing et al., 2001a). Faisant suite à ces travaux, nous tenterons de préciser la contribution des  $\beta$ arrestines lors de la transduction du signal menant à l'activation de ARF6 et de Rac1.

## **CHAPITRE II: Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration**

(publié dans le journal: Mol Biol Cell. 2007 Feb;18(2):501-11)

Mathieu Cotton<sup>\*</sup>, Pierre-Luc Boulay<sup>\*</sup>, Tanguy Houndolo<sup>\*</sup>, Nicolas Vitalet<sup>†</sup>,  
Julie A Pitcher<sup>§</sup> and Audrey Claing<sup>\*‡</sup>

From the <sup>\*</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7, the <sup>§</sup>MRC Laboratory for Molecular and Cellular Biology and Department of Pharmacology, University College London, London, England, WC1E 6BT, and the <sup>†</sup>INCI UMR-7168 CNRS/ULP 67084, Strasbourg, France

Phone: (514) 343-6352

Fax: (514) 343-2291

<sup>‡</sup> Corresponding author

### **Contribution des auteurs:**

**MC**: réalisation de la majorité des expériences (Fig. 1-5 et 7-8) et écriture.

**PLB** : production des petits ARNs interférants dirigés contre ARF1.

**TH** : production des petits ARNs interférants dirigés contre ARF6.

**NV** : don de la protéine ARF1 purifiée

**JAP** : réalisation des expériences de ruffling dans les cellules Hep2 (Fig. 6) et écriture.

**AC** : conceptualisation du projet et écriture.



Running Head: Functional interaction of ARF6 and Rac1 during HEK293 cell migration.

Key Words: ARF, Rac, G protein-coupled receptor, ruffling, cell migration

Abbreviations: ARF, ADP-ribosylation factor; Ang II, angiotensin II; AT<sub>1</sub>R, angiotensin II type 1 receptor; GPCR, angiotensin II type 1 receptor; GEF, guanine-nucleotide exchange factor; GAP, GTPase-activating protein; PIX, p21-activated kinases [PAK]-interacting exchange factor; siRNA, small interfering RNA.

## II.1. SUMMARY

ARF6 and Rac1 are small GTPases known to regulate remodelling of the actin cytoskeleton. Here, we demonstrate that these monomeric G proteins are sequentially activated when HEK 293 cells expressing the angiotensin type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) are stimulated with angiotensin II (Ang II). Following receptor activation, ARF6 and Rac1 transiently form a complex. Their association is, at least in part, direct and dependent upon the nature of the nucleotide bound to both small G proteins. ARF6-GTP preferentially interacts with Rac1-GDP. AT<sub>1</sub>R expressing HEK293 cells ruffle, form membrane protrusions and migrate in response to agonist treatment. ARF6, but not ARF1, depletion using small interfering RNAs recapitulates the ruffling and migratory phenotype observed following Ang II treatment. These results suggest that ARF6 depletion or Ang II treatment are functionally equivalent and point to a role for endogenous ARF6 as an inhibitor of Rac1 activity. Taken together, our findings reveal a novel function of endogenously expressed ARF6 and demonstrate that by interacting with Rac1, this small GTPase is a central regulator of the signaling pathways leading to actin remodeling.

## II. 2. INTRODUCTION

Reorganization of the actin cytoskeleton is an essential cellular response in various physiological and pathological conditions triggered by a broad variety of external stimuli such as hormones and growth factors. In mammalian cells, these stimuli promote the assembly of actin structures by activating signaling cascades regulated by small GTP-binding proteins of the Rho family. Like all GTPases, these cycle between an inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) state. Cycling between these two states is regulated by guanine-nucleotide exchange factors (GEFs), which facilitate the exchange of bound GDP for GTP and GTPase-activating proteins (GAPs) that catalyse GTP hydrolysis (Geyer and Wittinghofer, 1997; Moon and Zheng, 2003; Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002). In addition, the activation of Rho-like GTPases is regulated by guanine-nucleotide dissociation inhibitors (GDIs), which retain the small G proteins in the cytosol (Olofsson, 1999). The best characterized members of the Rho family are RhoA, Rac1 and Cdc42. While all promote actin reorganization, these small GTPases have distinct effects on cell shape and movement (Hall, 1998). For instance, Rho proteins have been classically associated with stress fiber formation (Ridley and Hall, 1992), Rac1 protein regulates ruffling and lamellipodia formation (Ridley *et al.*, 1992), while Cdc42 is important for filopodia formation (Nobes and Hall, 1995).

Several studies have contributed to an understanding of the molecular mechanisms by which small GTP-binding proteins regulate actin remodeling leading to membrane ruffling and cell migration following extracellular stimuli. The ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), a small GTPase which regulates vesicular trafficking, and the remodelling of membrane lipids has also been shown to play an important role in actin rearrangement (reviewed in (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006)). It was recently demonstrated that aluminium fluoride and epidermal growth factor treatment can promote the relocalization of ARF6 to the ruffling membranes (Fang *et al.*, 2006). Interestingly, Radhakrishna and colleagues have suggested that this small GTP-binding protein is an important upstream regulator of Rac1-mediated ruffle formation since expression of a

dominant negative mutant (ARF6T<sup>27</sup>N) prevents the aluminium fluoride-activated effect in Rac1 expressing cells (Radhakrishna *et al.*, 1999). Similarly, Zhang *et al.* demonstrated that ARF6 was required for Rac1-mediated membrane ruffling in macrophages following growth factor stimulation (Zhang *et al.*, 1999). Recently, Nishiya and colleagues suggested that the localized formation of a complex including  $\alpha 4$  integrin, paxillin, and an ARF GAP is required for polarized Rac activity and directional cell migration providing a mechanism for the spacial redistribution of activated Rac necessary for cell movement (Nishiya *et al.*, 2005).

ARF6-dependent Rac1 activation has been suggested to require the involvement of adaptor proteins. ARF6-mediated peripheral actin rearrangement is proposed to involve POR1 (Arfaptin 2), a Rac1-interacting protein (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997). Furthermore, other proteins such as Arfaptin 1 and p95-APP1 promote the formation of a complex including both ARF6 and Rac1 (Di Cesare *et al.*, 2000; Tarricone *et al.*, 2001). Many other cellular events including neurite outgrowth and epithelial cell scattering are also regulated by the coordinated action of ARF6 and Rac1 (Albertinazzi *et al.*, 2003; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Santy and Casanova, 2001). Thus, it is well established that cross-talk between ARF6 and Rac plays an important role in cell shape remodelling. The molecular mechanisms by which ARF6 regulates Rac activity remain, however, somewhat obscure.

We have previously shown that ARF6 is important for the agonist-dependent internalization of the angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) in HEK 293 cells suggesting that this G protein-coupled receptor (GPCR) can activate ARF6-dependent signalling pathways (Houndolo *et al.*, 2005). Angiotensin II (Ang II) is a potent hypertensive hormone, which also affects cell proliferation, migration, and invasion (Lucius *et al.*, 1999). Targeting of the Ang II system is therefore the therapy of choice for diseases such as hypertension, heart failure, and cardiac hypertrophy (de Gasparo *et al.*, 2000; Kim and Iwao, 2000). In HEK 293 cells, Ang II promotes the activation of several signalling pathways such as stimulation of the heterotrimeric G protein G $\alpha$ q/11 and the recruitment of the scaffolding protein  $\beta$ arrestin 1 to coordinately activate RhoA and the formation of stress fibers

(Barnes et al., 2005b). In this study, we have examined a potential role for ARF6 in mediating Ang II-dependent actin remodelling. Specifically, we investigated the role of endogenous ARF6 as a regulator of Rac1 activity using AT<sub>1</sub>R-dependent membrane ruffling and migration of HEK 293 cells as a model system.

### II.3. MATERIALS AND METHODS

**Reagents and antibodies.** Minimal essential medium and fetal bovine serum were purchased from Sigma. All other tissue culture reagents were purchased from Invitrogen. Monoclonal anti-myc 4A6 and anti-Rac1 23A8 were purchased from Upstate. The anti-ARF6 3A1 (monoclonal), anti-Rac1 C-11 (polyclonal) antibodies and protein G PLUS agarose were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-ARF6 polyclonal antibody was a generous gift from J. Donaldson, NIH (USA). The anti-ARF1 antibody was from Abcam. The  $\beta$ -PIX antibody was from Chemicon. HA-beads Affinity Matrix and anti-HA antibodies were from Roche Applied Science. Alexa Fluor 488 phalloidin, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, Alexa Fluor 633 goat anti-mouse and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit were from Molecular Probes. Ang II, fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies, and other reagents were obtained from Sigma.

**DNA plasmids and siRNA.** Human angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) was obtained from S.A. Laporte (McGill University, Canada). GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) was a gift from J.D. Lambeth (Emory University, USA). Rac1-myc, Rac1T<sup>17</sup>N-myc, Rac1Q<sup>61</sup>L-myc and GST-PAK(CRIB) were obtained from N. Lamarche-Vane (McGill University, Canada). ARF6-HA and ARF6 T<sup>157</sup>A-HA were from L.C. Santy (University of Virginia, USA). GST-RhoA and GST-Cdc42 were from R. Cerione (Cornell University, USA). GST-GGA3 was from J-L. Parent (Université de Sherbrooke, Canada), and  $\beta$ -PIX-Flag was from R.T. Premont (Duke University, USA). Double-stranded siRNA (small interfering RNA) targeting human ARF6 or ARF1 was synthesized as previously described (Houndolo et al., 2005) using the Silencer<sup>TM</sup> siRNA construction kit from Ambion (Austin, TX). The 21-nucleotide sequence from siRNA #1 (Houndolo et al., 2005) and #2 (Hashimoto et al., 2004) were previously characterized. To design ARF1-specific siRNA duplexes, we choose a 21-nucleotide sequence corresponding to region 7 to 28 from the human ARF1 mRNA (5'-

AACATCTTCGCCAACCTCTTC-3'). The scrambled siRNA targets a non-relevant region in the human genome (5'- AACAGGATAGTCGAGCAGAGT-3').

**Cell culture and transfection.** HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-HA (Fessart et al., 2005) or AT<sub>1</sub>R-Flag were a gift from S.A. Laporte, McGill University (Canada). HEK 293 cells were maintained in minimal essential medium supplemented with 1mM non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 10% Fetal Bovine Serum at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Transfection of DNA plasmids and siRNAs were performed as previously described (Houndolo et al., 2005) using Lipofectamine™ 2000 according to the manufacturer's instructions. However, in these experiments, cells were used 48h after siRNA transfection. Hep2 cells were maintained Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) containing 10% foetal calf serum (Sigma), penicillin and streptomycin (Sigma) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were grown to 60-70% confluency prior to transfection by electroporation in HEBS buffer (20mM HEPES, 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM D-Glucose) using two 450v, 125µF pulses (Gene Electropulser II, BioRad) and 1µg of the relevant cDNA or 200nM ARF6 siRNA. Cells were harvested/processed 48h after transfection (Cant and Pitcher, 2005).

**Western blotting.** All proteins were run on polyacrylamide gels (12%) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific antibodies described in the following sections. Secondary antibodies were all fluorescein isothiocyanate-conjugated, and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

**Activation of ARF6 and Rac1.** HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-HA receptor (Fessart et al., 2005) were serum starved overnight. The cells were stimulated with Ang II (1 µM) at 37°C for the indicated times. Cells were lysed

in 400  $\mu$ l of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1 % NP-40, 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and protease inhibitors). Samples were incubated for 30 min (4°C) and spun for 10 min at 10,000 rpm. GST-PAK(CRIB) (Rac1 activation), or GST-GGA3 (ARF6 activation) fusion proteins coupled to glutathione-Sepharose 4B beads were added to each tube, and samples rotated at 4°C for 1h. Proteins were eluted into 25  $\mu$ l of SDS sample buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on 12% SDS-PAGE and detected by immunoblot using a specific anti-Rac (Upstate) or anti-ARF6 (gift from J. Donaldson) antibody. The secondary antibodies were FITC-conjugated (Sigma) and the proteins were detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham). The same protocol was followed to study the activation of transiently expressed Rac1-myc and ARF6-HA. The proteins were detected using respectively anti-myc and anti-HA antibodies.

**GST pull down assays.** Equal amounts of GST, GST-Rac1( $\Delta$ CAAX), GST-Cdc42 and GST-RhoA were incubated in buffer SM (pH 7.4, 25mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM DTT, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 0.2% Triton X100 and protease inhibitors) with 1 $\mu$ g of purified recombinant non-myristoylated ARF6. For nucleotide-loaded small GTPase assays, GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) was mixed with either GDP $\beta$ S (100  $\mu$ M) or GTP $\gamma$ S (10  $\mu$ M) in buffer E to a final volume of 250  $\mu$ l. Nucleotide loading was stopped with MgCl<sub>2</sub> (60 mM) after a 30 min incubation at 30°C. The beads were then washed and resuspended in buffer SM containing 1  $\mu$ g of purified recombinant ARF6. For ARF6 and ARF1 loading experiments, purified G proteins were incubated with either GDP $\beta$ S (100  $\mu$ M) or GTP $\gamma$ S (10  $\mu$ M) in buffer E in a final volume of 100  $\mu$ l. These incubations were then mixed with GST-Rac1( $\Delta$ CAAX), in a total volume of 250  $\mu$ l. In both types of experiments, samples were tumbled for 3h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed 5 times and proteins eluted into 20  $\mu$ l of SDS sample buffer by heating to 95°C for 5 min. Samples were run on polyacrylamide gels (12%) and the amount of interacting ARF6 or ARF1



detected by Western blotting using the monoclonal anti-ARF6 antibody (Santa Cruz) or anti-ARF1 (Abcam).

**Co-immunoprecipitation experiments.** For ARF6/Rac1 co-immunoprecipitations, HEK293 cells stably expressing AT<sub>1</sub>R-HA were plated in 10cm dishes. Before the experiments, cells were serum starved overnight and stimulated with Ang II (1  $\mu$ M) for the indicated times before being solubilized in 300  $\mu$ l of TGH buffer (pH 7.3, 1 % Triton, 10 % glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) containing protease inhibitors (4°C for 1h). Lysates were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and equal concentrations of soluble protein were incubated with the monoclonal anti-ARF6 or polyclonal anti-Rac1 antibodies and protein G-PLUS agarose beads. The beads were washed and bound proteins were eluted into 20  $\mu$ l of SDS sample buffer containing 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol and heated to 95°C for 5 min. Proteins were resolved on 12% gels and detected by immunoblot analysis using specific antibodies (polyclonal anti-ARF6, polyclonal anti-Rac1). In a third set of experiments, HEK 293 cells stably expressing AT<sub>1</sub>R-Flag were transfected with ARF6-HA or ARF6T<sup>157</sup>A-HA and either Rac1-myc, Rac1T<sup>17</sup>N-myc or empty vector. Immunoprecipitations were performed as described above with the following exceptions, samples were incubated with affinity matrix HA beads (15  $\mu$ l) (Roche) overnight at 4°C, and interacting/immunoprecipitated proteins detected using specific monoclonal anti-HA and monoclonal anti-myc antibodies. The interactions were quantified as described before, using Image Quant v5.2.

**Immunofluorescence.** For Rac1 and ARF6 localisation experiments, HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-Flag were transfected with Rac1-myc and ARF6-HA constructs. Cells were then stimulated with Ang II (1 $\mu$ M) for the indicated times, fixed using paraformaldehyde (4%), and overexpressed proteins were successively labelled using a polyclonal HA antibody, a secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-568, a monoclonal anti-myc antibody, and a secondary anti-mouse antibody coupled to Alexa-633 in a

permeabilizing media (MEM, 0.1% BSA, 10 mM HEPES, 0.05% saponin). Finally, cells were incubated with Alexa-488 phalloidin in the same media for 1h. For the ruffling experiments, HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-HA receptor were transfected with Rac1Q<sup>61</sup>L-myc construct, siRNA targeting ARF6 (#1), siRNA targeting ARF1 or siRNA targeting ARF6 (#1) and Rac1T<sup>17</sup>N. 48h after transfection, cells were serum starved overnight and then stimulated for 10 min with Ang II (1μM) or left untreated. For time course observations (untreated and ARF1siRNA treated), cells were stimulated for 1, 2, 10, 15, 30 or 60 min. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde and incubated with Alexa-488 phalloidin (1h). For ruffling experiments performed in Hep2 cells, cells were transfected with the muscarinic receptor (M1MR) and either control siRNA, siRNA targeting ARF6, Rac1T<sup>21</sup>N-myc or Rac1Q<sup>61</sup>L-myc. Similarly, cells were stimulated with acetylcholine (ACh, 100μM) for 10 min, fixed, permeabilized and stained for actin. Expression of the different constructs was verified by immunofluorescence. For β-PIX experiments, HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-HA were transfected with either β-PIX-Flag and ARF6 siRNA(#1) or β-PIX-Flag and a scrambled siRNA. After a 30 min Ang II stimulation, cells were fixed and incubated with Alexa-488 phalloidin for 1h, a polyclonal anti-Flag antibody, and then, with a secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-568. Confocal images were acquired using a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss).

**Migration assay.** Transfected HEK293 cells were serum starved overnight and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8 μm pore collagen coated membranes). 1h after plating, cells were stimulated with Ang II (100 nM) or left untreated. After 4h, cells were fixed using paraformaldehyde (4%) for 20 min and incubated with crystal violet (0.1% in 20% MeOH: overnight). Membranes were washed 5 times in dH<sub>2</sub>O and cells were removed from the upper chamber leaving those that migrated through the membrane to the lower chamber. Pictures of 5 different fields were taken, and the average number of migrating cells was determined for each condition.

***β-PIX membrane recruitment.*** HEK 293 cells stably expressing the AT<sub>1</sub>R-HA were transfected with ARF6 siRNA(#1) or a scrambled one, and stimulated with Ang II (1μM) for 30 min after over night serum starving, or left untreated. Cells were then harvested in 300 μl of PBS buffer (pH 7.4; 2.5 mM KCl; 150 mM NaCl; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) containing protease inhibitors. Cell membranes were disrupted passing 3 times through the needle of a tuberculine syringe. Cell lysates were then centrifuged for 10 min at 500 g to discard the nucleus and cellular debris and the supernatants were further ultracentrifuged at 100,000 g (30 min, 4°C), in order to separate cytosolic and membrane fractions. Membranes pellets were then lysed for 10 min in 100 μl of ice-cold TGH buffer. Lysates were boiled for 5 min in SDS sample buffer 2X and migrated on a 12% polyacrylamide. Proteins were detected by immunoblot analysis using specific antibodies (polyclonal anti-ARF6, polyclonal anti-β-PIX (Chemicon)). Quantification of the data was performed using Image Quant v5.2.

***Statistical analysis.*** Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test or by a Student t test using GraphPad Prism (4.0a).

## II.4. RESULTS

### ***Ang II stimulation promotes the activation of endogenous ARF6 and Rac1 in HEK 293 cells.***

To delineate the molecular mechanisms by which the AT<sub>1</sub>R, a G protein-coupled receptor, promotes cytoskeleton reorganization, we examined the activation profile of ARF6 and Rac1 following agonist stimulation of HEK 293 cells stably expressing this receptor. Activation of endogenous ARF6 is rapid and transient with maximal levels of ARF6-GTP detected after 2 min of agonist-stimulation (Fig 1). Consistently, we observed that the amount of ARF6-GTP was significantly lower after 60 min of Ang II stimulation as compared to that observed in unstimulated cells (0 min). Conversely, the activation of endogenous Rac1 was much slower than ARF6. GTP loading of Rac1 was found to increase gradually with time. Maximal activation was observed after 60 min of agonist-treatment (Fig. 1) and remained stable for at least 3 hours (data not shown). Overexpression of Rac1-myc (1.6 fold/endogenous) markedly altered its kinetic of activation. In these conditions, GTP-binding on Rac1-myc was maximal 2 min after Ang II stimulation and remained sustained for at least 60 min. In addition, Rac1 overexpression led to an increased fold activation of Rac1 following Ang II stimulation (4 fold/basal compared to 1.5 fold/basal for endogenous proteins) (supplemental material Fig 1). In contrast, overexpression of ARF6 had no effect on its activation profile (data not shown). Previous studies have suggested a role for ARF6 in regulating Rac1 activity (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Radhakrishna *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). In an attempt to determine if, in our model system, ARF6 is required for Rac1 activation, we initially investigated whether ARF6 and Rac can associate in an agonist-dependent fashion.

### ***Ang II stimulation promotes the association of ARF6 and Rac1 in HEK 293 cells.***

The molecular mechanisms by which ARF6 regulates Rac1 activity following stimulation of a GPCR remain unclear. A previous study has reported the co-

localization of ARF6 and Rac1 in a perinuclear recycling compartment in HeLa cells and the subsequent translocation of both GTPases to the plasma membrane in response to aluminium fluoride treatment (Radhakrishna *et al.*, 1999), suggesting a G protein-dependent relocalization of ARF6 and Rac1. We therefore sought to examine the localization of both small GTP-binding proteins before and after Ang II treatment in our AT<sub>1</sub>R expressing HEK 293 cells. In order to perform these experiments, we coexpressed ARF6-HA together with Rac1-myc and examined their distribution using confocal microscopy. Before agonist-stimulation, both monomeric G proteins were present at the plasma membrane co-localized with actin. Upon Ang II-treatment, remodeling of the actin cytoskeleton was observed; activation of the AT<sub>1</sub>R led to the formation of membrane protrusions and ruffles, which appeared between 10 and 15 min following Ang II treatment. Sixty min after treatment, both GTPases remained present at the site of ruffling. Co-localization of ARF6 and Rac1 in these protrusions is consistent with a potential role for these GTPases in this Ang II-dependent remodeling event (Fig. 2A).

Using co-immunoprecipitation experiments, we subsequently investigated whether endogenous ARF6 and Rac1 could be found in complex upon agonist stimulation. Figures 2B and C illustrate that stimulation of the AT<sub>1</sub>R promotes the transient association of ARF6 and Rac1 in a time-dependent fashion, with maximal association being observed after 15 min of agonist treatment. Quantification of the data reveals that agonist stimulation promotes a 3.3 fold enhancement of ARF6/Rac1 complex formation (Fig. 2C). In addition, the association of the two GTPases could also be observed when endogenous Rac1 was immunoprecipitated. In these conditions, the maximal association between Rac1 and ARF6 also occurred after 15 min of Ang II treatment (supplemental material Fig 2).

***The association between ARF6 and Rac1 is direct and dependent upon the activation state of both proteins.***

It is likely that, in cells, the formation of a complex between ARF6 and Rac1 is highly regulated by the recruitment of regulatory/scaffold proteins such as exchange factors and/or GTPase-activating proteins. However, the possibility exists that the two small G proteins directly interact following GPCR activation. The ability of ARF6 to bind directly to Rac1 was assessed in vitro using purified proteins. Pull down assays revealed a direct, and specific interaction between GST-Rac1 and ARF6 (Fig. 3A). In contrast, GST-RhoA and GST-Cdc42 did not bind purified ARF6. To our knowledge, these experiments represent the first demonstration of a direct interaction between two small GTP-binding proteins. Since ARF6 and Rac1 both cycle between an inactive (GDP) and an active (GTP) state, we next examined the nucleotide specificity of ARF6/Rac1 complex formation. Preloading GST-Rac1 with GTP $\gamma$ S markedly impaired its ability to interact with soluble ARF6, suggesting that ARF6 binds the inactive (GDP-bound) form of Rac1 (Fig. 3B). Conversely, preloading recombinant ARF6 with GTP $\gamma$ S increased its ability to interact with Rac1, suggesting that the activated form of ARF6 binds preferentially to Rac1 (Fig. 3C). To further characterize the specificity of this interaction, we examined whether GST-Rac1 could also directly bind ARF1, another ARF isoform. As depicted in figure 3D, Rac1 can also directly bind ARF1 in a GST pull down assay. However, the interaction of the two small GTPases does not appear to be dependent upon the nature of the nucleotide bound to ARF1. Several groups have identified interacting partners common to both ARF6 and Rac1 (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Di Cesare *et al.*, 2000; Tarricone *et al.*, 2001) and have proposed models for cross-talk between these two small GTPases. Our findings raise the possibility of an alternative mechanism whereby ARF6 could influence the activity of Rac1; via direct association.

To confirm that, in cells, activated ARF6 preferentially interacts with inactive Rac1, we also examined the ability of Rac1 and ARF6 mutants to co-immunoprecipitate. Consistent with the results obtained using purified proteins,

the fast cycling mutant of ARF6, ARF6 T<sup>157</sup>A, and the dominant negative form of Rac1, Rac1T<sup>17</sup>N, represented the strongest interacting partners (Fig. 3E). The observation that an association between wild type ARF6 and Rac1T<sup>17</sup>N could also be detected in these cells (Fig 3E) suggests the possibility that ARF6 is, at least in part, in an active conformation when expressed in HEK 293 cells.

***Depletion of ARF6 in HEK 293 cells leads to enhanced basal Rac1 activation.***

Several studies, using mutants mimicking the inactive or active states of ARF6, have been useful in demonstrating a role for this small G protein in Rac1 activation (Donaldson, 2003). However, a recent report has pointed out that ARF6 mutants, in particular ARF6T<sup>27</sup>N, which mimics the GDP-bound form of the GTPase, may not recapitulate the effects observed with endogenous inactive ARF6 proteins in a cellular setting (Macia *et al.*, 2004). To study the role endogenous ARF6 plays in regulating Rac1 activity following Ang II treatment, we used RNA interference (siRNA) strategies to silence the expression of ARF6 in our AT<sub>1</sub>R expressing HEK293 cells. Surprisingly, depletion of this small GTPase dramatically altered the pattern of basal Rac1 activation (Fig. 4). Transfection of siRNA directed against ARF6 led to a marked activation of Rac1 that was not further increased by a 60 min Ang II treatment, which we have shown results in maximal Rac1 activation. To verify that the increased Rac1 activity observed was a specific effect resulting from the depletion of ARF6, and therefore independent of the nature of the siRNA, we compared the effect of our siRNA to another one designed against a different portion of the ARF6 sequence (Hashimoto *et al.*, 2004) or an irrelevant protein (GAPDH). As illustrated in figure 4, depletion of ARF6 by a siRNA designed by Hashimoto *et al.* (2004) resulted in a similar increase of endogenous Rac1 activity. In contrast, transfection of an siRNA directed against GAPDH or a scrambled siRNA (data not shown) did not significantly affect ARF6 expression or basal Rac1 activation. These results support the

hypothesis that, in unstimulated cells, ARF6 is responsible for maintaining Rac1 in an inactive state.

***Depletion of ARF6 leads to spontaneous membrane ruffling of HEK 293 cells.***

The principal cellular event associated with Rac1 activation, in HEK 293 cells, is remodelling of cortical actin leading to membrane ruffling as shown in figure 2A. We thus compared the effects of Rac1 activation mediated by either, depletion of ARF6 or activation of the AT<sub>1</sub>R, on this cellular response. Stimulation of AT<sub>1</sub>R expressing HEK 293 cells with Ang II results in the formation of actin-rich membrane protrusions, which appear 10 to 15 min after agonist-treatment and remain present for at least 60 min (Fig. 5A). Transfection of ARF6 siRNA, which as shown in figure 4 leads to Rac1 activation, promotes agonist-independent membrane ruffling (Fig. 5B). This phenomenon can be observed as soon as 24h post-transfection. To confirm that this spontaneous ruffling is dependent upon Rac1 activation, we co-transfected the dominant negative form of Rac1 together with the ARF6 siRNA. Rac1T<sup>17</sup>N expression abolished the spontaneous membrane ruffling induced by ARF6-depletion (Fig. 5B). In these cells, membrane ruffling can be spontaneously initiated by the expression of a constitutively active mutant form of Rac1, Rac1Q<sup>61</sup>L-myc (Fig. 5C). The reorganization of cortical actin in ARF6-depleted cells was very similar to that observed in Ang II stimulated control cells. Indeed, in these two conditions, formation of protrusions as well as ruffles was observed. This is in contrast to actin remodeling induced by overexpression of Rac1Q<sup>61</sup>L, which results exclusively in membrane ruffle formation. These findings may suggest an impaired ability of the Rac1Q<sup>61</sup>L mutant to interact with its full range of effectors as compared to endogenous activated Rac1. The ability of both AT<sub>1</sub>R activation and ARF6 siRNA transfection to induce membrane ruffling suggests similar functional capabilities for Rac1 activated via these two different stimuli and demonstrates that modulating ARF6 expression levels has profound functional consequences in a cellular setting. In contrast, depletion of ARF1 did



not initiate spontaneous ruffling (Fig. 5D) or alter the Ang II-dependent ruffling response (supplemental material Fig. 3).

To determine whether this phenomenon can also be observed in other cell types, we depleted ARF6 from Hep2 cells, a cell line that we have previously used to study GPCR-mediated cytoskeletal reorganization (Cant and Pitcher, 2005). As depicted in figure 6, ruffling can be initiated by activation of transfected muscarinic M1 receptor (M1MR), but also by overexpression of Rac1Q<sup>61</sup>L (Fig. 6BC). As in HEK 293 cells, inhibition of ARF6 expression resulted in spontaneous membrane ruffling suggesting that the ability of endogenous ARF6 to inhibit endogenous Rac1 activity is not unique to HEK 293 cells (Fig. 6D). Similarly, spontaneous ruffling induced by ARF6-depletion was abolished when a dominant negative form of Rac1 was overexpressed (Fig. 6E). In these cells, the number of ruffling cells was proportional to the inhibition of ARF6 expression (Fig. 6FG).

***Remodelling of the actin cytoskeleton induced by ARF6-depletion promotes cell migration.***

The formation of actin-rich protrusions is one of the first steps required for cell migration. We therefore investigated the role of ARF6-mediated Rac1 activation in this important cellular process. We seeded HEK 293 cells into collagen-coated Boyden chambers and analyzed migratory phenotypes under different conditions. As illustrated in figure 7, Ang II stimulation resulted in a 2.1-fold increase of cell motility as previously reported (Barnes et al., 2005b). Notably, siRNA-mediated depletion of ARF6 also stimulated cell migration to a similar extent (2.1-fold). Agonist treatment had no additional effect on the migratory phenotype of ARF6-depleted cells. In contrast, depletion of ARF1 did not alter basal or Ang II-stimulated migration of HEK 293 cells. These results support the hypothesis that Rac1 activated, via ARF6 depletion or AT<sub>1</sub>R activation, is functionally equivalent. In addition, our findings highlight the importance of ARF6-mediated Rac1 activation in the process of GPCR-dependent cell migration. Expression of a constitutively active mutant form of Rac1 (RacQ<sup>61</sup>L-

myc), effective in promoting membrane ruffling, but not surface protrusion, had no effect on cell migration (data not shown). These results further suggest that RacQ<sup>61</sup>L expression is not functionally equivalent to activated endogenous Rac1.

***The Rac1 guanine-nucleotide exchange factor  $\beta$ -PIX is relocalized to the plasma membrane in ARF6-depleted cells.***

It is generally accepted that relocalization of small GTPases is necessary for their activation, although the mechanisms that control targeting of Rho GTPases in general are poorly understood. It was recently demonstrated that Rac1 binds directly to  $\beta$ -PIX (p21-activated kinases [PAK]-interacting exchange factor) and that this interaction is necessary and sufficient for Rac1 recruitment to membrane ruffles providing a model for the intracellular targeting and localized activation of Rac1 (ten Klooster *et al.*, 2006). To begin to address why Rac1 is found basally activated in ARF6-depleted cells, we examined the localization of the Rac/Cdc42 GEF  $\beta$ -PIX. As illustrated in figure 8A,  $\beta$ -PIX is present mainly in the cytosol when overexpressed in HEK 293 cells. Ang II stimulation promotes the relocalization of  $\beta$ -PIX to the membrane ruffles where it is found colocalized with actin. The agonist-dependent relocalization of  $\beta$ -PIX is consistent with a role for this protein in mediating GPCR-dependent Rac1 activation. In ARF6-depleted cells,  $\beta$ -PIX is found at the plasma membrane. Transfection of a control scrambled siRNA has no effect on the localization of  $\beta$ -PIX in basal and agonist stimulated conditions. Similar results can be obtained using a biochemical approach. Ang II treatment as well as depletion of ARF6 promotes the recruitment of  $\beta$ -PIX to the membrane fraction (Fig. 8D). That ARF6 depletion promotes membrane recruitment of  $\beta$ -PIX in a similar fashion to GPCR activation provides a potential explanation of how ARF6 depletion may regulate Rac1 activity.

## II.5. DISCUSSION

In this study, we show that stimulation of a G protein-coupled receptor (AT<sub>1</sub>R) leads to the activation of endogenous ARF6 and Rac1 in HEK 293 cells, promoting the formation of actin-rich membrane protrusions and cell migration. We also demonstrate that upon Ang II treatment, ARF6 and Rac1 are relocalized to the edge of the membrane protrusions, where they transiently associate. In vitro assays suggest that this interaction can be direct and is regulated by the nature of the nucleotide bound to both ARF6 and Rac1. Our experiments demonstrate that ARF6, when bound to GTP, preferentially interacts with Rac1-GDP suggesting that once Rac1 becomes loaded with GTP, the two small G proteins dissociate. In cells, it is likely that the signaling complex necessary to promote migration involves other signaling partners/regulators/effectors of both small GTPases. For example, we and others have shown that GIT proteins, characterized as ARF GAPs, and  $\beta$ -PIX proteins, a Rac GEF are tightly associated (Bagrodia *et al.*, 1999; Premont *et al.*, 2004). One would therefore expect these proteins to associate with ARF6 and Rac1 to promote signal transduction in a cellular context.

In our experiments, the maximal activation of endogenous ARF6 following Ang II stimulation occurs very rapidly (2 min) and can return to levels lower than basal in ruffling cells exposed to agonist for 60 min. These data suggest that under basal (unstimulated) conditions, a certain proportion of ARF6 is already GTP bound. Interestingly, activation of endogenous Rac1 is much slower (maximal at 60 min) and remains sustained for several hours. The activation profile of overexpressed Rac1, in contrast to ARF6, significantly differs from its endogenous counterpart, being much faster. This represents an important consideration when performing experiments with overexpressed proteins. For this reason, we have largely focused our effort on examining the role of endogenously expressed proteins. However, due to a lack of commercially available antibodies that recognize endogenous levels of these small GTPases by microscopy, we were unable to localize endogenous ARF6 and Rac1 in cells. To visualize their distribution, we had to express tagged

versions of the wild type proteins. In these conditions, both proteins were relocalized to the membrane ruffles upon Ang II treatment.

Stimulation of the AT<sub>1</sub>R not only promotes relocalization of the GTPases to the ruffling membrane but also their association. We have observed that 2 min after Ang II treatment, ARF6 and Rac1 co-immunoprecipitate. This interaction is transient and maximal at 15 min. At this specific time point, ARF6 has been maximally activated and Rac1 is in the process of being maximally activated. Using confocal microscopy, we were able to visualize morphological changes in the actin cytoskeleton after 2 min of agonist-stimulation, indicating that early after receptor activation, when ARF6 is maximally activated, specific proteins and signaling cascades are activated to initiate actin reorganization. In our cells, formation of membrane protrusions and ruffling appeared 10 to 15 min following Ang II treatment (depending on the cell) coinciding with the time of maximal ARF6/Rac1 association and suggesting that Rac1 does not need to be fully activated to induce this morphological effect. Although the peak of interaction was observed at 15 min, association of the two proteins to a level comparable to what is observed at 10, 30 and 60 min is sufficient to promote ruffling. Since the activation/inactivation process of ARF6 following stimulation of a G protein-coupled receptor involves a yet to be characterized complex cascade of events, we suspect that relocalization of proteins and the assembly of signaling complexes is important for the interaction of both small GTPases. This argument is supported by the findings of Fang and colleagues who showed that GTP hydrolysis is required for the ARF6-dependent membrane remodeling (Fang *et al.*, 2006).

Because ARF6 and Rac1 were found to associate in cells, we hypothesized that depletion of ARF6 would prevent the transmission of the signal that leads to activation of Rac1. Previous studies had demonstrated the coordinated action of ARF6 and Rac1 during the remodeling of the actin cytoskeleton through the use of wild type or mutant forms of these two GTPases (Radhakrishna *et al.*, 1999). Upon stimulation, ARF6 and Rac1 were

previously shown to act in concert to promote remodelling of actin (Boshans et al., 2000; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Radhakrishna et al., 1999; Zhang et al., 1999). Interestingly, our siRNA approach to study the role of endogenous ARF6 in regulating Rac1 activity has revealed a hitherto unsuspected role for ARF6: ARF6-dependent regulation of basal Rac1 activity. The use of RNA interference has allowed us to demonstrate that, in the two cell lines examined (HEK293 and Hep2), the presence of ARF6 is required to maintain Rac1 in an inactive state under basal conditions. Depletion of ARF6 led to activation of Rac1 that was as robust as that observed when stimulating the cells with Ang II.

The functional consequences of activating Rac1 via ARF6 depletion, or alternatively, AT<sub>1</sub>R stimulation, appear similar in that both resulted in membrane ruffling and migration of HEK 293 cells. We have demonstrated that increased Rac1 activity resulting from the depletion of ARF6 is responsible for this actin remodeling since expression of a dominant negative mutant form of Rac1 inhibits this process in ARF6-depleted cells. However, our data reveal the complex nature of ARF6-dependent Rac1 regulation. Overexpression of a mutant mimicking the activated form of Rac1 promotes membrane ruffling but does not induce the formation of actin-rich protrusions, observed when endogenous Rac1 is activated by the stimulus-independent (siARF6 RNA) and stimulus-dependent (AT<sub>1</sub>R activation) strategies. Notably, expression of the constitutively active Rac1 mutant does not promote cell migration while activation of Rac1 by agonist-stimulation or ARF6-depletion do. In addition, our data suggests that the interaction between ARF6 and Rac1 is specific and associated with distinct biological effects. ARF6 does not directly interact with other small GTPases of the Rho family (Cdc42 and RhoA). Its direct association with ARF1, although very interesting, does not appear to be important for the Ang II-dependent membrane ruffling and migration process of HEK 293 cells.

To gain a better understanding of why ARF6 depletion leads to Rac1 activation in HEK 293 cells, we examined the localization of the Rac1 GEF,  $\beta$ -

PIX. It was recently reported that the interaction with  $\beta$ -PIX was necessary and sufficient for Rac1 recruitment to membrane ruffles and to focal adhesions (ten Klooster *et al.*, 2006). We therefore hypothesized that the depletion of ARF6 might allow the relocalization of  $\beta$ -PIX to the plasma membrane, and the activation of Rac1. This is indeed what we observed. In ARF6-depleted cells,  $\beta$ -PIX is found mainly in the membrane ruffles. The molecular mechanism by which the endogenous expression of ARF6 prevents the translocation of  $\beta$ -PIX to the plasma membrane in normal conditions remains however to be defined. Figure 9 represents a model of the sequence of events that may occur in basal, Ang II-stimulated and ARF6-depleted cells. Before agonist-stimulation, ARF6 and Rac1 are largely found in a GDP-bound state because their exchange factors (ARNO and  $\beta$ -PIX) are mainly cytosolic. Stimulation of the AT<sub>1</sub>R results in the activation of ARF6, which we have previously suggested occurs via the agonist-dependent recruitment of a  $\beta$ arrestin/ARNO complex (Claing *et al.*, 2001a). This study indicates that ARF6-GTP can directly interact with Rac1-GDP and that Ang II-treatment ultimately leads to Rac1 activation and actin remodelling. We suspect that ARF6 could result in the activation of Rac1, via recruitment of its GEF  $\beta$ -PIX, which directly interacts with GIT1, an ARF GAP. In ARF6-depleted cells, we have observed that  $\beta$ -PIX is mainly localized to the plasma membrane and that Rac1 is mostly bound to GTP, resulting in cell ruffling and migration.

Taken together, our results suggest that changes in ARF6 expression may have important cellular consequences. ARF6 may exhibit differential effects in cells with variable basal levels of Rac1 activity. It is possible that non-invasive cells could acquire spontaneously a migratory phenotype when ARF6 expression is reduced, suggesting that ARF6-dependent regulation of Rac1 activity may be of pathological importance. However, in other cell types and experimental conditions, the function of endogenous ARF6 might be different. It was reported previously that ARF6 depletion blocks the invasive activity of breast cancer cells (Hashimoto *et al.*, 2004). In these cells, the signaling events

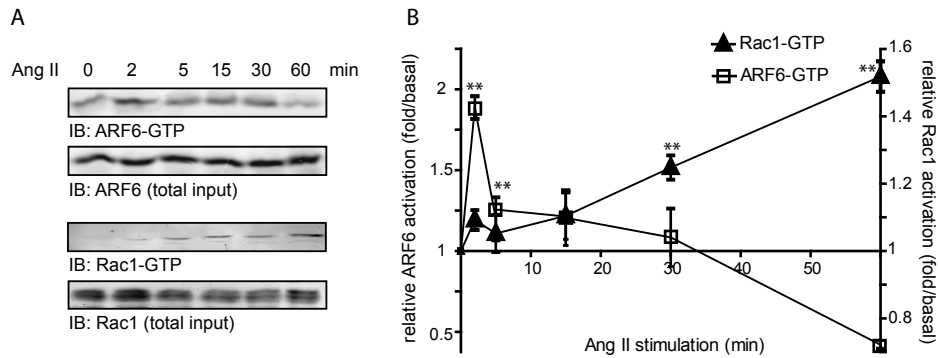
regulating ARF6 activity might involve different proteins and be regulated through distinct molecular mechanisms.

How exactly ARF6 functions in cells remains an important biological question. This GTPase is well known for its role in vesicle trafficking and remodeling of the membrane lipids (reviewed in (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006)). We have previously shown that depletion of ARF6 in AT<sub>1</sub>R-expressing HEK 293 cells leads to the inhibition of the endocytosis of a variety of G protein-coupled receptors, namely the ATR (Houndolo *et al.*, 2005). However, the spontaneous activation of Rac1 leading to membrane ruffling that we observed in ARF6-depleted cells is not linked to the agonist-promoted block of receptor internalization. Indeed, unstimulated, untransfected Hep2 cells still spontaneously ruffle when transfected with siRNA targeted against ARF6. In normal conditions, however, it is likely that the processes of endocytosis, lipid remodeling and actin rearrangement are intimately related to regulate agonist-promoted cellular responses.

Our data demonstrate that an imbalance between ARF6 and Rac1 activity/expression levels can have profound cellular consequences. A change in the expression or in the activation mechanisms of ARF6 may thus contribute to the development of new cell phenotype, which may lead to important pathological conditions.

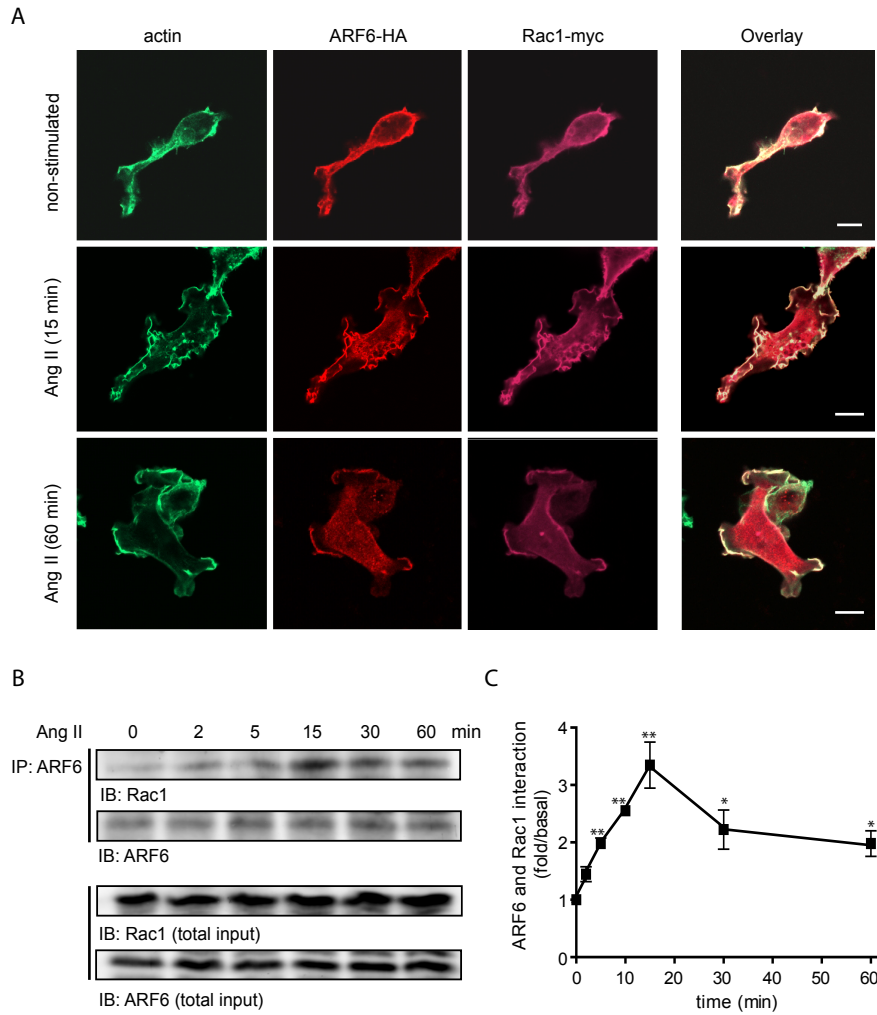
#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr S.A. Laporte (McGill University, Canada) for the use of his confocal microscope. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-53199 to AC. AC is a scholar of the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies and a member of the Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM). JAP is a Wellcome Senior Fellow.

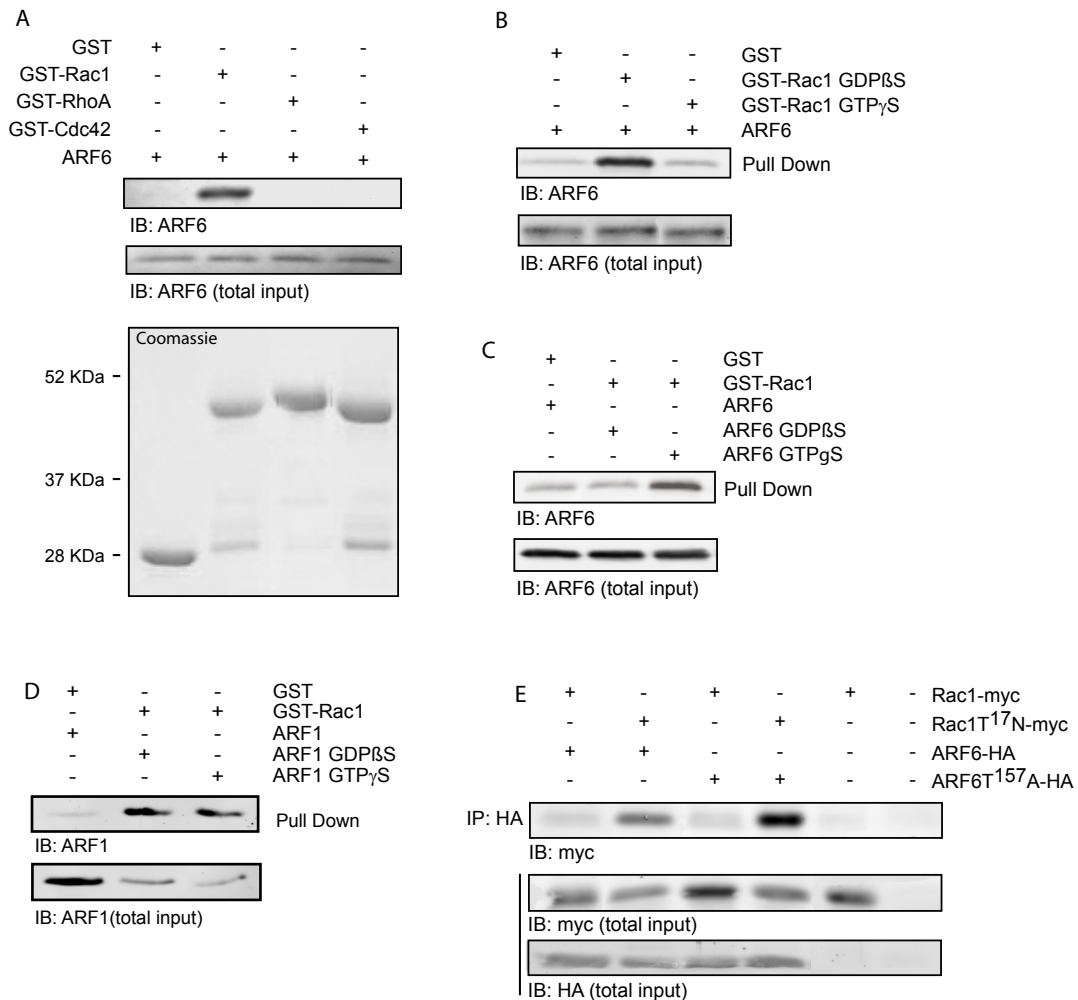


**Figure 1. Ang II promotes the activation of ARF6 and Rac1.** (A) HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were treated with Ang II for the indicated times. Cells were lysed and activated ARF6 and Rac1 captured using, respectively, GST-GGA3, and GST-PAK(CRIB) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Endogenous levels of activated ARF6 and Rac1 were subsequently detected by Western blotting. The levels of ARF6 and Rac1 in total cell lysates (3% of the GST pull down input) were similarly assessed. These results are representative of five independent experiments for each small GTP-binding protein. Quantification of these experimental results is shown in (B). Data (fold/basal) are the mean  $\pm$  S. E. M. of four independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ .

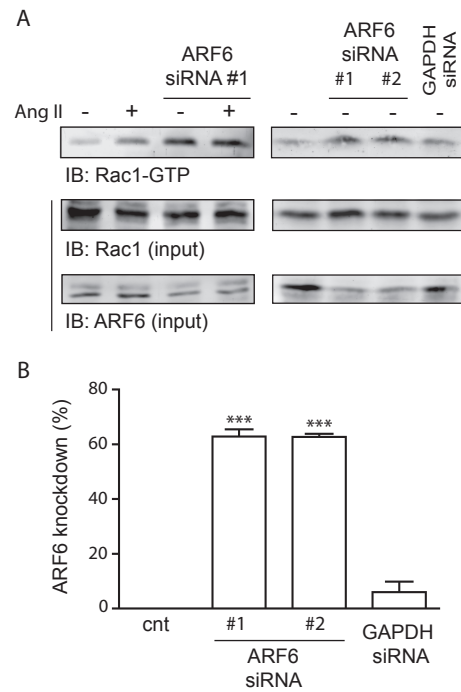




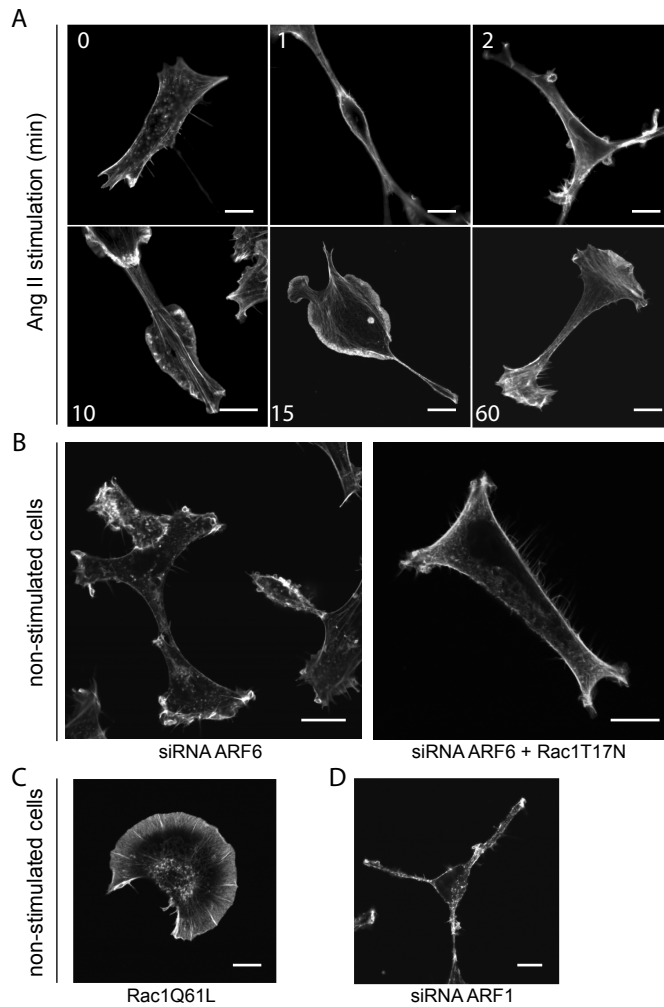
**Figure 2. AT1R-stimulation promotes the association of ARF6 and Rac1.** (A) HEK 293 cells stably expressing the AT1R-Flag were transiently transfected with Rac1-myc and ARF6-HA constructs. Cells were treated or not with Ang II (1 $\mu$ M), fixed and labelled for overexpressed proteins using anti-HA and myc specific antibodies. Primary labelling was visualized using secondary antibodies coupled, to Alexa-568 (anti-HA), and Alexa-633 (anti-myc). Finally, polymerized actin was visualized using Alexa-488 phalloidin. The scale bar represents 10  $\mu$ m. (B) HEK293 cells stably expressing AT1R-HA were stimulated with Ang II (1 $\mu$ M) for the indicated times and solubilized. Endogenous ARF6 was immunoprecipitated using a monoclonal anti-ARF6 antibody. Endogenous interacting Rac1 proteins were then detected by Western blot analysis, using a specific anti-Rac1 antibody. The ARF6 and Rac1 content of the total cell lysate (4% of the initial input) were also assessed. Quantification of the co-immunoprecipitation experiments is presented in panel (C). Data are the mean  $\pm$  S. E. M. of four independent experiments. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.



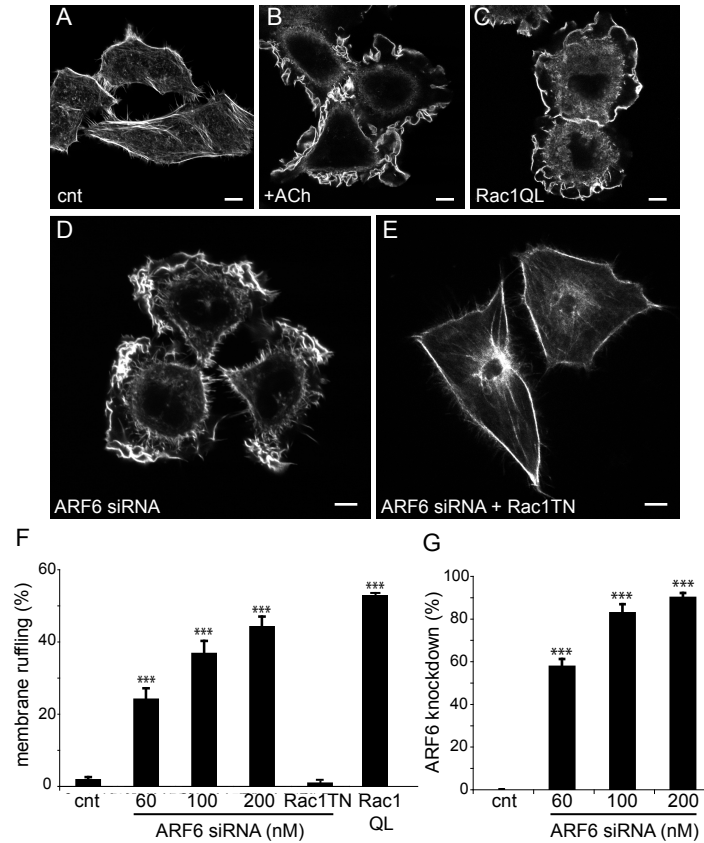
**Figure 3. Activated ARF6 binds directly to the GDP-bound form of Rac1.** (A) Equal amounts of GST, GST-Rac1( $\Delta$ CAAX), GST-RhoA or GST-Cdc42 fusion proteins (Coomassie staining) were incubated with purified ARF6. Using a GST Pull down assay, interacting ARF6 was precipitated and detected by Western blot analysis using a specific anti-ARF6 antibody. These results are representative of three independent experiments and total input represents 6% of the total protein present in the sample. (B) The GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) fusion protein coupled to glutathione-Sepharose 4B beads was preloaded with either GDP $\beta$ S or GTP $\gamma$ S. The nucleotide-bound proteins were incubated with purified ARF6. Interacting proteins were precipitated by a GST pull down assay, and amounts of associated ARF6 detected by Western blot analysis using a specific anti-ARF6 antibody. These results are representative of three independent experiments and the total input represents 6% of the total protein present in the sample. (C) GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads was incubated with GDP $\beta$ S- or GTP $\gamma$ S-bound purified ARF6. The GST-Rac1 was precipitated and interacting ARF6-GDP $\beta$ S or ARF6-GTP $\gamma$ S detected by Western blot analysis. These results are representative of four independent experiments. Total input represents 6% of the total protein present in the sample. (D) GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads was incubated with GDP $\beta$ S- or GTP $\gamma$ S-bound purified ARF1. The GST-Rac1 was precipitated and interacting ARF1-GDP $\beta$ S or ARF1-GTP $\gamma$ S detected by Western blot analysis. These results are representative of six independent experiments. Total input represents 30% of the total protein present in the sample. (E) HEK 293 cells stably expressing AT1R-Flag, were transfected with Rac1-myc or Rac1T<sup>17</sup>N-myc, and either ARF6-HA, ARF6T<sup>157</sup>A-HA or empty vector. Using an anti-HA antibody coupled to agarose beads, HA-tagged proteins were immunoprecipitated from the cell lysates, and interacting Rac1 (wild type and mutants) detected by Western blot analysis using an anti-myc antibody. These results are representative of five independent experiments and the total input represents 4% of the total protein present in the sample.



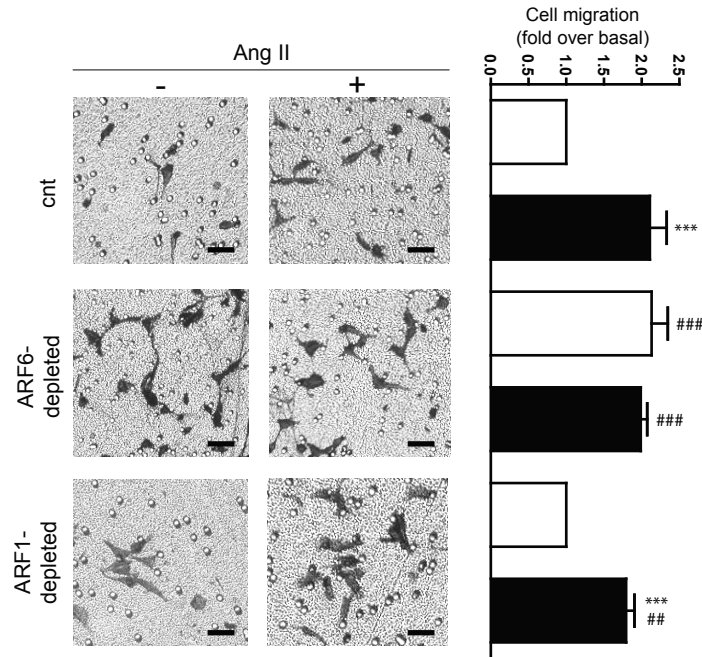
**Figure 4. Depletion of ARF6 increases basal Rac1 activation. (A)** HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were transiently transfected with siRNA targeting ARF6 (#1 or #2, 60 nM), or GAPDH (60 nM). Cells were treated with Ang II for 60 min, and activated Rac1 was captured using GST-PAK(CRIB) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Endogenous levels of activated and total Rac1/ARF6 (4% of total input) were detected by Western blotting using specific antibodies. These results are representative of three independent experiments. **(B)** Quantification of the inhibition of ARF6 expression by overexpression of ARF6 siRNA (#1 and #2), and GAPDH siRNA. Data are mean  $\pm$  S. E. M. for three to eight independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$ .



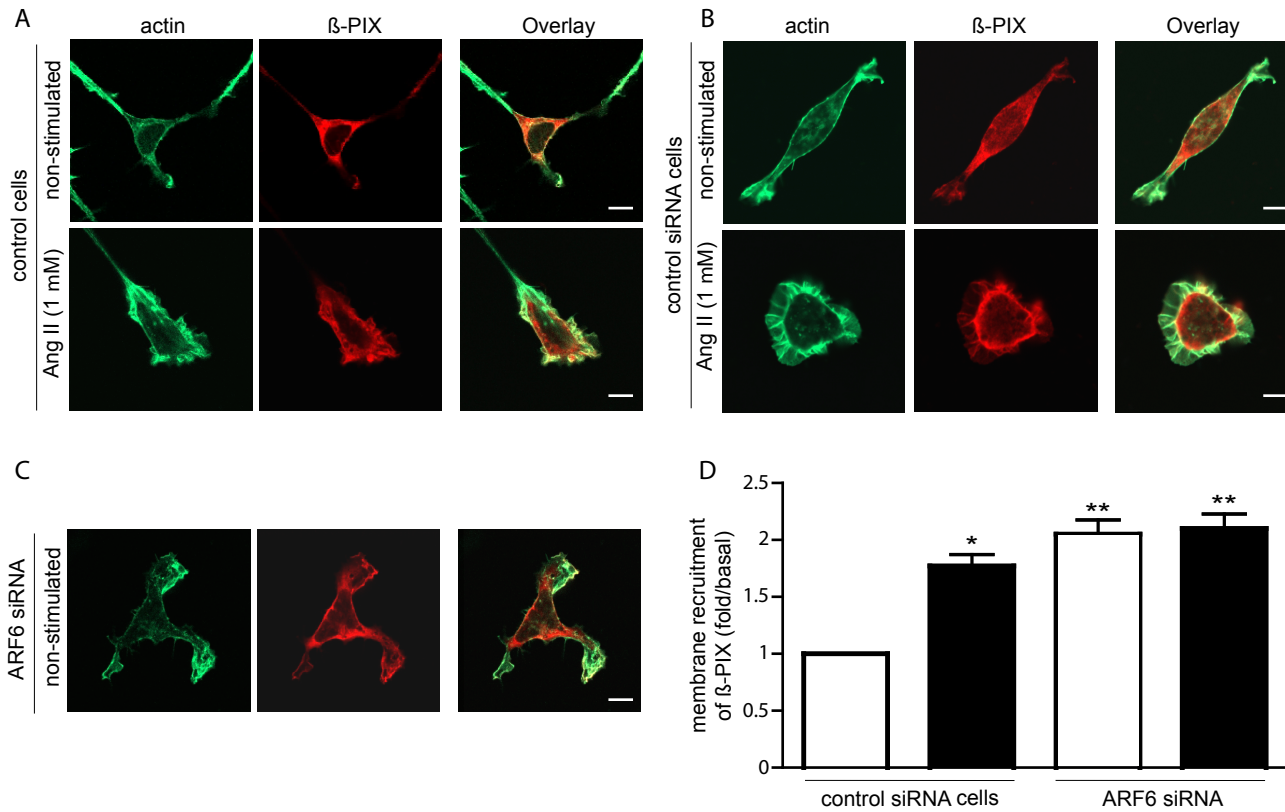
**Figure 5. Ang II stimulation or ARF6 depletion promotes membrane ruffling in HEK293 cells.** (A) Cells stably expressing the HA-AT1R were stimulated with Ang II for the indicated times, fixed and stained for the distribution of actin using Phalloidin coupled to Alexa-488. (B) HA-AT1R stably expressing cells were transfected with siRNA directed against ARF6 (#1, 60 nM), or with both the siRNA for ARF6 and the inactive form of Rac1 (T<sup>17</sup>N) and staining of actin was performed as in (A). (C, D) Cells were transfected with a constitutively active mutant form of Rac1 (Q<sup>61</sup>L) (C) or an siRNA directed against ARF1 (25 nM) (D) and actin staining was performed as in (A and B). The scale bar represents 10 μm. This figure is representative of more than 30 cells observed in three to six independent experiments.



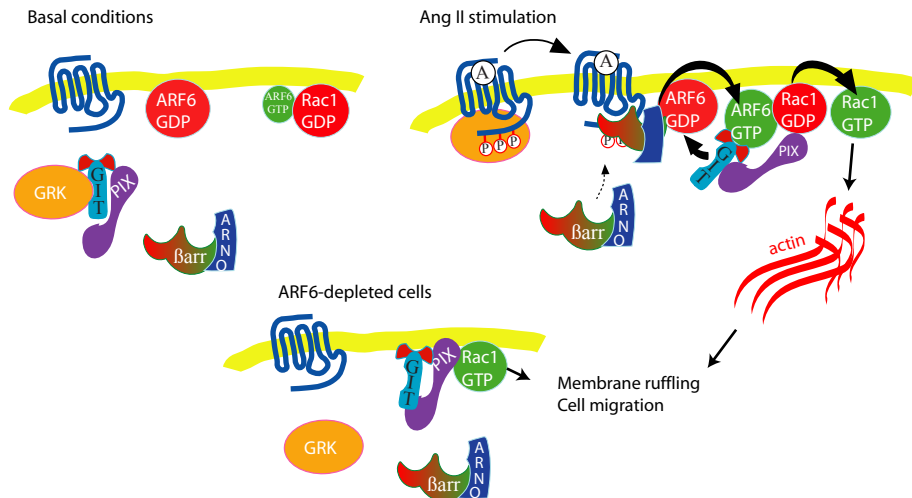
**Figure 6. Ang II stimulation or ARF6 depletion promotes membrane ruffling in Hep2 cells.** (A, B) Hep2 cells expressing the M1MR were left untreated (A) or stimulated with ACh for 10 min (B), fixed and stained for the distribution of actin using Phalloidin coupled to Alexa-488. (C) Hep2 cells were transfected with Rac1 (Q61L)-myc and staining of actin was assessed as in (A, B). (D, E) Hep 2 cells were transfected with siRNA directed against ARF6 (#1, 200 nM) (D), or with both the siRNA for ARF6 and the inactive form of Rac1(T<sup>17</sup>N)-myc (E). Staining of actin was performed as described above. The scale bar represents 10  $\mu$ m. This figure is representative of more than 30 cells observed in three to six independent experiments. (F) Data (% of ruffling cells) are presented as mean  $\pm$  S. E. M. for three to six independent experiments. Rac<sup>T21</sup>N-myc was overexpressed in cells transfected with 200 nM of ARF6 siRNA. These data are the mean  $\pm$  S. E. M. of three independent experiments. (G) Quantification of the inhibition of ARF6 expression by overexpression of ARF6si RNA. Data are mean  $\pm$  S. E. M. for three independent experiments. \*\*\* P < 0.001.



**Figure 7. Ang II stimulation or depletion of ARF6 promotes HEK 293 cell migration.** Cells stably expressing the HA-AT1R were transiently transfected with either empty vector, siRNA directed against ARF6 (#1) or ARF1 siRNA. Cells were trypsinized and equal cell numbers were reseeded into Boyden chambers, and left for 1h. One set of cells was then stimulated with Ang II while the second set was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. The left panels are representative of pictures taken from each set of data. The scale bar represents 50  $\mu$ m. The right panel shows the results of the cell migration assay  $\pm$  S. E. M. for three to five independent experiments performed in duplicate. Statistical analysis was performed using a Bonferroni's multiple comparison test, where \*\*\*  $P < 0.001$  are values compared to its paired unstimulated conditions. ###  $P < 0.001$ , ##  $P < 0.01$  are values compared to the control (non-stimulated) condition of cells expressing normal levels of endogenous ARF6 and ARF1.

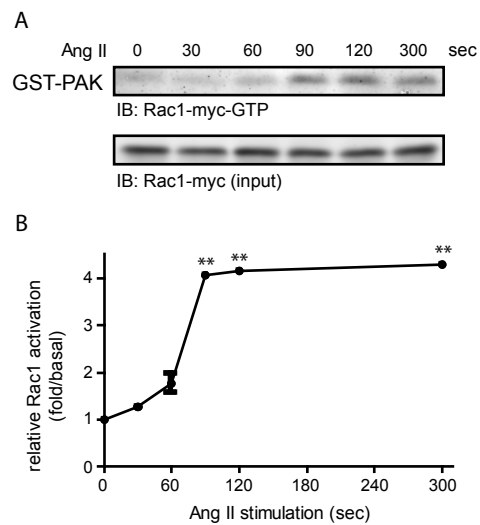


**Figure 8.  $\beta$ -PIX is localized to the plasma membrane in ARF6-depleted cells.** (A, B, C) Cells stably expressing the HA-AT1R were transfected with Flag- $\beta$ -PIX (A), Flag- $\beta$ -PIX and a control scrambled siRNA (60 nM) (B) or with Flag- $\beta$ -PIX and ARF6 siRNA (#1, 60 nM) (C). Cells were stimulated with Ang II for 0 or 30 min, fixed and stained for the distribution of actin, using Phalloidin coupled to Alexa-488, and  $\beta$ -PIX, using a specific anti-Flag polyclonal antibody and a secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-568. This figure is representative of more than 20 cells observed in four independent experiments. (D) HEK 293 cells stably expressing the HA-AT1R were transfected with Flag- $\beta$ -PIX and a control scrambled siRNA (60 nM) or with Flag- $\beta$ -PIX and our ARF6 siRNA (#1, 60 nM). Cells were left untreated (open bars) or stimulated with Ang II (30 min) (filled bars). Membrane fractions were prepared and amounts of associated  $\beta$ -PIX protein was assessed by Western blotting using an anti- $\beta$ -PIX antibody. Results represent the mean  $\pm$  S. E. M. of four independent experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

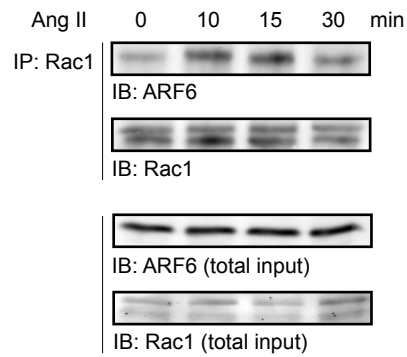


**Figure 9. Schematic diagram depicting a potential role for ARF6 and Rac1 in Ang II-stimulated membrane ruffling and cell migration.** Under basal conditions, ARF6 and Rac1 are mainly found in their inactive state, associated with the plasma membrane. β-PIX, the Rac/Cdc42 guanine-nucleotide exchange factor is mostly present in the cytosol. Upon AT1R stimulation, ARF6 and Rac1 are subsequently activated, and transiently associate to promote remodeling of the actin cytoskeleton leading to membrane ruffling and cell migration. To allow the loading of GTP on Rac1, β-PIX is relocalized to the plasma membrane. In ARF6-depleted cells, β-PIX is found principally at the plasma membrane and Rac1 is largely GTP bound. This results in spontaneous ruffling and migration of these cells.

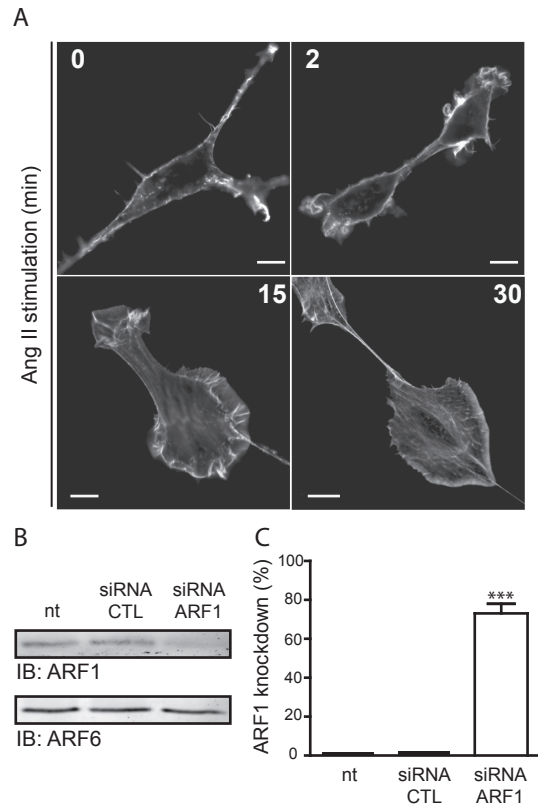




**Supplemental material Figure 1. Ang II promotes the activation of overexpressed Rac1.** (A) HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were transiently transfected with Rac1-myc, and treated with Ang II for the indicated times. Cells were lysed and activated Rac1 captured using GST-PAK(CRIB) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Levels of activated Rac1 were subsequently detected by Western blotting using anti-myc antibodies. (B) Data are expressed as mean  $\pm$  S. E. M. (fold/basal) of four independent experiments. \*\* P < 0.01.



**Supplemental material Figure 2. AT1R-stimulation promotes Rac1 and ARF6 complex formation.** HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were stimulated with Ang II (1 $\mu$ M) for the indicated times and solubilized. Endogenous Rac1 was immunoprecipitated using the polyclonal anti-Rac1 antibody and endogenous interacting ARF6 proteins were then detected by Western blot analysis, using a specific anti-ARF6 antibody. The Rac1 and ARF6 content of the total cell lysate (4% of the initial input) were also assessed. Data are representative of four independent experiments.



**Supplemental material Figure 3. Depletion of ARF1 does not affect basal or Ang II stimulated membrane ruffling in HEK 293 cells. (A)** Cells stably expressing the HA-AT1R were transfected with ARF1 siRNA (25 nM). Cells were stimulated with Ang II for the indicated times, fixed and stained for the distribution of actin using Phalloidin coupled to Alexa-488. The scale bar represents 10  $\mu$ m. This figure is representative of more than 30 cells observed in four independent experiments.

**(B)** Western blots depicting the expression of endogenous ARF1 in non-transfected, control scrambled siRNA (25 nM), and ARF1 directed siRNA (25 nM) transfected HA-AT1R cells. **(C)** ARF1 knockdown is presented as mean  $\pm$  S. E. M. (fold/basal) of five independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$ .

## II.7. REFERENCES

**Albertinazzi, C., Za, L., Paris, S. and de Curtis, I.** (2003). ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* **14**, 1295-307.

**Austin, C., Boehm, M. and Tooze, S. A.** (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* **41**, 4669-77.

**Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. and Cerione, R. A.** (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* **274**, 22393-400.

**Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J.** (2005).  $\beta$ -Arrestin 1 and G $\alpha$ q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-8050.

**Berk, B. C.** (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* **81**, 999-1030.

**Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C.** (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* **20**, 3685-94.

**Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. and Donaldson, J. G.** (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* **154**, 1007-17.

**Cant, S. H. and Pitcher, J. A.** (2005). G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **16**, 3088-99.

**Chaki, S. and Inagami, T.** (1992). A newly found angiotensin II receptor subtype mediates cyclic GMP formation in differentiated Neuro-2A cells. *Eur J Pharmacol* **225**, 355-6.

**Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. and Chabre, M.** (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-4.

**Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J.** (2001).  $\beta$ -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and  $\beta$ 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 42509-13.

**D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L.** (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J* **16**, 5445-54.

**D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-58.

**de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T.** (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415-72.

- de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K. J., Chiu, A. T., Drew, M., Goodfriend, T., Harding, J. W., Inagami, T. and Timmermans, P. B.** (1995). Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**, 924-7.
- Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I.** (2000). p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol* **2**, 521-30.
- Donaldson, J. G.** (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.
- Donaldson, J. G. and Jackson, C. L.** (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 475-82.
- Dulac, C. and Axel, R.** (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206.
- Elferink, J. G. and de Koster, B. M.** (1997). The stimulation of human neutrophil migration by angiotensin II: its dependence on Ca<sup>2+</sup> and the involvement of cyclic GMP. *Br J Pharmacol* **121**, 643-8.
- Fang, Z., Miao, Y., Ding, X., Deng, H., Liu, S., Wang, F., Zhou, R., Watson, C., Fu, C., Hu, Q. et al.** (2006). Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1437-49.
- Fessart, D., Simaan, M. and Laporte, S. A.** (2005). c-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with  $\beta$ -Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin-Mediated Internalization. *Mol Endocrinol* **19**, 491-503.
- Franco, M., Peters, P. J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J* **18**, 1480-91.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S. H. and Casanova, J. E.** (1998a). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem* **273**, 23-7.
- Frank, S. R., Hatfield, J. C. and Casanova, J. E.** (1998b). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell* **9**, 3133-46.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. and Schioth, H. B.** (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-72.
- Garrett, M. D., Major, G. N., Totty, N. and Hall, A.** (1991). Purification and N-terminal sequence of the p21rho GTPase-activating protein, rho GAP. *Biochem J* **276** ( Pt 3), 833-6.
- Garrett, M. D., Self, A. J., van Oers, C. and Hall, A.** (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* **264**, 10-3.
- Gether, U.** (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.
- Geyer, M. and Wittinghofer, A.** (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 786-92.
- Gloriam, D. E., Fredriksson, R. and Schioth, H. B.** (2007). The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **8**, 338.

- Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-48.
- Graf, K., Neuss, M., Stawowy, P., Hsueh, W. A., Fleck, E. and Law, R. E.** (2000). Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension* **35**, 978-84.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A. and Sabe, H.** (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6647-52.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. et al.** (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-32.
- Houndolo, T., Boulay, P. L. and Claing, A.** (2005). G Protein-coupled Receptor Endocytosis in ADP-ribosylation Factor 6-depleted Cells. *J Biol Chem* **280**, 5598-5604.
- Hur, E. M. and Kim, K. T.** (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**, 397-405.
- Ishii, M. and Kurachi, Y.** (2003). Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci* **74**, 163-71.
- Iwai, N. and Inagami, T.** (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* **298**, 257-60.
- Jackson, C. L. and Casanova, J. E.** (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-7.
- Kim, S. and Iwao, H.** (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* **52**, 11-34.
- Klabunde, T. and Hessler, G.** (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* **3**, 928-44.
- Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**, 9-18.
- Lander, E. S. Linton, L. M. Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Langille, S. E., Patki, V., Klarlund, J. K., Buxton, J. M., Holik, J. J., Chawla, A., Corvera, S. and Czech, M. P.** (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* **274**, 27099-104.
- Lu, Z. L., Saldanha, J. W. and Hulme, E. C.** (2002). Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 140-6.
- Lucius, R., Gallinat, S., Busche, S., Rosenstiel, P. and Unger, T.** (1999). Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol Life Sci* **56**, 1008-19.
- Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P. and Franco, M.** (2004). The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**, 2389-98.
- Meloche, S., Landry, J., Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Giasson, E.** (2000). p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H741-51.

- Moon, S. Y. and Zheng, Y.** (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.
- Morii, N., Kawano, K., Sekine, A., Yamada, T. and Narumiya, S.** (1991). Purification of GTPase-activating protein specific for the rho gene products. *J Biol Chem* **266**, 7646-50.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J.** (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**, 24539-42.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E.** (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-6.
- Nadal, J. A., Scicli, G. M., Carbini, L. A. and Scicli, A. G.** (2002). Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H739-48.
- Ni, W., Kitamoto, S., Ishibashi, M., Usui, M., Inoue, S., Hiasa, K., Zhao, Q., Nishida, K., Takeshita, A. and Egashira, K.** (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 534-9.
- Nishiya, N., Kiosses, W. B., Han, J. and Ginsberg, M. H.** (2005). An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol* **7**, 343-52.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Olofsson, B.** (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 545-54.
- Palacios, F. and D'Souza-Schorey, C.** (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J Biol Chem* **278**, 17395-400.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G. and D'Souza-Schorey, C.** (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J* **20**, 4973-86.
- Phillips, M. I. and Kagiya, S.** (2002). Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 569-77.
- Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. and Claing, A.** (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**, 1001-11.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. and Donaldson, J. G.** (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* **112** ( Pt 6), 855-66.
- Riaz, A. A., Wang, Y., Schramm, R., Sato, T., Menger, M. D., Jeppsson, B. and Thorlacius, H.** (2004). Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. *Faseb J* **18**, 881-3.

**Ridley, A. J. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.

**Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10.

**Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J. and Ellis, C.** (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J* **12**, 5151-60.

**Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J.** (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80.

**Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J. J. and Egido, J.** (2001). Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* **38**, 1382-7.

**Sadoshima, J.** (1998). Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **82**, 1352-5.

**Santy, L. C. and Casanova, J. E.** (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol* **154**, 599-610.

**Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T.** (1991). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**, 230-3.

**Schmidt, A. and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.

**Schmitz, U., Thommes, K., Beier, I., Wagner, W., Sachinidis, A., Dusing, R. and Vetter, H.** (2001). Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* **276**, 22003-10.

**Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M. and Egido, J.** (2000). Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. *J Nephrol* **13 Suppl 3**, S101-10.

**Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V. and Egido, J.** (2003). Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 881-900.

**Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., Hall, K. L., Miller-Wing, A. V., Stobb, J. W., Cook, V. I., Harding, E. C. et al.** (1992). Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* **40**, 409-19.

**Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.

**Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. and Nakayama, K.** (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J* **365**, 369-78.

**Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J.** (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-9.



- ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. and Hordijk, P. L.** (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**, 759-69.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L.** (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-72.
- Trumpp-Kallmeyer, S., Chini, B., Mouillac, B., Barberis, C., Hoflack, J. and Hibert, M.** (1995). Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv* **70**, 255-62.
- Tsao, P., Cao, T. and von Zastrow, M.** (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 91-6.
- Weinstock, J. V., Blum, A. M. and Kassab, J. T.** (1987). Angiotensin II is chemotactic for a T-cell subset which can express migration inhibition factor activity in murine schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol* **107**, 180-7.
- Yin, H. L. and Janmey, P. A.** (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.
- Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. and Greenberg, S.** (1999). ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* **19**, 8158-68.

**ANNEXE II  
ACCORD DES COAUTEURS / COAUTHORS AGREEMENT**

**1. Identification de l'étudiant et du programme / *student and program***

Mathieu Cotton  
PhD pharmacologie, 3-520-1-0

**2. Description de l'article / *article description***

**Mathieu Cotton**, Pierre-Luc Boulay, Tanguy Houndolo, Nicolas Vitale, Julie A Pitcher and Audrey Claing.  
Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration.  
Molecular Biology of the Cell. 2007 Feb;18(2):501-11.

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant / *declaration of all coauthors***

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Mathieu Cotton inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Étude des mécanismes moléculaires menant à la migration cellulaire associée à Rac1 et ARF6 ».

*As a coauthor of the article mentioned above, I agree with the fact that Mathieu Cotton includes this article in PhD thesis entitled "study of the molecular mechanisms leading to Rac1- and ARF6-mediated cell migration".*

Coauteur	Signature	Date
Pierre-Luc Boulay		
Tanguy Houndolo		
Nicolas Vitale		
Julie A Pitcher		
Audrey Caing		

## **CHAPITRE III: $\beta$ arrestin mediate ARF6 and Rac1 activation to promote AngII-dependent membrane ruffling**

Mathieu Cotton, Ricardo Charles and Audrey Claing\*  
Department of Pharmacology, University of Montreal, Canada

\* corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, P.O. box 6128, downtown station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

(article en préparation pour the Journal of Biological Chemistry)

### **Contribution des auteurs:**

**MC:** réalisation des expériences, conceptualisation du projet et écriture.

**RC :** réalisation des expériences préliminaires quant à l'interaction entre Rac1 et arrestine.

**AC :** conceptualisation du projet et écriture

Keywords : G protein-coupled receptors, arrestin, ADP-ribosylation factor, Rac, p38, ruffling.

**ABSTRACT**

Stimulated G protein coupled receptors (GPCR) initiate the activation of intracellular signalling cascades, which lead to a wide range a physiological responses such as the process of cell migration. Our previous work has demonstrated the importance of the ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) as well as Rac1, two small GTP-binding proteins, in the angiotensin II (AngII) dependent remodelling of the actin cytoskeleton. In this study, we describe the molecular mechanisms by which the Ang II receptor (ATR) promotes the activation of ARF6, leading to the regulation of Rac1 activity and the formation of dynamic plasma membrane ruffles. First, we show that  $\beta$ arrestin proteins, that act to control receptor desensitization but also initiate signal transduction, are necessary for Ang II dependent activation of ARF6 and Rac1. As previously shown for the  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR), stimulation of the ATR leads to the formation of a complex including  $\beta$ arrestin proteins and ARF6. In this study, we demonstrate that  $\beta$ arrestins can also interact with endogenously expressed Rac1 in an agonist dependent fashion, and that this interaction can be direct. Because  $\beta$ arrestins associate with both GTPases, our data demonstrate that depletion of either isoforms markedly reduce the ability of Rac1 and ARF6 to interact following Ang II treatment. In addition, we provide evidence that the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) p38 is also important for the activation process of ARF6 and Rac1. Inhibition of p38 phosphorylation impairs the ability of ARF6, but not Rac1 to interact with the  $\beta$ arrestin proteins, as well as the formation of the ARF6/Rac1 complex. Altogether, our findings provide a molecular mechanism by which small GTP-binding proteins can be activated by GPCRs.

### III.1. INTRODUCTION.

Angiotensin II (Ang II) is a peptidic hormone that act through G protein coupled receptors to promote different biological responses such as vasoconstriction, mitogenic effects but also remodelling of the actin cytoskeleton leading to cell migration (Hunton et al., 2005; Touyz and Schiffrin, 2000). Cytoskeleton reorganization is mainly driven by small GTP binding proteins of the Rho family, which include Rho, Cdc42 and Rac. These are respectively responsible for stress fibres formation, filopodia elongation and membrane ruffling initiation (Hall, 1998). As every GTPases, they have the ability to continuously cycle between two states: one activated, bound to GTP, and another inactivated, bound to GDP. Activation is facilitated by specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyses replacement of GDP by a GTP nucleotide. Deactivation is controlled by GTPase activating proteins (GAPs) which promote GTP hydrolysis (Heasman and Ridley, 2008). The ADP-ribosylation factors (ARFs) are also monomeric G protein, which play a major role in cytoskeleton remodelling. In addition, they are involved in vesicle trafficking as well as remodelling of membrane lipids (Donaldson, 2003). Recently, our group has shown that Rac1 and ARF6, by interacting directly and being subsequently activated following Ang II stimulation, tightly control HEK 293 cell migration (Cotton et al., 2007b).

Like most GPCRs, sustained activation of Ang II type 1 receptor (ATR) leads to the recruitment of  $\beta$ arrestin proteins and therefore receptor desensitization.  $\beta$ arrestin 1 and  $\beta$ arrestin 2 are expressed ubiquitously and act as signalling adaptors linking receptors to multiple downstream effectors. In addition to regulating GPCR endocytosis (Moore et al., 2007) (Claing et al., 2002), both  $\beta$ arrestin isoforms are required for proper initiation of cell migration. Fong and colleagues have reported that T and B cells, from  $\beta$ arrestin 2 deficient mice, were no longer able to migrate following CXCL12 stimulation (Fong et al., 2002). Moreover, chemotaxis responses induced by CXCR4 was shown to be dependent on  $\beta$ arrestin 2 via a mechanism involving the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) p38 (Lagane et al., 2008; Sun et al., 2002).

Alternatively, migration associated with Protease Activated Receptor-2 (PAR-2) activation can be blocked by the depletion of both  $\beta$ arrestin isoforms, which prevents the activation of Erk and LIM Kinase (Ge et al., 2004; Zoudilova et al., 2007). Previous studies have demonstrated that  $\beta$ arrestin 1, in concert with  $G_{\alpha q}$ , is important for the regulation of RhoA activity and the formation of stress fibers following Ang II stimulation (Barnes et al., 2005b). Furthermore, the Ang II dependent migration of HEK 293 cells was shown to require  $\beta$ arrestin 2 and p38 activation (Hunton et al., 2005). Finally, Scott and colleagues have shown that, in Hep2 cells, depletion of both  $\beta$ arrestin isoforms blocks ATR mediated membrane ruffling (Scott et al., 2006).

Our previous work has shown that stimulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) leads to the association of  $\beta$ arrestins and ARF6 in HEK 293 cells (Claing et al., 2001a). Using an in vitro setting, we demonstrated that  $\beta$ arrestin 1, when added to purified ARNO (an ARF GEF) and ARF6, acted to facilitate the activation of the GTPase. These studies suggested that  $\beta$ arrestin proteins could act as an intermediate signalling adaptor to couple receptors to small GTP-binding proteins of the ARF family. In this study, we present evidences that  $\beta$ arrestin proteins are important for activation of ARF6 and Rac1 following Ang II stimulation. These scaffolds can interact with both ARF6 and Rac1. Depletion of either  $\beta$ arrestin impairs the ability of the two GTPases to form a complex. In addition, we show that p38 also acts to regulate the activation process of ARF6 and Rac1 by controlling the association of  $\beta$ arrestin with ARF6. Taken together, we provide a molecular mechanism by which GPCRs can induce ARF6 dependent signalling events.

### III.2. MATERIALS AND METHODS.

**Reagents and antibodies.** Minimal essential medium and fetal bovine serum were purchased from Sigma (Oakville, Canada). All other tissue culture reagents were purchased from Invitrogen (Burlington, Canada). The anti-ARF6 3A1, anti-Rac1 C-11 antibodies and protein G PLUS agarose were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Alexa Fluor 488 phalloidin

was from Molecular Probes (provided by Invitrogen, Burlington, Canada). The anti-phospho(Thr180/Tyr182)-p38, p38, phospho-Erk and Erk antibodies were from Cellular Signaling (provided by New England Biolabs, Pickering, Canada). Ang II, fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies, and other reagents were obtained from Sigma (Oakville, Canada). The anti-ARF6 polyclonal antibody was a gift from J. Donaldson (NIH, USA). The anti- $\beta$ arrestin polyclonal antibody (A1CT) was a gift from R.J. Lefkowitz (Duke University, USA). AngII-S<sup>1418</sup> (SII) was a gift from E. Escher (University of Sherbrooke, Canada). Purified  $\beta$ arrestin 1 and  $\beta$ arrestin 2 were a gift from S.A. Laporte (McGill University, Canada). All other reagents were from SIGMA .

**DNA plasmids and siRNA.** GST-Rac1( $\Delta$ CAAX) was a gift from J.D. Lambeth (Emory University, USA). GST-PAK was obtained from N. Lamarche-Vane (McGill University, Canada). GST-GGA3 was from J-L. Parent (University of Sherbrooke, Canada). Rat  $\beta$ arrestin 2-GFP was a gift from S.A. Laporte (McGill University, Canada). Double-stranded siRNA (small interfering RNA) targeting human  $\beta$ arrestin 1,  $\beta$ arrestin 2, or the two isoforms were synthesized as previously described (Houndolo et al., 2005) using the Silencer<sup>TM</sup> siRNA construction kit from Ambion (Austin, TX). To design  $\beta$ arrestin 1 and  $\beta$ arrestin 2-specific siRNA duplexes, we choose sequences previously described and designed from the human  $\beta$ arrestin 1 and  $\beta$ arrestin 2 mRNA ( $\beta$ arrestin 1: 5'-AAAGCCUUCUGCGCGGAGAAU-3';  $\beta$ arrestin 2: 5'-AAGGACCGCAAAGUGUUUGUG-3') (Ahn et al., 2003). The mRNA sequence used to silence the two forms of  $\beta$ arrestins was 5'-AAACCUGCGCCUCCGCUAUG-3' (Gesty-Palmer et al., 2006). The scrambled siRNA targets a non-relevant region in the human genome (5'-AACAGGATAGTCGAGCAGAGT-3') (Daher et al., 2008a).

**Cell culture and transfection.** HEK 293 cells stably expressing the ATR-HA (Fessart et al., 2005) or ATR-Flag were a gift from S.A. Laporte (McGill University, Canada). HEK 293 cells were maintained in minimal essential

medium (MEM) supplemented with 1mM non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 10% Fetal Bovine Serum at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Transfection of siRNAs were performed as previously described (Cotton et al., 2007b) using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 according to the manufacturer's instructions. Cells were used 72h after  $\beta$ arrestin 1 (50 nM),  $\beta$ arrestin 2 (80 nM) or  $\beta$ arrestin 1-2 (25 nM) siRNA transfection, which resulted respectively in 49  $\pm$ 5%, 56 $\pm$ 2%, and, 49 $\pm$ 2% ( $\beta$ arrestin 1) and 54 $\pm$ 1% ( $\beta$ arrestin 2) of endogenous protein expression inhibition.

**Western blotting.** All proteins were run on polyacrylamide gels (8, 10 or 14%) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific antibodies described in the following sections. Secondary antibodies were all fluorescein isothiocyanate-conjugated, and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software.

**Activation of ARF6 and Rac1.** HEK 293 cells stably expressing the ATR-HA receptor (Fessart et al., 2005) were serum starved overnight. The cells were stimulated with Ang II (1  $\mu$ M) at 37°C for 2 min to activate ARF6 or 60 min for Rac1. Cells were lysed in 300  $\mu$ l of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1 % NP-40, 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and protease inhibitors). Samples were tumbled for 30 min (4°C) and spun for 5 min at 10,000 rpm. A fraction of 10  $\mu$ l of each lysate was taken as total input and the remaining samples were incubated with GST-PAK (Rac1 activation), or GST-GGA3 (ARF6 activation) fusion proteins coupled to glutathione-Sepharose 4B beads. Samples were rotated at 4°C for 1h. GTP-bound form of the GTPases were eluted into 15  $\mu$ l of SDS sample buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on 14% SDS-PAGE and detected by immunoblot using a specific anti-Rac1 (Santa Cruz Biotechnology) or anti-ARF6 (Santa Cruz Biotechnology) antibody. The



secondary antibodies were FITC-conjugated (Sigma) and the proteins were detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham).

**GST pull down assays.** Glutathione-S-Transferase alone or coupled to Rac1( $\Delta$ CAAX) were produced in bacteria and incubated with glutathione-Sepharose 4B™ beads. Fusions proteins were then mixed in buffer SM (pH 7.4, 25 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0.2% Triton X-100, and protease inhibitors) with either 1 $\mu$ g of purified recombinant  $\beta$ arrestin 1,  $\beta$ arrestin 2, ARF6 or a combination of one of the  $\beta$ arrestins with ARF6, to a final volume of 250  $\mu$ l. After an incubation period of 4h at 4°C, 15  $\mu$ l of the samples were taken for total input controls, and beads were washed twice in buffer SM. Interacting proteins were boiled for 5 min in SDS sample buffer and resolved on 14% SDS-PAGE. ARF6 proteins were detected by immunoblot using a specific polyclonal ARF6 antibody (gift from J. Donaldson) and  $\beta$ arrestin 1 and 2, with a polyclonal A1CT antibody (gift from R.J. Lefkowitz).

**Co-immunoprecipitation assays.** For ARF6/Rac1, ARF6/ $\beta$ arrestins, p38/ $\beta$ arrestins and Rac1/ $\beta$ arrestins co-immunoprecipitations, HEK293 cells stably expressing the ATR were plated in 10 cm dishes. Before the experiments, cells were serum starved overnight and stimulated with Ang II (1  $\mu$ M) for the indicated time before being solubilized in 300  $\mu$ l of TGH buffer (pH 7.3, 1 % Triton, 10 % glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) containing protease inhibitors (4°C for 1h). Lysates were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and equal concentrations of soluble protein were incubated with the monoclonal anti-ARF6, the anti-Rac1 or the polyclonal p38 antibodies and protein G-PLUS agarose beads. Beads were washed and bound proteins were eluted into SDS sample buffer containing 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol and heated at 95°C for 5 min. Proteins were resolved on 8% gels for ARF6/ $\beta$ arrestins, p38/ $\beta$ arrestins and Rac1/ $\beta$ arrestins co-immunoprecipitations and on 14% gels for ARF6/Rac1 experiments. Interacting proteins were detected by

immunoblot analysis using specific antibodies (polyclonal anti- $\beta$ arrestins, monoclonal anti-Rac1). Interaction levels were quantified as described before, using Image Quant v5.2.

***p38 activation assays.*** HEK293 cells stably expressing ATR-HA were plated in 6-wells dishes. 72 h after transfection of either  $\beta$ arrestin 1,  $\beta$ arrestin 2,  $\beta$ arrestin 1-2 or a scrambled siRNA, cells were stimulated with Ang II (1 $\mu$ M) at indicated times and subsequently harvested in 80  $\mu$ l of TGH lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Cells were incubated for 1 h at 4°C and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. Equal amounts of supernatants were added to SDS sample buffer and boiled at 95°C for 5 min. Proteins from the lysates were run and subjected to Western blotting for detection of p38 phosphorylation.

***Immunofluorescence.*** For ruffling experiments, HEK 293 cells stably expressing the ATR-HA were grown on coverslips and transfected for 72 h with siRNA targeting  $\beta$ arrestin 1 (80 nM),  $\beta$ arrestin 2 (50 nM),  $\beta$ arrestin 1-2 (25 nM) or an irrelevant sequence (80 nM). Cells were then stimulated with Ang II (1  $\mu$ M) for 30 min, fixed using paraformaldehyde (4%), and actin cytoskeleton was labelled with phalloidin coupled to Alexa-488 in a permeabilizing media (MEM, 0.1% BSA, 10 mM HEPES, 0.05% saponin) for 1 h. Confocal images were acquired using a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss). For  $\beta$ arrestin 2 localisation assays, HEK293 cells stably expressing AT<sub>1A</sub>R-HA were transfected with 0.5  $\mu$ g of DNA encoding  $\beta$ arrestin 2-GFP. After 2 days, cells were treated with either DMSO (0.2%) or SB220025 (3  $\mu$ M) for 30 min and stimulated or not with AngII (1  $\mu$ M) for 10 min. As described before, cells were fixed, mounted on slides and observed using a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss).

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (4.0a).

### III.3. RESULTS.

#### *βarrestin is required for the activation of ARF6 and Rac1*

We have shown that ARF6 and Rac1 act together to control remodelling of the actin cytoskeleton (Cotton et al., 2007b). Ang II leads to the activation of both GTPases, which are involved in membrane ruffling and cell migration. We have previously shown that βarrestin can form a complex with ARF6 upon β<sub>2</sub>AR stimulation through direct protein-protein interaction (Claing et al., 2001a). The exact molecular mechanism by which ARF6 is activated following receptor stimulation however remains unclear. To first address the importance of βarrestin proteins in the activation process of ARF6 following stimulation of the ATR, we used RNA interference. As illustrated in figure 1A, depletion of βarrestin 1 or βarrestin 2 markedly inhibited the Ang II dependent activation of endogenous ARF6 after 2 min, which is the time point where this GTPase is maximally activated in HEK 293 cells (Cotton et al., 2007b). These data suggest that expression of both βarrestin 1 and 2 is required in order for the ATR to promote activation of this GTPase. In order to reduce the expression of both βarrestin proteins, we transfected our cells with a siRNA directed against a common sequence of the genes coding for βarrestins. Depletion of both isoforms however resulted in an increased basal activation of ARF6, which returned to basal levels following Ang II stimulation. This surprising observation could be due to the fact that, at basal state, both βarrestins contribute to block ARF6 activity by a yet unknown process. ATR stimulation reset this “abnormal” activation level to then engage ARF6 in the βarrestin dependent pathway to activation.

Because Rac1 is also activated following Ang II stimulation, we next examined the role of βarrestin proteins in the activation process of this Rho GTPase. We have previously shown that the maximum level of Rac1 activation is

reached after 60 min of AngII (1 $\mu$ M) treatment in HEK 293 cells (Cotton et al., 2007b). Depletion of  $\beta$ arrestin 1 or  $\beta$ arrestin 2 inhibited GTP-loading of Rac1 stimulated by Ang II in control cells. Depletion of both  $\beta$ arrestins also blocked Rac1 activation (Fig. 1B). We next investigated the effect of reducing  $\beta$ arrestin expression on Ang II stimulated membrane ruffling. As illustrated in figure 1C, depletion of  $\beta$ arrestin 1 and  $\beta$ arrestin 2, individually or in combination, markedly impaired remodelling of the actin cytoskeleton. These data are consistent with a previous report by Scott and colleagues, who showed that in Hep2 cells, inhibition of  $\beta$ arrestin proteins expression blocked ATR triggered ruffling (Scott et al., 2006). Altogether, the morphological changes we observed in  $\beta$ arrestin depleted cells are correlated with the fact that in these conditions Rac1 is not activated following Ang II stimulation and therefore this GTPase is no longer able to promote remodelling of the actin cytoskeleton.

*$\beta$ arrestin proteins act to regulate the formation of a complex including ARF6 and Rac1 following activation of the ATR*

Arrestins are primarily known for their role in the desensitization process, but also act as scaffold proteins to engage numerous signalling pathways (DeWire et al., 2007). We have previously shown that stimulation of the  $\beta_2$ AR lead to the formation of a complex including  $\beta$ arrestins and ARF6 (Claing et al., 2001a). As illustrated in figure 2A, stimulation of the ATR also leads to the interaction of endogenous ARF6 and  $\beta$ arrestins in HEK 293 cells. In these experiments, we observed the formation of such a complex early following receptor stimulation (3 min), but also after a longer period of Ang II treatment (15 min). In our previous study, we have shown that the ARF6 and  $\beta$ arrestin 1/2 interaction is direct when purified proteins are used (Claing et al., 2001a). Because ARF can also be associated with Rac1 (Cotton et al., 2007b) and that proteins such as POR1 (D'Souza-Schorey et al., 1997) or Arfaptin (Tarricone et al., 2001) have been shown to interact with both GTPases, we next examine whether  $\beta$ arrestin could associate with Rac1. In HEK 293 cells, stimulation of the ATR receptor leads to the association of endogenously expressed Rac1 and

$\beta$ arrestins, where the maximal interaction is found after 10 min of agonist stimulation (Fig. 2B). Using a GST pull down assay, our data indicate that both  $\beta$ arrestin proteins can directly interact with Rac1 (Fig. 2C).

We next examined the role of  $\beta$ arrestins in regulating the association of ARF6 and Rac1. In figure 3A, depletion of either  $\beta$ arrestin2 or the two isoforms inhibited the agonist promoted association of ARF6 and Rac1. However, in conditions where  $\beta$ arrestin 1 expression was reduced, the basal association of Rac1 and ARF6 was also reduced. Using a GST-pull down assay, we next examined whether the addition of  $\beta$ arrestin proteins, in an in vitro setting, affected the binding of ARF6 and Rac1. Although in cells, several regulatory proteins are likely to regulate the association of the two GTPases, our previous findings have demonstrated that purified ARF6 and Rac1 can directly bind (Cotton et al., 2007b). As illustrated in figure 3B, addition of purified recombinant  $\beta$ arrestin 1, but not  $\beta$ arrestin 2, led to a 2 fold increase in the association of ARF6 to GST-Rac1.

To demonstrate the implication of  $\beta$ arrestin proteins in the activation process of ARF6, we next used a biased ATR ligand, AngII-Sar<sup>1</sup>Ile<sup>4</sup>Ile<sup>8</sup> (SII), known to promote  $\beta$ arrestin recruitment to the receptor, but not coupling to heterotrimeric G proteins (Wei et al., 2003). As illustrated in figure 4A, stimulation of HEK 293 cells with SII resulted in a concentration dependent activation of ARF6 after 2 min of treatment. At this time point, Ang II, but not SII, resulted in the phosphorylation of Erk, a G<sub>q</sub>-mediated response. In addition, treatment of the cells with SII promoted the association of endogenous forms of ARF6 and Rac1 (Fig. 4B). Taken together, these data support our findings that signalling through  $\beta$ arrestin proteins is important for activation of ARF6 dependent events.

#### *p38 regulates the activation of ARF6 and Rac1 as well as their association*

Previous reports have involved  $\beta$ arrestins and p38 as key regulators of GPCR induced chemotaxis. Hunton and colleagues have shown that p38 inhibition blocked Ang II driven chemotaxis in HEK 293 cells, whereas inhibition of other ATR effectors, i.e. Erk, PKC, PI3K and Src, had no effect on the motile response (Hunton et al., 2005). In this study, we observed that stimulation of the

ATR with SII not only resulted in the activation of ARF6 after 2 min of stimulation, but also p38 phosphorylation. In our cells, p38 was found to be rapidly and transiently phosphorylated after 1 and 2 min following Ang II treatment (Fig. 5A).

We first examined whether inhibition of p38 phosphorylation impaired ARF6 and Rac1 activation. To address this point, we treated cells with the biochemical inhibitor, SB220025, and assessed GTPase activation. As shown previously, stimulation of the cells with Ang II led to the activation of ARF6 and Rac1 (Fig. 5B, 5C). Pretreatment of the cells with SB220025 markedly reduced the Ang II promoted activation of the two GTPases. In addition, membrane ruffling induced by Ang II was also found to be inhibited (Fig. 5D).

We next examined whether activation of p38 was important for the ability of  $\beta$ arrestin to interact with either ARF6 or Rac1. First, cells were pretreated with SB220025 and the association of ARF6 with Rac1 was assessed after 3 and 15 min of stimulation, times at which interactions were found to be maximal (Fig. 2). As illustrated in figure 6A, inhibition of p38 phosphorylation markedly impaired the association of ARF6 with  $\beta$ arrestin proteins following early, but not late, Ang II stimulation. In contrast, the association of Rac1 and  $\beta$ arrestins was unchanged after 10 min of agonist treatment (Fig. 6B). We next tested whether the association of ARF6 and Rac1 could be regulated by p38 activation. Pretreatment of HEK 293 cells with the p38 inhibitor markedly reduced the ability of the two small G proteins to interact (Fig. 6C). In these conditions,  $\beta$ arrestin could still be recruited to the activated receptor (Fig. 6D), but could no longer interact with p38 (Fig. 6E). Other groups already showed that following ATR stimulation  $\beta$ arrestin 2 acted as a scaffold for the association of Jnk3 and its MAPKK ASK1 (McDonald et al., 2000) as well as Erk with Raf-1 (Luttrell et al., 2001). The loss of association between p38 and  $\beta$ arrestins, in SB2200025 treated cells, could be explained by the fact that the inhibitor and the  $\beta$ arrestins may compete for the same binding site on the MAPK. At last, we verified in our system the contribution of each arrestins on p38 activation. As presented in figure 6F, the depletion of  $\beta$ arrestin1 or both isoforms resulted in the inhibition of AngII mediated p38 phosphorylation. Recently, another group showed that p38 activation was

dependent on  $\beta$ arrestin1 only following  $\beta$ 2-adrenergic receptor stimulation (Gong et al., 2008). Together with this previous work, our findings suggest that  $\beta$ arrestin1 may be involved in a non GPCR-specific regulation of p38. Altogether, these studies suggest that in addition to regulating the activation of ARF6 and Rac1,  $\beta$ arrestin controls the phosphorylation of p38 which in turn allows the activation process of ARF6 as well as its ability to form a complex with Rac1 upon Ang II stimulation.

### III. 4. DISCUSSION.

In this study, we propose to elucidate the molecular events occurring right after  $AT_1R$  activation to induce membrane ruffling. We showed that, at basal state, arrestins constitutively interact with p38 and dissociate following receptor stimulation. This sudden loss of association allows the MAPK to be phosphorylated since 2 minutes after agonist stimulation, p38 is activated and  $\beta$ arrestins no longer interact with the kinase. Moreover, pretreatment with SB abrogated all interactions between arrestins and p38, which led us to think that SB dislodged  $\beta$ arrestins from the p38 binding motif (a pocket within the kinase's active site). Interestingly, although both  $\beta$ arrestins interact with p38, its activation is just made possible by  $\beta$ arrestin1. It can be explained by the fact that  $\beta$ arrestin1 could be the specific scaffold protein enabling p38 to be activated, by recruiting kinases such as MEK3 and MEK6 which are known to phosphorylate p38 (Bettinger and Amberg, 2007). In the past, it has been shown using overexpressed proteins that  $\beta$ arrestin2 binds ERK signalling components such as Raf-1 and ERK2 under AngII control (Luttrell et al., 2001). On another hand,  $\beta$ arrestin2 could play a different role toward p38 by supporting  $\beta$ arrestin1 in recruiting more protein available to be activated. It has been suggested that arrestins can form dimers at physiological concentrations (Storez et al., 2005) in cells and it has recently been proposed that  $\beta$ arrestin2 multimerization is required for arrestin-dependent ERK1/2 signalling (Xu et al., 2008). Thus, this could explain why precipitating p38 allows detecting both  $\beta$ arrestins even if only  $\beta$ arrestin1 is involved in activating the MAPK. To our knowledge, it is the first evidence

proving that endogenous forms of p38 are in complex with arrestins to allow the kinase to be further activated.

Our group showed that ARF6 GDP-bound form directly interacts with  $\beta$ arr1 (Claing et al., 2001a). Since inhibiting p38 phosphorylation prevents the “early association” between ARF6 and  $\beta$ arrs, we suggest that p38 acts on ARF6 recruitment to arrestins (Fig. 8). We were not able to find any complex linking p38 and ARF6 (data not shown), so we suspect the involvement of other unknown intermediaries in the control of ARF6 localisation.

Following arrestins recruitment, which is not dependent on p38 activation since SB treatment did not block  $\beta$ arrs enrichment to the plasmic membrane, GDP-bound ARF6 interacts with the ARF GEF ARNO, which is constitutively associated with arrestins (Claing et al., 2001a). Using an AT<sub>1</sub>R biased-agonist, which is known to modulate the receptor in order to recruit arrestins without engaging heterotrimeric G proteins (Aplin et al., 2007; Daniels et al., 2005; Holloway et al., 2002; Wei et al., 2003), we show that  $\beta$ arr1-2 coupling to the receptor is required for ARF6 activity, once more potentially implicating ARNO in this process. A recent study proposed, at the opposite, that ARNO is recruited to ARF6-GTP in order to activate other ARF isoforms (Cohen et al., 2007). Considering that in conditions where ARF6 needs AT<sub>1</sub>R and both arrestins to be GTP-loaded, we suppose that an ARFGEF, even if not ARNO, is associated with arrestins to further allow ARF6 to be activated. Determining which exchange factor is involved remain a question of high interest.

In a previous study, we found that Rac1 and ARF6 can directly interact together to modulate Rac1 activity. The ARF6 GTP-bound form recruits GDP-bound Rac1 to allow a Rac1GEF (PIX) to activate the Rho-like GTPase (Cotton et al., 2007b). Now we show that  $\beta$ arrs are both involved in the formation of GTPases complex following AT<sub>1</sub>R stimulation. *In vitro* experiments suggest that only  $\beta$ arr1 could be responsible for increasing ARF6/Rac1 interaction. This result reflects what happens at basal state. Indeed, depleting  $\beta$ arr1, but not  $\beta$ arr2, led to a significant drop regarding the basal association between Rac1 and ARF6, suggesting that a fraction of this arrestin serves to maintain the GTPase complex found in non-



stimulated cells. One obvious reason for the loss of association between ARF6 and Rac1 in  $\beta$ arrs-depleted cells is that ARF6 cannot be activated anymore and, as a result, is unable to recruit Rac1. This interpretation is supported by the use of the p38 inhibitor which also abrogated the agonist triggered association between the two monomeric G proteins, although not preventing their interaction with  $\beta$ arrs. According to binding kinetics, Rac1 is the first G protein to be recruited to arrestins, without depending on p38 activation. Then, the second phase of the association between ARF6 and arrestins occurs, once again, regardless of the MAPK activity. At this stage, only ARF6 activation state will dictate if the two GTPases can interact together, even if they are bound to their scaffold.

ARF6 is also known to orchestrate the assembly of clathrin coated pits (CCP), as well as  $\beta$ arrs. Indeed, the GTPase interacts directly with AP-2 and clathrin following AT<sub>1A</sub>R stimulation (Poupart et al., 2007), and depleting ARF6 in cells abrogates the recruitment of these proteins to the receptor, resulting in the absence of agonist triggered internalisation (Houndolo et al., 2005). If we look at the profile of interaction between  $\beta$ arrs and ARF6, it is possible to unravel the fact that this process can be divided in two phases. The “early” one, which coincides with ARF6 activation, does not seem to be involved in internalisation initiation, since inhibition of p38 activation and, as a result, ARF6 GTP loading does not impair vesicle formation. Then, as level of GTP-bound ARF6 decreases, which can be associated to the fact that an ARFGAP, GIT1, is also bound to  $\beta$ arrs, components of clathrin vesicles are assembled. When the second phase of interaction occurs at 10-15 min, AT<sub>1R</sub> is internalized and at this moment, arrestins is already associated with Rac1 which will then be in contact with the GIT1 interacting partner PIX. This will cause Rac1 activation and further membrane ruffling initiation. Among all these molecular events, it is obvious that every proteins involved are interconnected. More precisely, time and space are keys to tightly regulate networks sharing the same players. Studying arrestins, once again, show that scaffold proteins are not only “hubs” welcoming different partners for a unique goal. They participate to signal as well as to orchestrate molecular interactions, linking GPCR desensitization and internalization to cell

migration. This is the reason why correctly understanding the role of arrestins is one major key needed to specifically control patho-physiological events without deregulating the whole cell machinery.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Emanuel Escher (University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada) for SII. In addition, we are grateful to Robert J. Lefkowitz (Duke University, Durham, NC, USA) for the A1CT antibody and his support in initiating this study. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-79470 to AC. AC is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.

**Figure 1. Arrestins are essential to both AT1AR mediated ARF6 and Rac1 activation, as membrane ruffling.** (A) HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were transfected for 72h with siRNAs directed against whether  $\beta$ arr1 (50nM),  $\beta$ arr2 (80nM), the two  $\beta$ arrs isoforms (25nM) or an irrelevant genome sequence (siCTL, 80nM). Cells were then treated with AngII (1 $\mu$ M) for 2 min and harvested. Cell lysates were incubated with beads coupled to GST-GGA3 fusion proteins and precipitated ARF6 proteins, total ARF6 and  $\beta$ arrs were detected by Western blot using specific ARF6 and  $\beta$ arrs antibody. For each condition, quantifications of GTP-bound ARF6 are the mean  $\pm$  S.E.M of six independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01; \* $p$  < 0.05. (B) HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were transfected as previously described in (A). Cells were then treated with AngII (1 $\mu$ M) for 60 min and harvested. Cell lysates were incubated with beads coupled to GST-PAK fusion proteins that specifically bind Rac1-GTP forms. Precipitated Rac1 proteins, total Rac1 and  $\beta$ arrs entities were detected by Western blot using specific Rac1 and  $\beta$ arrs antibody. (C) HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA, were treated as previously described in (A). Cells were then stimulated or not with AngII (1 $\mu$ M) for 30 min, fixed and labelled with phalloidin coupled to Alexa-488. Total and ruffling cells were counted on 10 randomly chosen fields per conditions. Percentages of ruffling cells are the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. \*\* $p$  < 0.01.

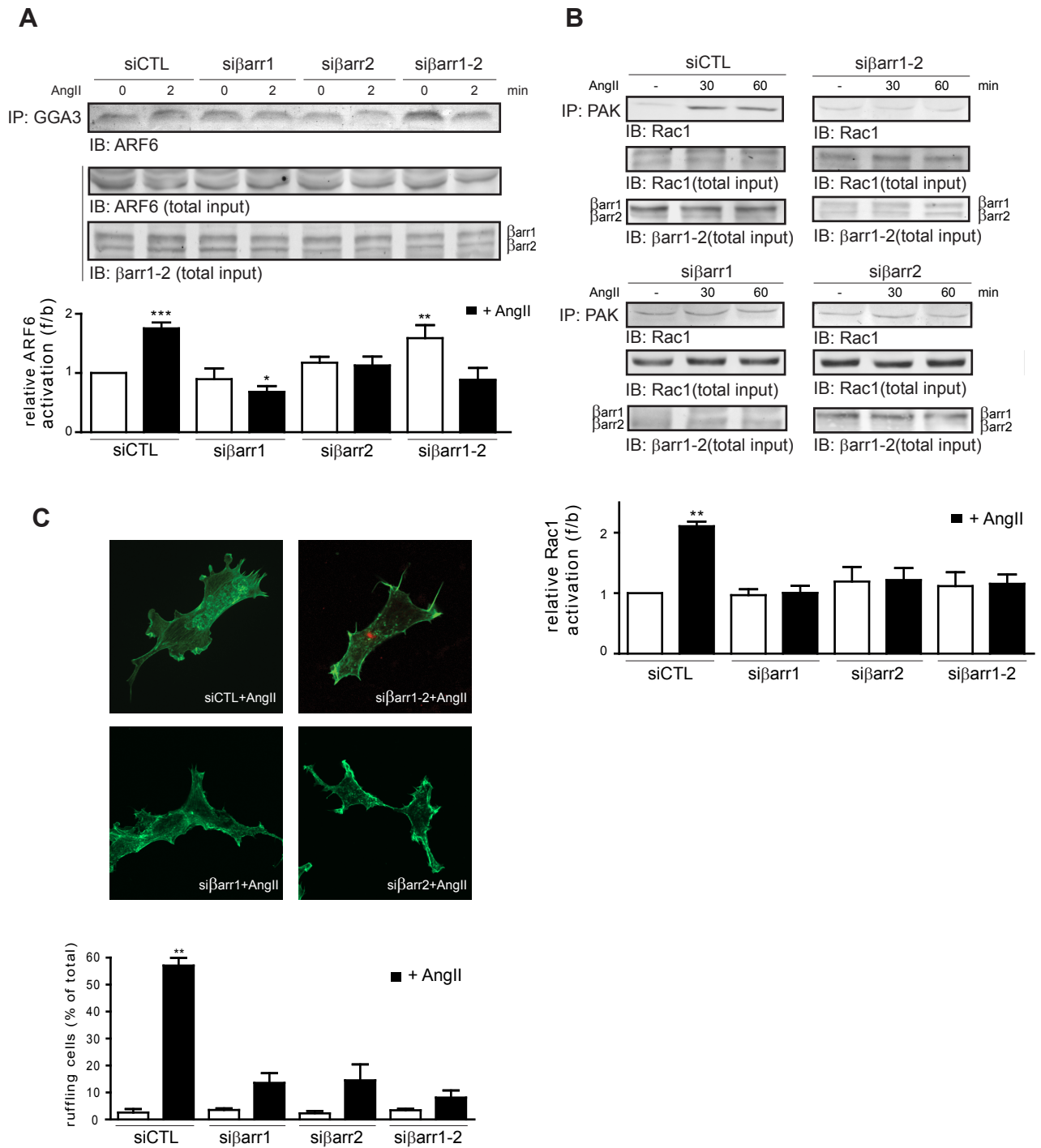
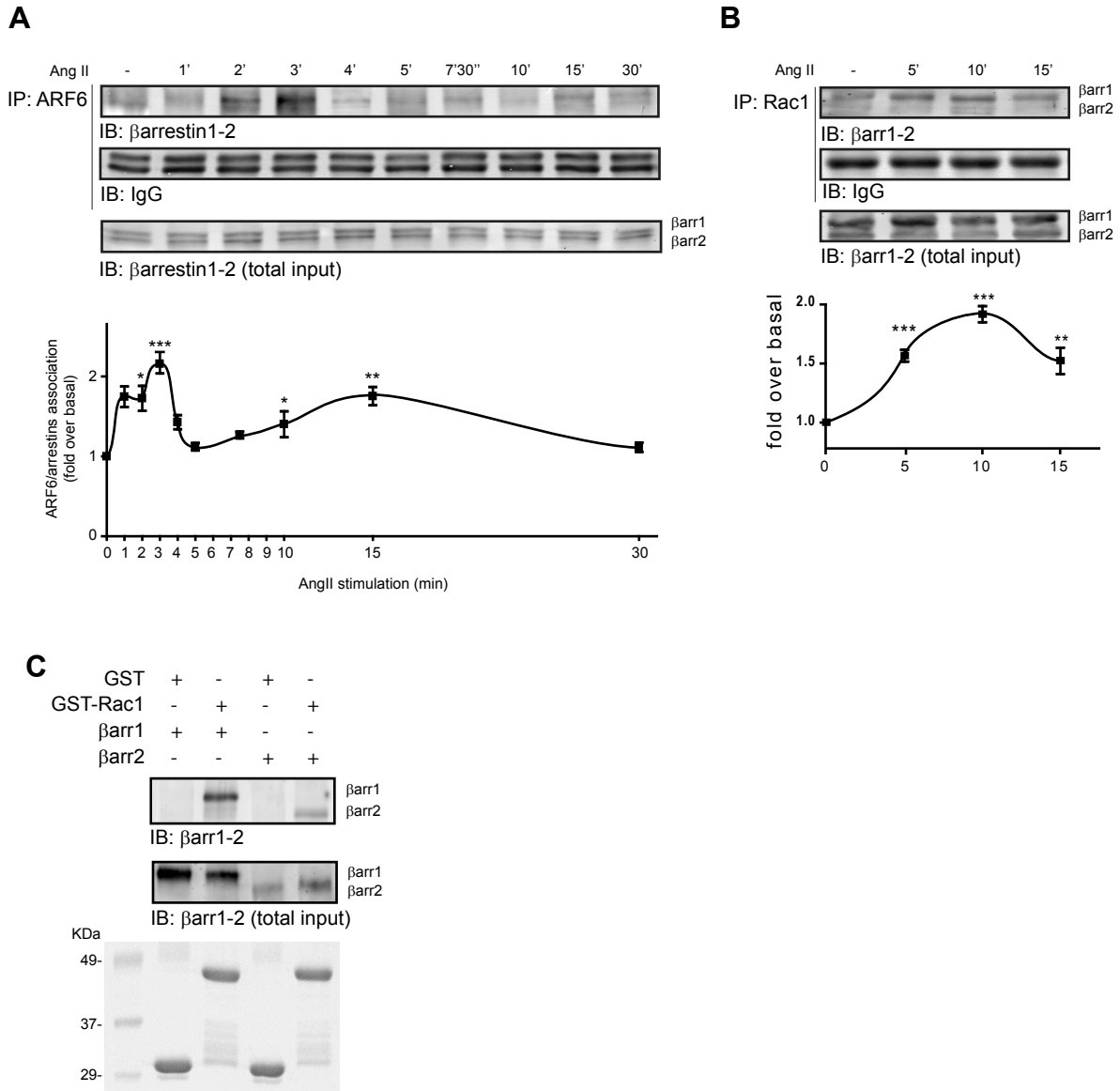
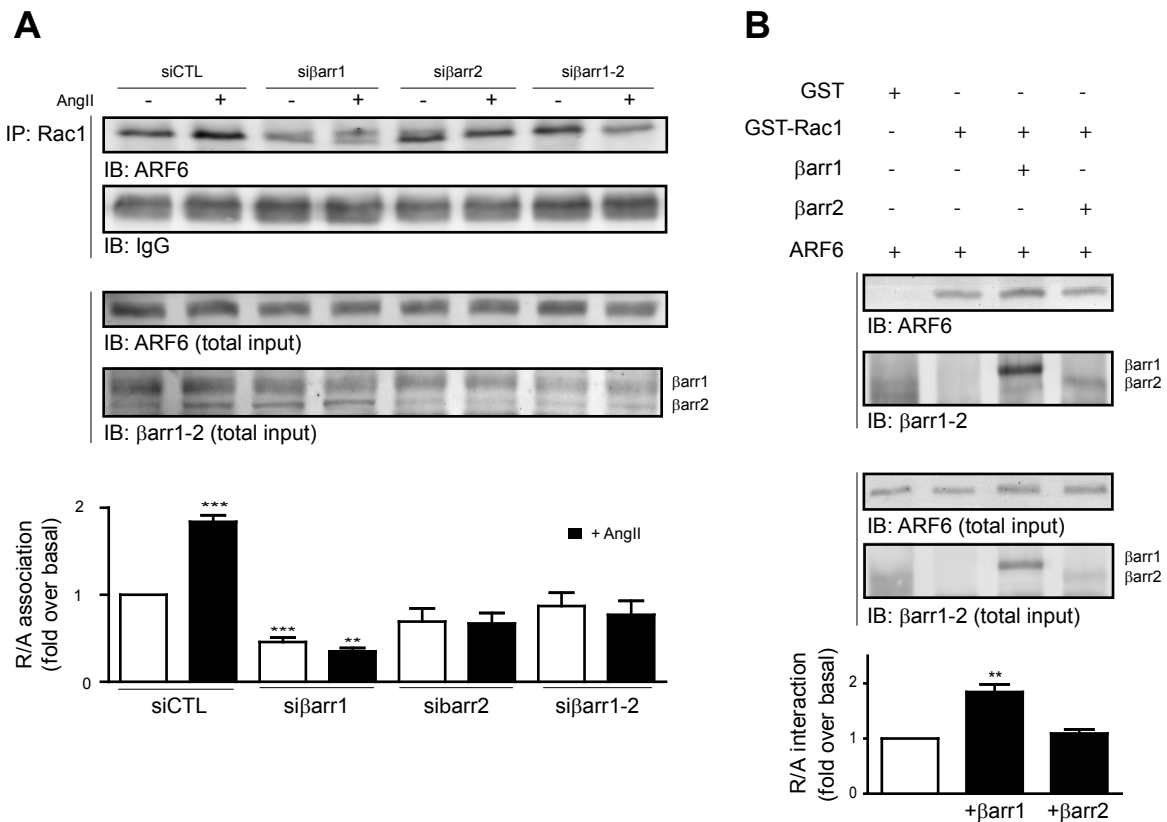


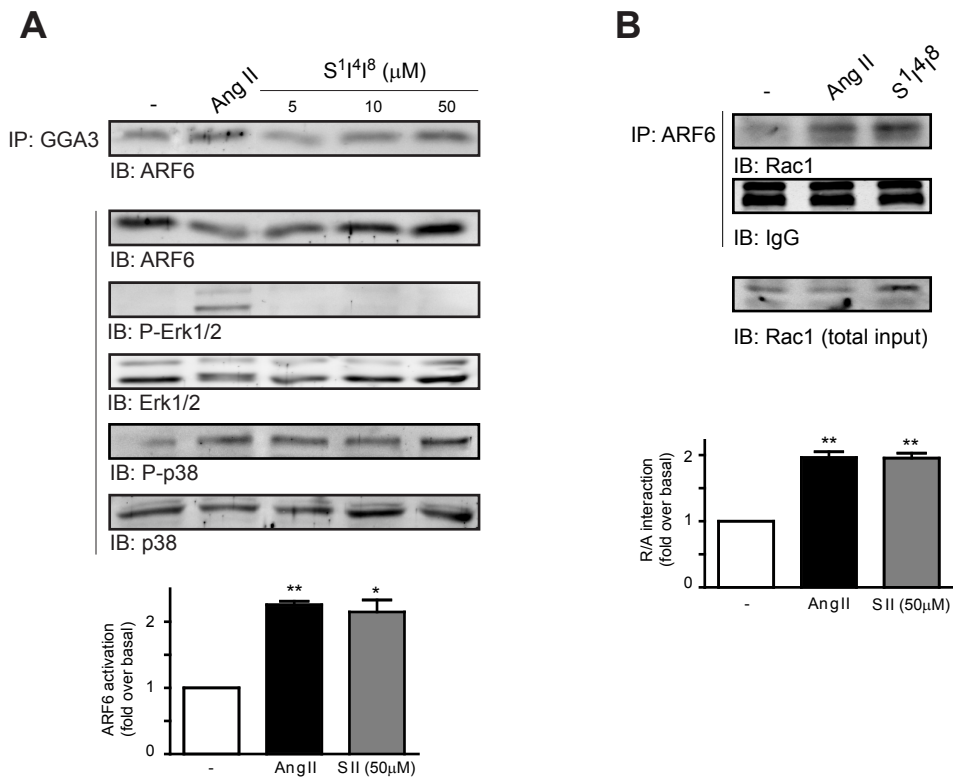
Figure 1 Cotton et al. 2008



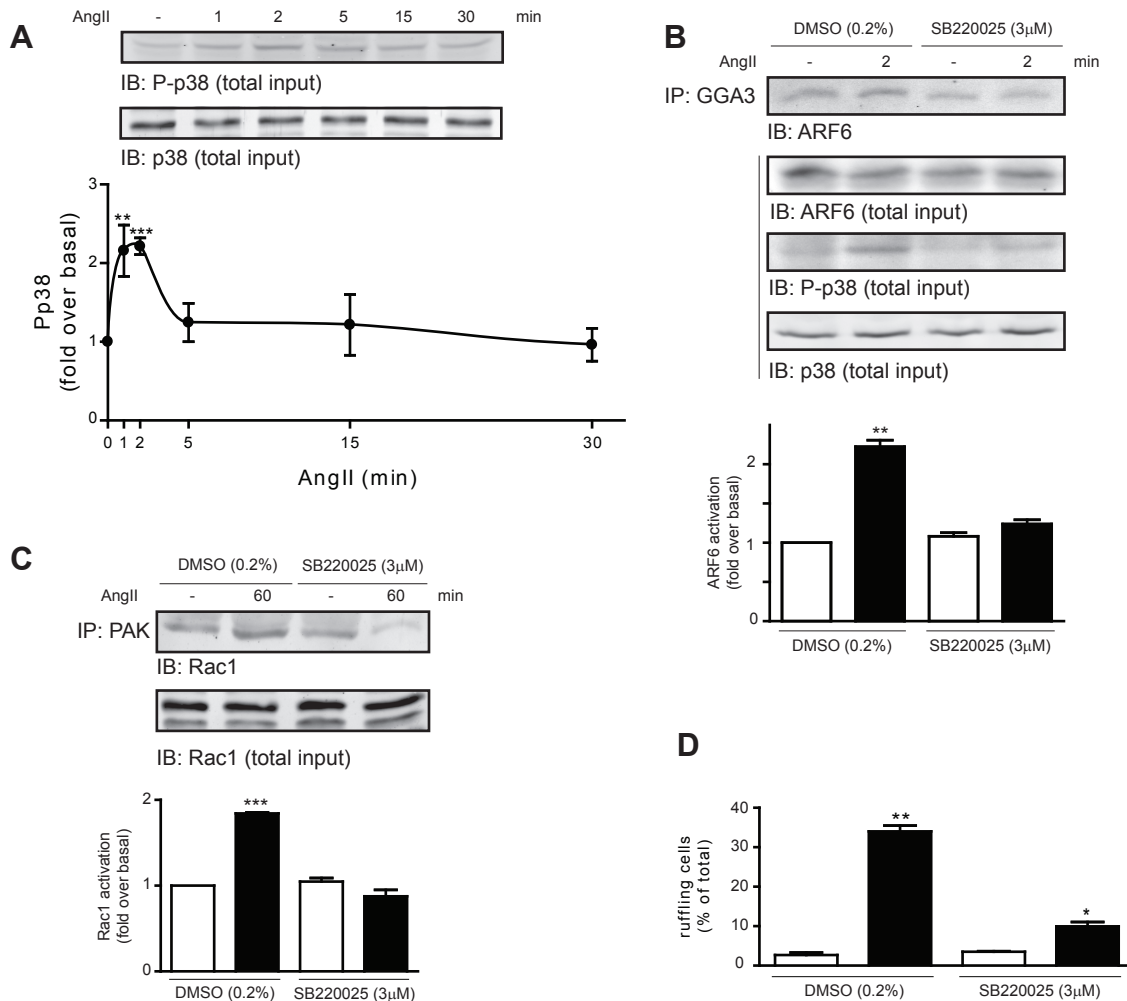
**Figure 2: AngII promotes Rac1 and ARF6 interaction with arrestins. (A)** Cells stably expressing AT1AR-HA were treated for the indicated times with AngII (1 $\mu$ M) and harvested. Each sample was incubated with a monoclonal antibody specifically recognizing ARF6 and protein G Plus agarose beads. After elution, arrestins interacting with ARF6 proteins were revealed by Western blot using a specific  $\beta$ arr1-2 antibody. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01; \* $p$  < 0.05. **(B)** HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were treated with AngII (1 $\mu$ M) for the indicated times and lysed. Each sample was then incubated with a monoclonal Rac1 antibody and protein G Plus agarose beads.  $\beta$ arrestins bound to Rac1 antibody were eluted and revealed by Western blot, using a specific antibody for  $\beta$ arrestins. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of five independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01. **(C)** Purified  $\beta$ arr1 or  $\beta$ arr2 proteins (1 $\mu$ g) were incubated with sepharose beads coupled to either GST or GST-Rac1( $\Delta$ CAAX). Arrestins proteins pulled down by GST fusion proteins were eluted and detected by Western blot analysis, using a specific  $\beta$ arrestins antibody. On the lower panel are presented the levels of fusion proteins added to each condition. Data are representative of 6 independent experiments.



**Figure 3: Arrestins are essential regulators of Rac1 and ARF6 interaction. (A)** Cells stably expressing AT1AR-HA were transfected for 72h with βarr1 siRNA (50 nM), βarr2 siRNA (80nM), βarr1-2 siRNA (25nM) or a control siRNA (80nM), and stimulated with AngII (1μM) for 15 min. Cells were lysed and each lysate has been incubated with a specific Rac1 antibody and protein G Plus agarose beads. Interacting ARF6 proteins bound to antibody-beads complex were eluted and analysed by Western blot, using a specific ARF6 antibody. Data are the mean ±S.E.M. of three independent experiments. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01. **(B)** Purified ARF6 (1μg) was incubated with or without pure βarr1 (1μg) or βarr2 (1μg), and GST or GST-Rac1(ΔCAAX) coupled to sepharose beads. Proteins bound to the GST fusion proteins were then eluted and revealed by Western blot analysis, using specific ARF6 and βarr1-2 antibodies. Quantification of the relative amount of ARF6 found in each sample is the mean ±S.E.M. of four independent experiments. \*\*p < 0.01.



**Figure 4: SII treatments leads ARF6 activation and to the association of Rac1 and ARF6.** **(A)** HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA treated with either AngII (1μM) or AngII-Sar11le41le8 (5, 10, 50μM) for 2 min, or left untreated. Cells were then lysed and obtained samples were incubated with beads coupled to GST-GGA3. Precipitated ARF6 proteins were detected by Western blot using a specific ARF6 antibody, as well as fractions of each total input of ARF6, ERK1/2, p38 and phosphorylated forms of ERK1/2 and p38. Data are the mean ±S.E.M. of three independent experiments. \*\*p < 0.01; \*p < 0.05. **(B)** HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were treated or not with either AngII (1μM) or AngII-Sar11le41le8 (50μM) for 15 min. Cells were harvested and lysates were incubated with a specific ARF6 antibody and protein G Plus agarose beads. After beads elution, the presence of interacting Rac1 proteins was analysed by Western blot, using a specific Rac1 antibody. Data are the mean ±S.E.M. of three independent experiments. \*\*p < 0.01.



**Figure 5: Activation of p38 is essential to Rac1 and ARF6 activity to initiate membrane ruffling.** (A) HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were treated for the indicated times with AngII (1μM) and harvested. For each condition, an equal amount of cell lysates were analysed by Western blot, using a specific antibody detecting phosphorylated forms of p38. Data represent the relative mean level ± S.E.M. of p38 phosphorylation for each time point of treatment in four independent experiments. \*\*p < 0.01; \*p < 0.05. (B) Cells were pretreated with DMSO (0.2%) or SB220025 (3μM) and stimulated for 2 min with AngII (1μM). Cells were harvested and lysates were incubated with GST-GGA3 coupled to sepharose beads. ARF6 proteins bound to GST-GGA3 were revealed by Western blot with a specific polyclonal ARF6 antibody as well as a 3% fraction of total p38, phosphorylated-p38 and ARF6, using specific polyclonal antibodies. Data are the mean ± S.E.M. of three independent experiments. \*\*p < 0.01. (C) Cells stably expressing AT1AR-HA were treated as in (B) and stimulated with AngII (1μM) for 60 min. Cells were lysed and incubated with GST-PAK coupled to agarose beads. Interacting Rac1 proteins were then eluted and revealed by Western blot analysis using a specific Rac1 antibody. Presented results are the mean ± S.E.M. of three independent experiments. \*\*\*p < 0.001. (D) Cells stably expressing AT1AR-HA were pretreated with either DMSO (0.2%) or SB220025 (3μM), stimulated for 30 min with AngII (1μM) and fixed. Cells were then incubated with phalloidin Alexa-488 and total and ruffling cells were counted on 10 randomly chosen fields per conditions. Percentages of ruffling cells are the mean ± S.E.M. of four independent experiments. \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.



**Figure 6. p38 is essential to AT1AR mediated ARF6 and Rac1 activation, (A)** HEK293 cells stably transfected with AT1AR-HA were pretreated with either DMSO (0.2%) or SB220025 (3 $\mu$ M) for 30 min and stimulated with AngII (1 $\mu$ M) for the indicated times before being harvested. Cell lysates were then incubated with a specific monoclonal ARF6 antibody and protein G Plus agarose beads. Arrestins interacting with precipitated ARF6 proteins were revealed by Western blot analysis using a specific polyclonal  $\beta$ arr1-2 antibody. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01 stands for comparisons with non-stimulated conditions. ### p < 0.001 is for comparison with the paired condition. **(B)** Cells were pretreated as described in (A) and stimulated with AngII (1 $\mu$ M) for 10 min. Cells were then lysed and incubated with a monoclonal Rac1 antibody and protein G Plus agarose beads. Arrestins bound to Rac1 were eluted and detected by Western blot analysis using a specific polyclonal  $\beta$ arr1-2 antibody. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01. **(C)** Cells were pretreated as in (A) and stimulated with AngII (1 $\mu$ M) for 15 min. Cells were then lysed and samples were incubated with a specific monoclonal ARF6 antibody and protein G Plus agarose beads. Amount of Rac1 proteins bound to ARF6 were analysed by Western blot using a specific polyclonal Rac1 antibody. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of seven independent experiments. \*\*\*p < 0.001. **(D)** HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were transfected with a  $\beta$ arr2-GFP construct, pretreated with either DMSO (0.2%) or SB220025 (3 $\mu$ M) and stimulated or not with AngII (1 $\mu$ M) for 10 min. Cells were then fixed and  $\beta$ arr2-GFP localisation was observed by confocal microscopy. Data are representative of ten different cells per conditions in three independent experiments. **(E)** Cells stably expressing AT1AR-HA were pretreated with DMSO (0.2%) or SB220025 (3 $\mu$ M) and stimulated with AngII (1 $\mu$ M) for the indicated times. Cells were then harvested and incubated with a specific polyclonal p38 antibody and protein G Plus agarose beads. After elution,  $\beta$ arrs proteins interacting with p38 were revealed by Western blot analysis, using a specific  $\beta$ arr1-2 antibody. Quantification represents relative levels of  $\beta$ arr1-2 found in samples coming from DMSO pretreated cells. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. \*\*p < 0.01; \*p < 0.05. **(F)** HEK293 cells stably expressing AT1AR-HA were transfected for 72h with siRNAs directed against whether  $\beta$ arr1 (50nM),  $\beta$ arr2 (80nM), the two  $\beta$ arrs isoforms (25nM) or an irrelevant genome sequence (siCTL, 80nM) and treated for 2 min with AngII (1 $\mu$ M). Cells were then lysed and equal amount of total cell lysates were analysed by Western blot using specific p38, phosphorylated-p38 and  $\beta$ arr1-2 antibodies. Data are the mean  $\pm$ S.E.M. of four independent experiments. \*\*\*p < 0.001.

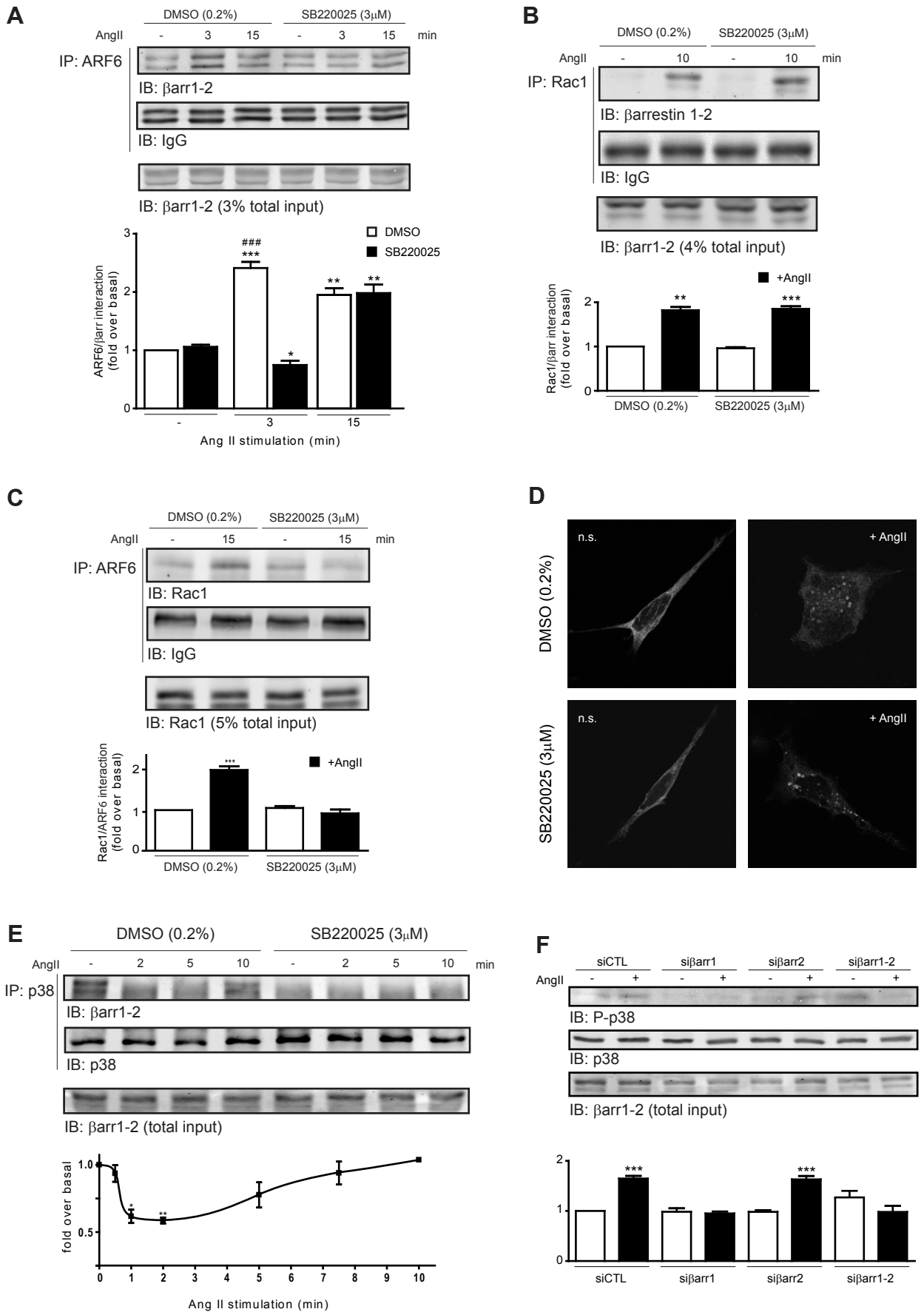
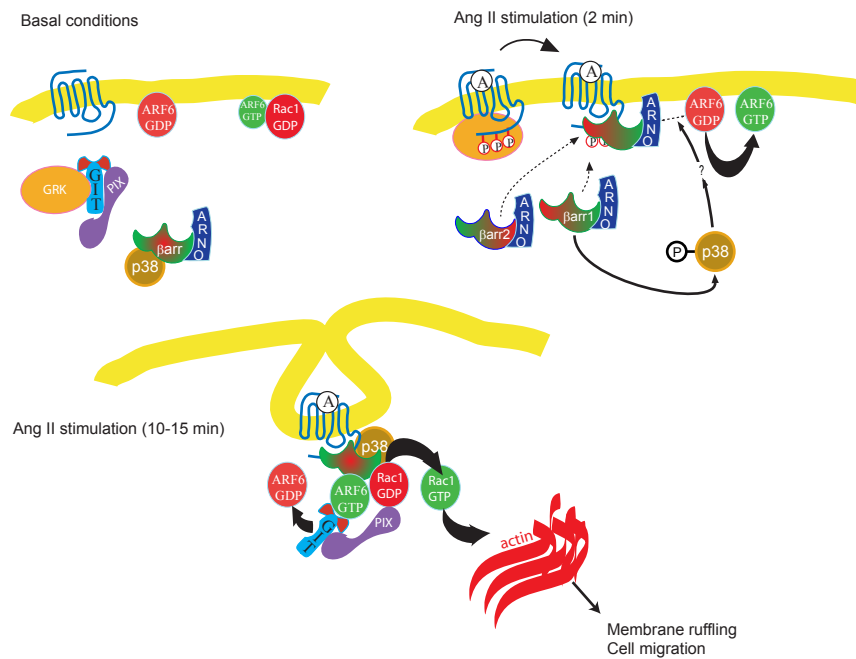


Figure 6 Cotton et al. 2008



**Figure 7: Diagram presenting the potential event chronology linking βarrestins, p38, ARF6 and Rac1 following AT1AR stimulation.** At steady state, arrestins are associated with p38 in the cytoplasm while ARF6 and Rac1 are inactivated at the plasma membrane. During the two first minutes of AT1AR activation by AngII, βarr1 allows p38 to be activated and to dissociate from both arrestins which are recruited to the activated GPCR for its desensitization. In the mean time, p38 phosphorylation leads to the relocalisation of ARF6, which will interact with receptor-associated βarrestins and ARNO, to activate the GTPase. After 10 to 15 minutes, βarrestins, which are internalized with their associated AT1AR, recruit Rac1 to form a complex with the remaining pool of ARF6-GTP. This will promote ARF6 inactivation and Rac1 activation under GIT/PIX control, resulting in cytoskeleton rearrangements such as membrane ruffling.

### III.6. REFERENCES

Ahn, S., Nelson, C. D., Garrison, T. R., Miller, W. E. and Lefkowitz, R. J. (2003). Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1740-4.

Aplin, M., Christensen, G. L., Schneider, M., Heydorn, A., Gammeltoft, S., Kjolbye, A. L., Sheikh, S. P. and Hansen, J. L. (2007). The angiotensin type 1 receptor activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by G protein-dependent and -independent pathways in cardiac myocytes and langendorff-perfused hearts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100, 289-95.

Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J. (2005).  $\beta$ -Arrestin 1 and G $\alpha$ q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* 280, 8041-8050.

Bettinger, B. T. and Amberg, D. C. (2007). The MEK kinases MEK4/Ssk2p facilitate complexity in the stress signaling responses of diverse systems. *J Cell Biochem* 101, 34-43.

Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2001).  $\beta$ -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and  $\beta$  2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276, 42509-13.

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

Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T. and Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 18, 2244-53.

Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A. and Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell* 18, 501-11.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J* 16, 5445-54.

Daher, Z., Noel, J. and Claing, A. (2008). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal* 20, 2256-65.

Daniels, D., Yee, D. K., Faulconbridge, L. F. and Fluharty, S. J. (2005). Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades. *Endocrinology* 146, 5552-60.

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69, 483-510.

Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278, 41573-6.

Fessart, D., Simaan, M. and Laporte, S. A. (2005). c-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with {beta}-Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin-Mediated Internalization. *Mol Endocrinol* 19, 491-503.

Fong, A. M., Premont, R. T., Richardson, R. M., Yu, Y. R., Lefkowitz, R. J. and Patel, D. D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7478-83.

Ge, L., Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J. and DeFea, K. (2004). Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* 279, 55419-24.

Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C. D., Wang, S., Eckhardt, A. E., Cowan, C. L., Spurney, R. F., Luttrell, L. M. et al. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 281, 10856-64.

Gong, K., Li, Z., Xu, M., Du, J., Lv, Z. and Zhang, Y. (2008). A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 283, 29028-36.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-14.

Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J. and Thomas, W. G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol Pharmacol* 61, 768-77.

Houndolo, T., Boulay, P. L. and Claing, A. (2005). G Protein-coupled Receptor Endocytosis in ADP-ribosylation Factor 6-depleted Cells. *J Biol Chem* 280, 5598-5604.

Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D. and Lefkowitz, R. J. (2005). Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* 67, 1229-36.

Lagane, B., Chow, K. Y., Balabanian, K., Levoye, A., Harriague, J., Planchenault, T., Baleux, F., Gunera-Saad, N., Arenzana-Seisdedos, F. and Bachelier, F. (2008). CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 112, 34-44.

Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2449-54.

McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. and Lefkowitz, R. J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-7.

Moore, C. A., Milano, S. K. and Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 451-82.

Poupart, M. E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S. A. and Claing, A. (2007). ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. *Cell Signal* 19, 2370-8.

Scott, M. G., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbe-Jullie, C., Pitcher, J. A. and Marullo, S. (2006). Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol Cell Biol* 26, 3432-45.

Storez, H., Scott, M. G., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M. et al. (2005). Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* 280, 40210-5.

Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L. and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277, 49212-9.

Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* 411, 215-9.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52, 639-72.

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10782-7.

Xu, T. R., Baillie, G. S., Bhari, N., Houslay, T. M., Pitt, A. M., Adams, D. R., Kolch, W., Houslay, M. D. and Milligan, G. (2008). Mutations of beta-arrestin 2 that limit self-association also interfere with interactions with the beta2-adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: implications for beta2-adrenoceptor signalling via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem J* 413, 51-60.

Zoudilova, M., Kumar, P., Ge, L., Wang, P., Bokoch, G. M. and DeFea, K. A. (2007). Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* 282, 20634-46.



## **CHAPITRE IV: DISCUSSION.**

Nos résultats démontrent que la migration cellulaire médiée par la stimulation du AT<sub>1</sub>R émane de l'orchestration immédiate et complexe de plusieurs protéines, telles les arrestines, Rac1, ARF6, PIX et p38. Nous avons montré que les arrestines jouent à la fois le rôle d'intermédiaire de l'activation de ARF6, et celui de protéine d'échafaudage pour l'association de cette dernière à Rac1, afin de réguler son activation.

### **IV.1. LE CONTRÔLE DE ARF6 SUR L'ACTIVITÉ DE RAC1.**

Nous avons pu mettre en évidence le fait que, dans notre modèle de cellules embryonnaires humaines de rein, HEK 293, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> entraîne l'activation de la forme endogène de Rac1 (Fig. 1A, Cotton et al. 2007). Ce phénomène, médié par le récepteur à l'Ang II, avait déjà été observé dans des cellules du muscle lisse vasculaire, qui sont des cellules riches en Rac1 (Schmitz et al., 2001). L'activation que l'on observe est graduelle pour devenir maximale à 60 minutes. Le phénomène perdure ensuite pour de plus longs temps de traitement, allant jusqu'à 4h. Ces résultats suggèrent que l'Ang II est capable d'induire dans les cellules HEK293 l'activation de Rac1 qui est la protéine responsable de changements majeurs de phénotype de par son action sur le réarrangement du cytosquelette d'actine.

Le but de notre étude étant d'investiguer sur la contribution réelle d'ARF6 par rapport à l'activité de Rac1, nous avons donc décidé d'étudier l'influence de l'inhibition de l'expression d'ARF6 sur ce phénomène.

Les données existantes sur ce sujet indiquent que l'activation d'ARF6 est nécessaire à la liaison de GTP sur Rac1 et à son recrutement à la membrane plasmique (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999). De plus, différentes études se contredisent à propos de l'ordre d'activation des

deux protéines (Santy and Casanova, 2001). Il a été montré que le mutant dominant négatif d'ARF6 bloque les effets de l'activation de Rac1 (Zhang et al., 1999) mais que celui-ci, à l'inverse, pouvait inhiber l'activité de la Rho GTPase (Boshans et al., 2000; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Radhakrishna et al., 1999). Il est à noter que ces études ont majoritairement été réalisées à l'aide de mutants d'ARF6 qui ont la capacité de mimer l'une des deux formes prises par la GTPase. L'inconvénient apporté par ces outils d'étude, bien qu'ayant été très utiles dans la compréhension des événements liés aux protéines G monomériques, réside dans le fait qu'ils suppriment une propriété importante de ces protéines. En effet, les GTPases doivent logiquement faire un cycle d'activation/inactivation afin de se retrouver sous forme liée au GTP ou au GDP. Les mutants ne permettent pas ce cycle primordial et immobilisent les protéines dans l'un ou l'autre de ses états, empêchant ainsi toute tentative de régulation fine d'activation. Nous avons donc opté pour une approche considérée plus adéquate qui nous a permis de ne pas interférer avec le comportement de la protéine ciblée. Cette technique, l'interférence à l'ARN, nous a permis d'inhiber spécifiquement et significativement l'expression endogène d'ARF6. De ce fait, il nous a été possible d'étudier l'effet d'un déséquilibre entre nos deux entités d'intérêt, ARF6 et Rac1.

À l'aide de l'essai utilisé précédemment, nous avons pu constater que l'inhibition d'ARF6 entraînait une augmentation drastique de l'activité de Rac1 (Fig. 4A, Cotton et al. 2007). De plus, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> n'a plus d'effet sur l'activation de la GTPase. Ce résultat est surprenant car il remet en cause l'un des fondements établis par les études précédentes, à savoir, qu'ARF6 permet l'activation de Rac1 et que sa présence est obligatoire à ce processus. Au contraire, notre résultat indique que la disparition d'ARF6 est dans l'intérêt de l'activation de Rac1. De plus, nous avons noté que la stimulation du récepteur, lorsque l'expression d'ARF6 est diminuée, n'entraîne pas de différence d'activation de Rac1, qui reste au niveau, déjà élevé, atteint à l'état non stimulé. Il en est de même pour l'apparition des ondulations de

membrane (Fig. 5B, Cotton et al. 2007) et la migration cellulaire (Fig.7, Cotton et al. 2007). Il est donc possible d'avancer que non seulement ARF6 empêche l'activation de Rac1 en conditions basales, mais aussi qu'elle est une intermédiaire permettant l'activation de Rac1, lorsqu'une cellule exprimant le AT<sub>1</sub>R est traitée à l'Ang II.

Le fait que Rac1 soit suractivée en l'absence d'ARF6 reste un point important à étudier. Comme nous l'avons montré, le facteur d'échange pour Rac/Cdc42,  $\beta$ PIX, est recruté du cytoplasme à la membrane plasmique suite à la stimulation du AT<sub>1</sub>R (Fig. 8A,B). Cette observation indique que PIX peut être l'une des GEFs responsables de l'activation de Rac1 dans ces conditions. Lors de la déplétion d'ARF6, cette même GEF est relocalisée à la membrane, de la même manière que sous l'effet du traitement des cellules à l'Ang II (Fig. 8C,D, Cotton et al. 2007). L'une des hypothèses que nous pouvons avancer est que ARF6 joue un rôle sur la localisation de PIX. Le seul lien connu entre ces deux protéines est GIT. Celle-ci est constitutivement associée à PIX sous forme de tétramère (Premont et al., 2004). GIT, en sa qualité de GAP, est supposément associée à ARF6 en conditions basales afin de la maintenir dans un état inactif. Nous sommes alors en droit de penser que l'inhibition de l'expression de ARF6 entraîne de profonds changements quant à la fonction et, par la même occasion, la localisation de GIT dans la cellule. Une étude récente a démontré que GIT peut adopter différentes conformations, « ouverte » ou « fermée ». L'ouverture de la protéine entraîne son recrutement au point d'adhésion focaux et pousse la cellule à migrer (Totaro et al., 2007). Cette dernière entraînant PIX avec elle, la GEF peut ainsi activer Rac1 à ces mêmes sites (ten Klooster et al., 2006). Le lien entre la présence d'ARF6 en cellule et la conformation de GIT reste toutefois à être élucidé. L'autre hypothèse suggérée par nos observations est que l'absence de ARF6 influence l'adhésion de la cellule et la formation des points d'adhésion focaux. En effet, ARF6 est reconnue comme responsable de l'internalisation de certaines intégrines (Pellinen and Ivaska, 2006), et l'absence de la GTPase bloquerait cette endocytose. C'est ce phénomène qui a été

observé, par notre groupe de recherche, dans des cellules endothéliales déplétées en ARF6 (Daher et al., 2008a). Dans cette étude néanmoins, la migration des cellules n'exprimant plus la GTPase fut inhibée tandis que la kinase FAK est suractivée. Comme nous le montrons, les cellules HEK293, bien qu'exprimant la même quantité de ARF6, comportent une plus forte concentration de Rac1 en comparaison aux cellules endothéliales (Fig. 3, Cotton & Claing, 2008). De plus, les HEK293 sont très peu adhérentes (Bledi et al., 2000). Il a été montré, dans des fibroblastes de souris embryonnaires, que FAK phosphoryle  $\beta$ PIX pour recruter Rac1 activée et induire la migration cellulaire (Chang et al., 2007). Dans notre système, FAK serait suractivée en l'absence de ARF6. Étant donné que l'effet de FAK sur l'adhésion est beaucoup moindre que sur l'activité de Rac1 chez les HEK293, ceci expliquerait ainsi le phénotype migratoire non contrôlé que nous observons.

Au regard de ces résultats, nous pouvons déduire que dans notre système, ARF6 est un «frein» à l'activation de Rac1 et la majeure partie de la régulation qui lui est conférée a pour but de brider cette protéine à l'état basal.

#### **IV.2. L'INTERACTION ENTRE RAC1 ET ARF6.**

Lors de cette étude, nous démontrons l'interaction directe entre deux protéines G monomériques, Rac1 et ARF6.

À notre connaissance, aucune étude ne présente d'élément pouvant suggérer qu'il existe une interaction directe entre deux GTPases. Suite au résultat obtenu précédemment, révélant qu'ARF6 règle étroitement l'activité de Rac1, nous avons émis l'hypothèse d'un lien direct entre Rac1 et ARF6. D'abord, à l'aide d'un essai de coprécipitation de protéines purifiées, il nous a été possible d'observer que les deux GTPases peuvent interagir directement (Fig. 3A, Cotton et al. 2007). De plus, le chargement de GDP ou de GTP sur Rac1 change dramatiquement le profil de l'interaction. En effet, la forme liée au

GDP de la protéine ne démontre pas de changement notable d'affinité pour ARF6, tandis que l'ajout de GTP à Rac1 abolit totalement la liaison des deux protéines (Fig. 3B, Cotton et al. 2007). Ce résultat surprenant, associant directement les deux GTPases, nous indique que l'état d'activation de Rac1 est primordial lors de l'association à ARF6. Sur la figure 3C, il est possible de constater qu'au contraire, la forme d'ARF6 liée au GTP possède la meilleure affinité pour Rac1. Nous pouvons donc déduire que, dans ce système *in vitro*, les formes sous lesquelles Rac1 et ARF6 sont retrouvées sont primordiales à l'interaction directe des deux GTPases.

Afin de préciser le résultat obtenu à l'aide des protéines purifiées quant à la plus grande affinité de la forme Rac1<sub>GDP</sub> pour ARF6<sub>GTP</sub>, nous avons surexprimé des mutants mimant les formes possibles de Rac1 et de ARF6. Il apparaît aussi en utilisant cette approche, qu'ARF6 activée interagit préférentiellement avec le mutant qui mime la forme inactive de Rac1 (Fig. 3E, Cotton et al. 2007).

Nous avons donc décidé de vérifier si l'interaction entre les formes endogènes de Rac1 et ARF6 pouvait se retrouver en cellules. La précipitation d'ARF6 nous a permis de retrouver Rac1 associée à celle-ci. Cette interaction augmente lorsque le récepteur AT<sub>1</sub> est stimulé 15 minutes à l'angiotensine II (Fig. 2B, Cotton et al. 2007). Le fait que les deux protéines soient déjà en complexe à l'état basal n'est pas étonnant. En effet, il a été démontré par le passé que ces deux GTPases colocalisent à la membrane plasmique (Radhakrishna et al., 1999). Il nous a aussi été possible de constater dans notre système, en surexprimant Rac1-myc et ARF6-HA, que les deux entités sont recrutées et colocalisent à la membrane plasmique suite au traitement à l'Ang II. Ce résultat, bien que ne permettant pas d'occulter le fait que d'autres protéines soient mises en cause dans l'élaboration d'un complexe, nous permet de valider les données obtenues avec les protéines purifiées. Afin de vérifier l'intégrité de Rac1 de forme surexprimée, nous avons repris l'expérience d'activation de Rac1 réalisée plus tôt, présentée dans la figure 1A (Cotton et al.

2007). La protéine surexprimée Rac1-myc réagit de la même manière que la forme naturellement présente en cellule. En effet, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> entraîne le chargement de GTP sur la protéine. La différence existant entre les deux expériences, réalisées dans les mêmes conditions, est la cinétique d'activation de Rac1. En effet, celle-ci est maximale après une stimulation de 2 minutes (supplementary material Fig1, Cotton et al. 2007), pour rester égale sur de plus longues durées, alors que le pic d'activation de Rac1 endogène se situe à 1h de stimulation. Cette différence peut s'expliquer par le fait que Rac1, étant retrouvée en plus grande quantité, a une probabilité d'être activée plus rapide et élevée que la normale. Dans le cas de ARF6, lorsque la protéine est surexprimée, la cinétique reste la même.

Il nous a aussi été possible d'identifier ARF1 comme nouveau partenaire de Rac (Fig. 3D, Cotton et al. 2007). Cette observation ouvre la voie à une multitude de possibilité d'association entre GTPases, étant donné le très grand nombre de protéines recensé dans la superfamille des GTPases Ras (Wennerberg et al., 2005). Néanmoins, en essai de co-précipitation de protéines purifiées, Rac1 est la seule Rho interagissant avec ARF6 (Fig. 3A, Cotton et al. 2007). La cartographie des sites de liaison entre ces deux protéines G se révèle être un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes de régulation inter-GTPases. En effet, la connaissance précise des sites mis en jeu dans l'association permettra de produire des mutants des GTPases incapables d'interagir entre eux. Ces constructions constitueront des outils de choix quant à la contribution réelle de l'échange entre Rac1 et ARF6. Par exemple, il sera intéressant de vérifier si le mutant de Rac1 aura toujours la possibilité d'être activé suite à la stimulation du AT<sub>1</sub>R ou si, comme dans les cellules n'exprimant pas ARF6, son activité est non contrôlée. Cette donnée nous permettrait d'expliquer plus précisément ce qu'il advient de la contribution réelle de  $\beta$ PIX et de l'adhésion en regard de l'activation de Rac. De même, la génération d'une forme mutante de ARF6 n'interagissant pas avec Rac1 nous permettrait de vérifier le rôle inhibiteur de cette première. En effet, il serait intéressant de vérifier

si l'absence d'ARF6 est la cause du phénotype migratoire, ou s'il est attribuable à l'absence de contrôle négatif sur Rac, même si ARF6 peut être elle-même activée. Enfin, l'identification des sites de liaison entre les deux GTPases pourrait constituer une piste pour le développement à fin thérapeutique d'un inhibiteur pharmacologique se liant spécifiquement à Rac ou ARF6 dans le but d'empêcher leur association sans nécessairement altérer leurs autres fonctions au sein de la cellule.

L'étude de l'interaction entre Rac1 et ARF6 demeure une avenue essentielle à emprunter qui permettra assurément de mieux comprendre l'ensemble des GTPases et leur mode de régulation.

### **IV.3. LE RÔLE DES ARRESTINES DANS LA MIGRATION CELLULAIRE.**

Au cours de ce projet, nous avons décidé de décrire plus précisément les mécanismes moléculaires régulant la migration cellulaire stimulée par l'AngII.

#### **IV.3.1. Le complexe composé de Rac, ARF6 et des arrestines.**

L'interaction entre Rac1 et ARF6 s'effectue de manière directe dans un essai de co-précipitation de protéines purifiées et il est possible de retrouver les deux entités associées par coimmunoprécipitation en cellules. Néanmoins, la présence d'autres protéines dans ce complexe reste une possibilité à envisager. Plusieurs partenaires pour Rac1 et ARF6 ont été identifiés au cours des années, mais l'un d'entre eux, l'arrestine, a retenu notre attention par le fait de son rôle d'échafaudage, dans la migration cellulaire ou encore dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs (Claing et al., 2002).

Dans notre étude nous démontrons que les arrestines sont essentielles à l'association entre Rac1 et ARF6, tant au niveau basal, pour la  $\beta$ arr1, que suite à la stimulation du AT<sub>1</sub>R (Fig. 3, Cotton et al. 2008), pour les deux arrestines. Notre groupe avait déjà démontré l'interaction entre les arrestines et ARF6 (Claing et

al., 2001a). Cette association est entraînée en cellule à la suite de la stimulation du  $\beta_2$ AR, et il apparaît que l'association directe entre ces protéines intervient lorsque ARF6 est sous forme inactive. Dans notre étude, nous avons pu constater que le récepteur AT<sub>1</sub> stimule aussi l'interaction des arrestines et de ARF6, selon deux phases (Fig. 2A Cotton et al. 2008). La première apparaît après 2 minutes de stimulation du récepteur. Si l'on considère toutes les données que nous avons obtenues à ce temps de traitement à l'AngII, nous constatons que cela coïncide avec le moment où ARF6 est activé (Fig.1, Cotton et al. 2007). Sachant que les arrestines sont associées au facteur d'échange des ARFs ARNO, et interagissent avec la forme inactive de ARF6, nous sommes en droit de penser que le recrutement de la GTPase aux arrestines contribue à son activation via ARNO. La seconde phase de l'interaction s'effectue après 10 à 15 minutes de stimulation (Fig. 2A, Cotton et al. 2008). À ce moment, le récepteur s'internalise. Notre groupe a montré récemment que ARF6 est essentielle à l'endocytose des récepteurs (Houndolo et al., 2005) et qu'elle recrute les composantes majeures des vésicules de clathrine (Poupart et al., 2007). Nous avons aussi observé que Rac1 s'associe aux arrestines de manière directe et sous l'égide d'une stimulation de 5 à 15 minutes du AT<sub>1</sub>R (Fig. 2B Cotton et al. 2008). Contrairement à la seconde phase de l'interaction entre ARF6 et les arrestines, le pic d'association est atteint à 10 minutes, suggérant que Rac1 est recrutée en premier dans la cinétique d'établissement du complexe comprenant ARF6 et  $\beta$ arr. C'est ensuite, à 15 minutes post-activation du récepteur, que Rac1<sub>GDP</sub> et ARF6<sub>GTP</sub> s'associent pour permettre l'activation de Rac (Fig. 2, Cotton et al., 2007, Fig. 7, Cotton et al., 2008). L'inhibition de l'expression des arrestines bloque ainsi deux processus primordiaux à l'initiation de l'activation de Rac1 : l'activation de ARF6 (Fig. 1A, Cotton et al.2008) et l'interaction entre Rac et ARF6 (Fig. 3, Cotton et al.2008).



### IV.3.2. Arrestines et ondulations de membrane.

La contribution des arrestines dans l'association entre les deux GTPases mène à l'initiation de l'activation de Rac. L'inhibition de l'expression des deux isoformes de la protéine d'échafaudage empêche l'association de ARF6 à Rac1, qui selon notre modèle, contribue au recrutement de PIX, protéine activatrice de Rac (Fig. 7, Cotton et al. 2008). Plusieurs études avant la nôtre impliquaient les arrestines dans le processus de migration (revues dans Cotton et Claing, 2008). Plus particulièrement, suite à la stimulation du AT<sub>1</sub>R, il a été montré dans les cellules Hep2 que la migration dépendante de l'AngII nécessite les deux isoformes d'arrestine et que celles-ci contribuaient au contrôle de l'initiation des ondulations de membrane via la filamine A et ERK1/2 (Scott et al., 2006). De plus, dans les cellules HEK293, l'inhibition de l'expression de la  $\beta$ arr2 bloque la migration des cellules exprimant le AT<sub>1</sub>R (Hunton et al., 2005). Conformément avec ces travaux, nos résultats démontrent donc que les deux arrestines sont impliquées dans le processus migratoire et permettent de préciser la régulation des mécanismes moléculaires mis en jeu. L'analogue de l'AngII, le AngII-Sar<sup>1</sup>Ile<sup>4</sup>Ile<sup>8</sup> (SII) permet d'activer le AT<sub>1</sub>R afin de recruter les arrestines sans entraîner la signalisation dépendante des protéines G hétérotrimériques (Aplin et al., 2007; Daniels et al., 2005; Holloway et al., 2002; Wei et al., 2003). La stimulation du récepteur avec le SII nous a permis de constater que seul le recrutement des arrestines était nécessaire à l'activation d'ARF6 et à son association avec Rac1 (Fig. 4, Cotton et al., 2008), renforçant une fois encore les observations effectuées à l'aide de l'inhibition de l'expression des  $\beta$ arr. Jusqu'à maintenant, seule l'activation des ERK avaient été étudiée à l'aide de cet analogue, permettant de discerner la contribution de la voie G<sub>q</sub> et celles des arrestines dans cette signalisation. Nos résultats démontrent que le signalosome des arrestines va plus loin que ces MAPKs. Cet outil d'une utilité incontestable va permettre de distinguer tous les effets dépendants des arrestines, autrefois mêlés aux signaux émanant de l'activation des protéines G et ainsi aider à cibler plus

spécifiquement les composantes de la signalisation découlant de l'activation du AT<sub>1</sub>R.

L'utilisation du SII nous a permis de mettre en relief le fait que ARF6 est activée via les arrestines, mais que c'est aussi le cas des MAPKs p38, activées de même après 2 minutes de stimulation du récepteur. Dans l'étude de Hunton et al., les auteurs ont mis en avant le fait que l'inhibition de l'activité de p38, mais pas celle de ERK et PI3K, bloquait la migration des cellules stimulées à l'AngII (Hunton et al., 2005). Nous avons pu éclaircir le niveau de contribution de cette MAPK dans l'initiation du processus migratoire.

#### **IV.4. LE ROLE DE P38 DANS LA MIGRATION.**

##### **IV.4.1. Le rôle de p38 dans la régulation du complexe entre Rac1 et ARF6.**

Afin de mettre en évidence la contribution de p38 lors de l'initiation de la formation des ondulations de membrane, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de la MAPK, le SB220025. Cet outil nous a permis de constater que la phosphorylation de p38 est une étape importante, faisant suite à la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>, pour l'activation de Rac1 et la formation des ondulations de membrane (Fig. 5C, D, Cotton et al. 2008). En conséquence de son activation, p38 va permettre à ARF6 d'être recrutée aux arrestines puis, supposément par l'intermédiaire de ARNO, d'être activée (Fig. 5B, Cotton et al. 2008). Ces données sont corrélées par le fait qu'en l'absence d'activation de p38, bien que les arrestines puissent recruter Rac1 et ARF6, l'association des deux GTPases est impossible (Fig. 6, Cotton et al. 2008). Ces résultats confirment l'importance de l'état d'activation de ARF6 lors de la formation du complexe avec Rac1, et cela, même si leur protéine d'échafaudage est exprimée. Cette observation démontre très bien les limites d'utilisation de certains systèmes *in vitro*. En effet, les essais de coprécipitations de protéines purifiées nous ont permis de vérifier que les deux GTPases ont la capacité physique d'interagir directement (Fig. 3, Cotton et al. 2007) et que la  $\beta$ arr1 est capable de

potentialiser cette association. Les études effectuées en cellules démontrent que l'on ne peut pas simplifier autant ce système hautement régulé et les informations obtenues se doivent d'être vérifiées dans un contexte contrôlé par l'activation du récepteur AT<sub>1</sub> et dans lequel tous les partenaires nécessaires à la transduction du signal sont présents.

#### **IV.4.2. Le lien entre p38 et les arrestines.**

Il nous a été possible de voir que p38 est associée à l'état basal avec les arrestines. Elles se dissocient ensuite transitoirement pendant un laps de temps qui semble correspondre au recrutement des arrestines au récepteur et à la membrane. En effet, après 5 à 10 minutes de stimulation du récepteur, le complexe est réinitialisé (Fig. 6, Cotton et al. 2008). Ce résultat sous-entend qu'à l'état basal, l'activation de p38 est empêchée par la liaison aux arrestines et que la dissociation du complexe permet à la MAPK d'être phosphorylée. Cette hypothèse serait corroborée par le fait que l'ajout de SB220025 empêche toute interaction p38/ $\beta$ arr, révélant une compétition entre l'inhibiteur et les arrestines pour la liaison à p38. Néanmoins, l'inhibition de l'expression des arrestines révèle d'une part que seul  $\beta$ arr1 est responsable de l'activation de p38 et que, par conséquent, la MAPK ne se retrouve en aucun cas suractivée dans ces conditions. Ce résultat indique donc que  $\beta$ arr1 est nécessaire à l'activité de p38, sous-entendant que cette première doit recruter une kinase activatrice de p38. Les études reliant les arrestines aux MAPK ont jusqu'alors montré que la stimulation du AT<sub>1</sub>R entraîne la formation de complexes composés de  $\beta$ arr2, ERK2 et Raf-1 (Luttrell et al., 2001), et de  $\beta$ arr2, JNK3 et ASK-1 (McDonald et al., 2000). Nos travaux apportent une alternative sur le rôle des arrestines quant à l'activation des MAPKs, proposant le concept d'un complexe arrestine/MAPK préformé et servant à recruter les kinases activatrices de p38. Déterminer quelles entités peuvent ainsi être recrutées et le rôle exacte de la  $\beta$ arr2, interagissant elle aussi avec p38, reste un point important à explorer.

La relocalisation des arrestines suite à l'activation du RCPG est inchangée quelque soit l'activité de p38, indiquant que la MAPK n'influence pas la désensibilisation ni l'internalisation du récepteur. Il est ainsi possible de disséquer encore plus précisément la contribution de chaque protéine. Dans ce contexte d'absence de phosphorylation de p38, ARF6 ne peut interagir en phase précoce avec  $\beta$ arr, bloquant par le fait même son activation. Néanmoins, il semble que la GTPase puisse toujours jouer son rôle dans l'internalisation et recruter AP-2 et clathrine (Poupart et al., 2007). En d'autres termes, bloquer l'activité de p38 revient à inhiber spécifiquement la formation du complexe Rac1/ARF6 sans toutefois altérer l'effet des arrestines et de ARF6 sur la régulation des récepteurs.

L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de p38 reste toutefois une méthode grossière d'étudier la contribution de cette MAPK. En effet, il n'est pas possible de distinguer la contribution de chaque isoforme de cette kinase. Le SB220025 inhibe de manière équivalente p38 $\alpha$  et p38 $\beta$ , sans avoir d'effet sur p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  (Kumar et al., 1997), ce qui nous permet d'écarter ces deux dernières isoformes de notre système. Récemment, Gong et al. ont déterminé que la stimulation du  $\beta_2$ AR entraîne l'activation de p38 et ceci, de manière similaire à ce que l'on voit avec le AT $_1$ R (Gong et al., 2008). Ces auteurs ont observé une activation biphasique de p38, avec un premier pic à 10 minutes, dépendant de  $\beta$ arr1 exclusivement, et un deuxième à 90 minutes, dépendant de la PKA. En plus, en utilisant des siRNAs dirigés contre les p38 $\alpha$  et  $\beta$ , ils ont déterminé que les deux isoformes étaient impliquées sans discernement dans le processus d'activation. Étant donné que le  $\beta_2$ AR est un récepteur de classe A, à la différence du AT $_1$ R, qui est de classe B, concernant leur affinité pour les arrestines (Oakley et al., 2000), il n'est peut être pas étonnant de voir des différences cinétiques en comparant nos travaux à ceux de Gong et ses collègues. Néanmoins, le fait que dans les deux groupes, nous observions la même dépendance de p38 à  $\beta$ arr1 pour son activation, nous suggère une redondance du mécanisme, qu'il faudrait alors vérifier avec d'autres récepteurs.

#### IV.5. CONCLUSION GÉNÉRALE.

Nous avons démontré dans cette étude, que ARF6 est un régulateur de Rac1, bel et bien situé en amont de celle-ci. La fonction endogène d'ARF6 en condition non-stimulée se révèle être d'inhiber l'activité de Rac. Lorsqu'un signal extracellulaire, comme la stimulation par l'Ang II du récepteur AT<sub>1</sub>, entraîne l'activation d'ARF6, cette dernière permet à Rac1 d'être activée et d'induire la formation de lamellipodes et d'ondulations de membrane. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ARF6 mène à une suractivation de Rac1 dépendante de PIX. ARF6, qui a la possibilité d'interagir directement avec la forme inactive de Rac, séquestre celle-ci à l'état basal, et logiquement, n'entraîne pas sa localisation à un hypothétique front de migration. De plus, nous avons montré le rôle prépondérant des arrestines dans l'initiation de l'activation de ARF6, par l'intermédiaire de p38. L'activation de la GTPase se révèle être une condition *sine qua non* à l'interaction avec Rac1, mais les arrestines jouent un rôle tout aussi important en servant de protéine d'échafaudage à ce complexe. Enfin, les arrestines sont étroitement liées à p38 dans le but de réguler son activation.

Ces résultats importants ouvrent la voie à l'étude des signaux découlant de l'activation de Rac1. En effet, les partenaires de cette GTPase, mis en cause lors de la migration cellulaire doivent subir entre autre, une régulation dépendante elle aussi d'ARF6 et des arrestines. Le rôle de ces protéines dans d'autres types cellulaires est l'un des autres aspects fondamentaux à étudier. Une cellule cancéreuse est bien sûr différente d'une cellule épithéliale saine, qui l'est encore plus, d'une cellule leucocytaire. La variation dans la nature des protéines exprimées et leur niveau d'expression engendre des signalisations différentes. Il est donc primordial, dans le cas de pathologies liées à l'activité des GTPases, de comprendre l'effet que peut avoir un déséquilibre de l'activité et de l'expression de celles-ci, mais surtout, de mettre en place des traitements localisés au niveau tissulaire, qui pourront ainsi prendre en compte la diversité

intrinsèque des cellules de l'organisme. La compréhension des mécanismes moléculaires régulant la migration cellulaire est donc un enjeu important dans le contrôle de la migration des cellules cancéreuses métastatiques, des cellules immunitaires ou encore dans le processus de guérison de plaie.

## V.6. RÉFÉRENCES.

- Agenes, F., Bosco, N., Mascarell, L., Fritah, S. and Ceredig, R.** (2005). Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4+ naive and regulatory T cells. *Immunology* **115**, 179-88.
- Ahn, S., Nelson, C. D., Garrison, T. R., Miller, W. E. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1740-4.
- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T. R. and Lefkowitz, R. J.** (2004). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem* **279**, 7807-11.
- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N. N. and Donaldson, J. G.** (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol Cell Biol* **20**, 5998-6007.
- Albertinazzi, C., Za, L., Paris, S. and de Curtis, I.** (2003). ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* **14**, 1295-307.
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. and Jones, G. E.** (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* **141**, 1147-57.
- Ally, R. A., Ives, K. L., Traube, E., Eltounsi, I., Chen, P. W., Cahill, P. J., Battey, J. F., Hellmich, M. R. and Kroog, G. S.** (2003). Agonist- and protein kinase C-induced phosphorylation have similar functional consequences for gastrin-releasing peptide receptor signaling via Gq. *Mol Pharmacol* **64**, 890-904.
- Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. and Ringe, D.** (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-8.
- Andreev, J., Simon, J. P., Sabatini, D. D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P. A. and Schlessinger, J.** (1999). Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol* **19**, 2338-50.
- Aplin, M., Christensen, G. L., Schneider, M., Heydorn, A., Gammeltoft, S., Kjolbye, A. L., Sheikh, S. P. and Hansen, J. L.** (2007). The angiotensin type 1 receptor activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by G protein-dependent and -independent pathways in cardiac myocytes and langendorff-perfused hearts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **100**, 289-95.
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y. and Kaibuchi, K.** (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* **275**, 23973-80.
- Arriza, J. L., Dawson, T. M., Simerly, R. B., Martin, L. J., Caron, M. G., Snyder, S. H. and Lefkowitz, R. J.** (1992). The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J Neurosci* **12**, 4045-55.
- Aspenstrom, P.** (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 95-102.

**Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* **267**, 17882-90.

**Austin, C., Boehm, M. and Tooze, S. A.** (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* **41**, 4669-77.

**Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. and Cerione, R. A.** (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* **274**, 22393-400.

**Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L. and Cerione, R. A.** (1998). A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* **273**, 23633-6.

**Baird, D., Feng, Q. and Cerione, R. A.** (2005). The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* **15**, 1-10.

**Balasubramanian, N., Scott, D. W., Castle, J. D., Casanova, J. E. and Schwartz, M. A.** (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol* **9**, 1381-91.

**Barak, L. S., Tiberi, M., Freedman, N. J., Kwatra, M. M., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G.** (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* **269**, 2790-5.

**Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J.** (2005a). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-50.

**Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J.** (2005b). {beta}-Arrestin 1 and G{alpha}q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-8050.

**Barnett, M. E., Madgwick, D. K. and Takemoto, D. J.** (2007). Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal* **19**, 1820-9.

**Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G.** (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**, 261-73.

**Bender, A. and Pringle, J. R.** (1989). Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9976-80.

**Beningo, K. A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J. V. and Wang, Y. L.** (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* **153**, 881-8.

**Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8879-82.

**Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1991).



Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J Biol Chem* **266**, 14939-46.

**Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* **260**, 7094-101.

**Bergmann, S., Junker, K., Henklein, P., Hollenberg, M. D., Settmacher, U. and Kaufmann, R.** (2006). PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncol Rep* **15**, 889-93.

**Berk, B. C.** (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* **81**, 999-1030.

**Berridge, M. J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-25.

**Berthebaud, M., Riviere, C., Jarrier, P., Foudi, A., Zhang, Y., Compagno, D., Galy, A., Vainchenker, W. and Louache, F.** (2005). RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* **106**, 2962-8.

**Bettinger, B. T. and Amberg, D. C.** (2007). The MEK kinases MEKK4/Ssk2p facilitate complexity in the stress signaling responses of diverse systems. *J Cell Biochem* **101**, 34-43.

**Betuing, S., Daviaud, D., Pages, C., Bonnard, E., Valet, P., Lafontan, M. and Saulnier-Blache, J. S.** (1998). Gbeta gamma-independent coupling of alpha2-adrenergic receptor to p21(rhoA) in preadipocytes. *J Biol Chem* **273**, 15804-10.

**Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C. and Huttenlocher, A.** (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci* **115**, 3415-25.

**Bhattacharya, M., Anborgh, P. H., Babwah, A. V., Dale, L. B., Dobransky, T., Benovic, J. L., Feldman, R. D., Verdi, J. M., Rylett, R. J. and Ferguson, S. S.** (2002). Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* **4**, 547-55.

**Bhola, N. E. and Grandis, J. R.** (2008). Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci* **13**, 1857-65.

**Bian, D., Mahanivong, C., Yu, J., Frisch, S. M., Pan, Z. K., Ye, R. D. and Huang, S.** (2006). The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene* **25**, 2234-44.

**Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.

**Bledi, Y., Domb, A. J. and Linial, M.** (2000). Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer. *Brain Res Brain Res Protoc* **5**, 282-9.

**Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G. and Lin, F. T.** (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* **286**, 2495-8.

**Bonifacino, J. S. and Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.

**Bos, J. L., de Rooij, J. and Reedquist, K. A.** (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 369-77.

**Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C.** (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* **20**, 3685-94.

**Bouschet, T., Martin, S., Kanamarlapudi, V., Mundell, S. and Henley, J. M.** (2007). The calcium-sensing receptor changes cell shape via a beta-arrestin-1 ARNO ARF6 ELMO protein network. *J Cell Sci* **120**, 2489-97.

**Bowman, E. P., Campbell, J. J., Drucey, K. M., Scheschonka, A., Kehrl, J. H. and Butcher, E. C.** (1998). Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. *J Biol Chem* **273**, 28040-8.

**Braga, V. M. and Yap, A. S.** (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 466-74.

**Broussard, J. A., Webb, D. J. and Kaverina, I.** (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 85-90.

**Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. and Donaldson, J. G.** (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* **154**, 1007-17.

**Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. and Sternweis, P. C.** (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-44.

**Brown, M. C., Cary, L. A., Jamieson, J. S., Cooper, J. A. and Turner, C. E.** (2005). Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell* **16**, 4316-28.

**Brown, M. T., Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J. G., Cooper, J. A. and Randazzo, P. A.** (1998). ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. *Mol Cell Biol* **18**, 7038-51.

**Burger, J. A. and Kipps, T. J.** (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**, 1761-7.

**Cant, S. H. and Pitcher, J. A.** (2005). G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **16**, 3088-99.

**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 G $\alpha$ (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**, 34483-92.

**Carragher, N. O. and Frame, M. C.** (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* **14**, 241-9.

**Cassimeris, L.** (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 18-24.

**Castro, M., Dicker, F., Vilardaga, J. P., Krasel, C., Bernhardt, M. and Lohse, M. J.** (2002). Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology* **143**, 3854-65.

- Cau, J. and Hall, A.** (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* **118**, 2579-87.
- Caunt, C. J., Finch, A. R., Sedgley, K. R., Oakley, L., Luttrell, L. M. and McArdle, C. A.** (2006). Arrestin-mediated ERK activation by gonadotropin-releasing hormone receptors: receptor-specific activation mechanisms and compartmentalization. *J Biol Chem* **281**, 2701-10.
- Chaki, S. and Inagami, T.** (1992). A newly found angiotensin II receptor subtype mediates cyclic GMP formation in differentiated Neuro-2A cells. *Eur J Pharmacol* **225**, 355-6.
- Chan, A. Y., Coniglio, S. J., Chuang, Y. Y., Michaelson, D., Knaus, U. G., Philips, M. R. and Symons, M.** (2005). Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* **24**, 7821-9.
- Chandrasekar, B., Marelli-Berg, F. M., Tone, M., Bysani, S., Prabhu, S. D. and Murray, D. R.** (2004). Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 304-11.
- Chang, F., Lemmon, C. A., Park, D. and Romer, L. H.** (2007). FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for betaPIX. *Mol Biol Cell* **18**, 253-64.
- Chao, T. H., Hayashi, M., Tapping, R. I., Kato, Y. and Lee, J. D.** (1999). MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 36035-8.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. and Chabre, M.** (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-4.
- Chen, C. K., Burns, M. E., Spencer, M., Niemi, G. A., Chen, J., Hurley, J. B., Baylor, D. A. and Simon, M. I.** (1999). Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3718-22.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T. et al.** (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* **10**, 758-65.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linnquist, D., Campbell, K., Zheng, Y. and Kuan, C. Y.** (2007a). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* **27**, 3884-93.
- Chen, M., Towers, L. N. and O'Connor, K. L.** (2007b). LPA2 (EDG4) mediates Rho-dependent chemotaxis with lower efficacy than LPA1 (EDG2) in breast carcinoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1927-33.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. et al.** (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-65.

- Cho, E. Y., Cho, D. I., Park, J. H., Kurose, H., Caron, M. G. and Kim, K. M.** (2007). Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Mol Endocrinol* **21**, 2242-54.
- Chuang, T. T., LeVine, H., 3rd and De Blasi, A.** (1995). Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* **270**, 18660-5.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J.** (2001a). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 42509-13.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J.** (2001b). Beta arrestin-mediated ARF6 activation and beta2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **30**, 30.
- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**, 61-79.
- Clark, R. B., Kunkel, M. W., Friedman, J., Goka, T. J. and Johnson, J. A.** (1988). Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1442-6.
- Cockcroft, S., Thomas, G. M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O. and Hsuan, J. J.** (1994). Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**, 523-6.
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T. and Donaldson, J. G.** (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* **18**, 2244-53.
- Condeelis, J., Singer, R. H. and Segall, J. E.** (2005). The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 695-718.
- Cong, M., Perry, S. J., Lin, F. T., Fraser, I. D., Hu, L. A., Chen, W., Pitcher, J. A., Scott, J. D. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* **276**, 15192-9.
- Conner, D. A., Mathier, M. A., Mortensen, R. M., Christe, M., Vatner, S. F., Seidman, C. E. and Seidman, J. G.** (1997). beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **81**, 1021-6.
- Corre, I., Baumann, H. and Hermouet, S.** (1999). Regulation by Gi2 proteins of v-fms-induced proliferation and transformation via Src-kinase and STAT3. *Oncogene* **18**, 6335-42.
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A. and Claing, A.** (2007a). Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration. *Mol Biol Cell* **18**, 501-511.
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A. and Claing, A.** (2007b). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell* **18**, 501-11.

**Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K. and Brakebusch, C.** (2005). Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell* **16**, 4473-84.

**D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L.** (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J* **16**, 5445-54.

**D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-58.

**D'Souza-Schorey, C. and Stahl, P. D.** (1995). Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp Cell Res* **221**, 153-9.

**Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 685-8.

**Daher, Z., Noel, J. and Claing, A.** (2008a). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal* **20**, 2256-65.

**Daher, Z., Noel, J. and Claing, A.** (2008b). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal*.

**Dang, P. M., Cross, A. R., Quinn, M. T. and Babior, B. M.** (2002). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4262-5.

**Daniels, D., Yee, D. K., Faulconbridge, L. F. and Fluharty, S. J.** (2005). Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades. *Endocrinology* **146**, 5552-60.

**Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. and Hall, A.** (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**, 1677-80.

**Davis, R. J.** (1999). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64**, 1-12.

**de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T.** (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415-72.

**de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K. J., Chiu, A. T., Drew, M., Goodfriend, T., Harding, J. W., Inagami, T. and Timmermans, P. B.** (1995). Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**, 924-7.

**De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. and Farquhar, M. G.** (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 235-71.

**DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O. and Bunnnett, N. W.** (2000a). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11086-91.

**DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. and Bunnnett, N. W.** (2000b). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated

receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**, 1267-81.

**DeMali, K. A., Barlow, C. A. and Burridge, K.** (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* **159**, 881-91.

**DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R. and Condeelis, J.** (2005). Cofilin takes the lead. *J Cell Sci* **118**, 19-26.

**DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K.** (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.

**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**, 25266-72.

**Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I.** (2000). p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol* **2**, 521-30.

**Dinauer, M. C.** (2003). Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr Opin Hematol* **10**, 8-15.

**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**, 5049-58.

**Donaldson, J. G.** (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.

**Donaldson, J. G. and Jackson, C. L.** (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 475-82.

**Dormann, D. and Weijer, C. J.** (2003). Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 358-64.

**Dulac, C. and Axel, R.** (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206.

**Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. and Kirschner, M. W.** (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-3.

**Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. and Gill, G. N.** (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-9.

**Elferink, J. G. and de Koster, B. M.** (1997). The stimulation of human neutrophil migration by angiotensin IL: its dependence on Ca<sup>2+</sup> and the involvement of cyclic GMP. *Br J Pharmacol* **121**, 643-8.

**Erwig, L. P. and Henson, P. M.** (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **15**, 243-50.

**Estes, J. D., Thacker, T. C., Hampton, D. L., Kell, S. A., Keele, B. F., Palenske, E. A., Druet, K. M. and Burton, G. F.** (2004). Follicular dendritic cell regulation of CXCR4-mediated germinal center CD4 T cell migration. *J Immunol* **173**, 6169-78.

**Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.

- Eva, A. and Aaronson, S. A.** (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316**, 273-5.
- Ezratty, E. J., Partridge, M. A. and Gundersen, G. G.** (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* **7**, 581-90.
- Fang, Z., Miao, Y., Ding, X., Deng, H., Liu, S., Wang, F., Zhou, R., Watson, C., Fu, C., Hu, Q. et al.** (2006). Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1437-49.
- Felder, R. A., Sanada, H., Xu, J., Yu, P. Y., Wang, Z., Watanabe, H., Asico, L. D., Wang, W., Zheng, S., Yamaguchi, I. et al.** (2002). G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3872-7.
- Feng, Q., Baird, D. and Cerione, R. A.** (2004). Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/ $\alpha$ -Pix. *Embo J* **23**, 3492-504.
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G.** (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**, 363-6.
- Ferrari, S. L., Pierroz, D. D., Glatt, V., Goddard, D. S., Bianchi, E. N., Lin, F. T., Manen, D. and Bouxsein, M. L.** (2005). Bone response to intermittent parathyroid hormone is altered in mice null for  $\beta$ -Arrestin2. *Endocrinology* **146**, 1854-62.
- Fessart, D., Simaan, M. and Laporte, S. A.** (2005). c-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with  $\beta$ -Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin-Mediated Internalization. *Mol Endocrinol* **19**, 491-503.
- Fiegen, D., Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R. and Ahmadian, M. R.** (2004). Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* **279**, 4743-9.
- Fischer, A. M., Mercer, J. C., Iyer, A., Ragin, M. J. and August, A.** (2004). Regulation of CXC chemokine receptor 4-mediated migration by the Tec family tyrosine kinase ITK. *J Biol Chem* **279**, 29816-20.
- Flanders, J. A., Feng, Q., Bagrodia, S., Laux, M. T., Singavarapu, A. and Cerione, R. A.** (2003). The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. *FEBS Lett* **550**, 119-23.
- Fleming, I. N., Elliott, C. M. and Exton, J. H.** (1996). Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **271**, 33067-73.
- Flower, D. R.** (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 207-34.
- Fong, A. M., Premont, R. T., Richardson, R. M., Yu, Y. R., Lefkowitz, R. J. and Patel, D. D.** (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7478-83.
- Franco, M., Peters, P. J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J* **18**, 1480-91.

**Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. and Huttenlocher, A.** (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* **6**, 977-83.

**Frank, S., Upender, S., Hansen, S. H. and Casanova, J. E.** (1998a). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem* **273**, 23-7.

**Frank, S. R., Adelstein, M. R. and Hansen, S. H.** (2006). GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *Embo J* **25**, 1848-59.

**Frank, S. R., Hatfield, J. C. and Casanova, J. E.** (1998b). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell* **9**, 3133-46.

**Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. and Schioth, H. B.** (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-72.

**Friedl, P. and Wolf, K.** (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-74.

**Fritz, G., Just, I. and Kaina, B.** (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**, 682-7.

**Fukata, M., Nakagawa, M. and Kaibuchi, K.** (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 590-7.

**Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F. and Kaibuchi, K.** (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**, 873-85.

**Fukuhara, S., Marinissen, M. J., Chiariello, M. and Gutkind, J. S.** (2000). Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves Galpha q and Galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway. *J Biol Chem* **275**, 21730-6.

**Gaidarov, I., Krupnick, J. G., Falck, J. R., Benovic, J. L. and Keen, J. H.** (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *Embo J* **18**, 871-81.

**Gainetdinov, R. R., Bohn, L. M., Walker, J. K., Laporte, S. A., Macrae, A. D., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Premont, R. T.** (1999). Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* **24**, 1029-36.

**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**, 778-86.

**Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B. and Pei, G.** (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell* **14**, 303-17.

**Garcia-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R. and Teixido, J.** (2005). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Mol Biol Cell* **16**, 3223-35.



**Gardiner, E. M., Pestonjamas, K. N., Bohl, B. P., Chamberlain, C., Hahn, K. M. and Bokoch, G. M.** (2002). Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr Biol* **12**, 2029-34.

**Garrett, M. D., Major, G. N., Totty, N. and Hall, A.** (1991). Purification and N-terminal sequence of the p21rho GTPase-activating protein, rho GAP. *Biochem J* **276** ( Pt 3), 833-6.

**Garrett, M. D., Self, A. J., van Oers, C. and Hall, A.** (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* **264**, 10-3.

**Ge, L., Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J. and DeFea, K.** (2004). Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* **279**, 55419-24.

**Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C. D., Wang, S., Eckhardt, A. E., Cowan, C. L., Spurney, R. F., Luttrell, L. M. et al.** (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **281**, 10856-64.

**Gether, U.** (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.

**Geyer, M. and Wittinghofer, A.** (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 786-92.

**Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S.** (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743-6.

**Glaven, J. A., Whitehead, I., Bagrodia, S., Kay, R. and Cerione, R. A.** (1999). The Dbl-related protein, Lfc, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells. *J Biol Chem* **274**, 2279-85.

**Gloriam, D. E., Fredriksson, R. and Schioth, H. B.** (2007). The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **8**, 338.

**Gohla, A., Harhammer, R. and Schultz, G.** (1998). The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* **273**, 4653-9.

**Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-48.

**Gong, K., Li, Z., Xu, M., Du, J., Lv, Z. and Zhang, Y.** (2008). A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **283**, 29028-36.

**Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. and Keen, J. H.** (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**, 15017-22.

**Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L.** (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-50.

- Graf, K., Neuss, M., Stawowy, P., Hsueh, W. A., Fleck, E. and Law, R. E.** (2000). Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension* **35**, 978-84.
- Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B. and Alexander, R. W.** (1997). Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* **29**, 366-73.
- Gruning, W., Arnould, T., Jochimsen, F., Sellin, L., Ananth, S., Kim, E. and Walz, G.** (1999). Modulation of renal tubular cell function by RGS3. *Am J Physiol* **276**, F535-43.
- Gschwind, A., Prenzel, N. and Ullrich, A.** (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res* **62**, 6329-36.
- Gurevich, V. V. and Benovic, J. L.** (1992). Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem* **267**, 21919-23.
- Gurevich, V. V. and Benovic, J. L.** (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* **268**, 11628-38.
- Haas, A. L., Warms, J. V., Hershko, A. and Rose, I. A.** (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* **257**, 2543-8.
- Haataja, L., Groffen, J. and Heisterkamp, N.** (1997). Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* **272**, 20384-8.
- Haendeler, J., Yin, G., Hojo, Y., Saito, Y., Melaragno, M., Yan, C., Sharma, V. K., Heller, M., Aebersold, R. and Berk, B. C.** (2003). GIT1 mediates Src-dependent activation of phospholipase Cgamma by angiotensin II and epidermal growth factor. *J Biol Chem* **278**, 49936-44.
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. and Mak, T. W.** (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* **19**, 1974-9.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.
- Han, G., Fan, B., Zhang, Y., Zhou, X., Wang, Y., Dong, H., Wei, Y., Sun, S., Hu, M., Zhang, J. et al.** (2008). Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells. *Oncol Rep* **20**, 929-39.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hardy, A. R., Conley, P. B., Luo, J., Benovic, J. L., Poole, A. W. and Mundell, S. J.** (2005). P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood* **105**, 3552-60.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A. and Zheng, Y.** (1994). Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* **269**, 62-5.
- Hart, M. J., Sharma, S., elMasry, N., Qiu, R. G., McCabe, P., Polakis, P. and Bollag, G.** (1996). Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J Biol Chem* **271**, 25452-8.

- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A. and Sabe, H.** (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6647-52.
- Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**, 12657-65.
- Hausdorff, W. P., Campbell, P. T., Ostrowski, J., Yu, S. S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1991). A small region of the beta-adrenergic receptor is selectively involved in its rapid regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2979-83.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* **4**, 2881-9.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Nauseef, W. M., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Rosen, H. and Clark, R. A.** (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest* **87**, 352-6.
- Hla, T.** (2004). Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 513-20.
- Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J. and Thomas, W. G.** (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol Pharmacol* **61**, 768-77.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. et al.** (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-32.
- Hosaka, M., Toda, K., Takatsu, H., Torii, S., Murakami, K. and Nakayama, K.** (1996). Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J Biochem* **120**, 813-9.
- Houndolo, T., Boulay, P. L. and Claing, A.** (2005). G Protein-coupled Receptor Endocytosis in ADP-ribosylation Factor 6-depleted Cells. *J Biol Chem* **280**, 5598-5604.
- Hsia, J. A., Moss, J., Hewlett, E. L. and Vaughan, M.** (1984). ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* **259**, 1086-90.
- Hu, K., Ji, L., Applegate, K. T., Danuser, G. and Waterman-Storer, C. M.** (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* **315**, 111-5.
- Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D.** (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-28.
- Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D. and Lefkowitz, R. J.** (2005a). Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* **67**, 1229-36.

- Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D. and Lefkowitz, R. J.** (2005b).  $\beta$ -arrestin 2 Dependent AT1A Receptor Mediated Pathway of Chemotaxis. *Mol Pharmacol*.
- Hur, E. M. and Kim, K. T.** (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**, 397-405.
- Hurst, J. H., Henkel, P. A., Brown, A. L. and Hooks, S. B.** (2008). Endogenous RGS proteins attenuate G $\alpha$ (i)-mediated lysophosphatidic acid signaling pathways in ovarian cancer cells. *Cell Signal* **20**, 381-9.
- Hwang, S. L., Hong, Y. R., Sy, W. D., Lieu, A. S., Lin, C. L., Lee, K. S. and Howng, S. L.** (2004). Rac1 gene mutations in human brain tumours. *Eur J Surg Oncol* **30**, 68-72.
- Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N. A. and Alexander, R. W.** (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* **96**, 467-75.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. and Yamamoto, T.** (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**, 539-44.
- Inglese, J., Glickman, J. F., Lorenz, W., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1992). Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/ $\alpha$ -carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J Biol Chem* **267**, 1422-5.
- Ishii, M. and Kurachi, Y.** (2003). Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci* **74**, 163-71.
- Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M.** (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **22**, 6582-91.
- Iwai, N. and Inagami, T.** (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* **298**, 257-60.
- Jackson, C. L. and Casanova, J. E.** (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-7.
- Jackson, T. R., Brown, F. D., Nie, Z., Miura, K., Feroni, L., Sun, J., Hsu, V. W., Donaldson, J. G. and Randazzo, P. A.** (2000). ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J Cell Biol* **151**, 627-38.
- Jaffe, A. B. and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.
- Jezyk, M. R., Snyder, J. T., Gershberg, S., Worthylake, D. K., Harden, T. K. and Sondek, J.** (2006). Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- $\beta$ 2. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1135-40.
- Jimenez-Sainz, M. C., Murga, C., Kavelaars, A., Jurado-Pueyo, M., Krakstad, B. F., Heijnen, C. J., Mayor, F., Jr. and Aragay, A. M.** (2006). G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell* **17**, 25-31.
- Jones, N. P. and Katan, M.** (2007). Role of phospholipase C $\gamma$ 1 in cell spreading requires association with a  $\beta$ -Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* **27**, 5790-805.

- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C. and Chastre, E.** (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835-9.
- Kahn, R. A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R. C., Munro, S. and Schurmann, A.** (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J Cell Biol* **172**, 645-50.
- Kahn, R. A. and Gilman, A. G.** (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* **261**, 7906-11.
- Kaslow, H. R. and Burns, D. L.** (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *Faseb J* **6**, 2684-90.
- Kater, S. B. and Rehder, V.** (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 68-74.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J. V.** (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* **146**, 1033-44.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. and Kaibuchi, K.** (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* **147**, 1023-38.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O. and Akiyama, T.** (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* **289**, 1194-7.
- Kelly, E., Bailey, C. P. and Henderson, G.** (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S379-88.
- Kim, J., Zhang, L., Peppel, K., Wu, J. H., Zidar, D. A., Brian, L., DeWire, S. M., Exum, S. T., Lefkowitz, R. J. and Freedman, N. J.** (2008). Beta-arrestins regulate atherosclerosis and neointimal hyperplasia by controlling smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* **103**, 70-9.
- Kim, S. and Iwao, H.** (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* **52**, 11-34.
- Kim, S., Kim, T., Lee, D., Park, S. H., Kim, H. and Park, D.** (2000). Molecular cloning of neuronally expressed mouse betaPix isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 721-5.
- Kim, S., Ko, J., Shin, H., Lee, J. R., Lim, C., Han, J. H., Altrock, W. D., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D., Premont, R. T. et al.** (2003). The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo. *J Biol Chem* **278**, 6291-300.
- Kingsmore, S. F., Peppel, K., Suh, D., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Seldin, M. F.** (1995). Genetic mapping of the beta-arrestin 1 and 2 genes on mouse chromosomes 7 and 11 respectively. *Mamm Genome* **6**, 306-7.
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B. and Herzog, V.** (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *Eur J Cell Biol* **83**, 717-24.
- Kissil, J. L., Walmsley, M. J., Hanlon, L., Haigis, K. M., Bender Kim, C. F., Sweet-Cordero, A., Eckman, M. S., Tuveson, D. A., Capobianco, A. J., Tybulewicz,**

**V. L. et al.** (2007). Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res* **67**, 8089-94.

**Klabunde, T. and Hessler, G.** (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* **3**, 928-44.

**Koh, C. G., Manser, E., Zhao, Z. S., Ng, C. P. and Lim, L.** (2001). Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J Cell Sci* **114**, 4239-51.

**Koh, C. G., Tan, E. J., Manser, E. and Lim, L.** (2002). The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* **12**, 317-21.

**Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**, 9-18.

**Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A. and Lefkowitz, R. J.** (2001). beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1601-6.

**Kohout, T. A., Nicholas, S. L., Perry, S. J., Reinhart, G., Junger, S. and Struthers, R. S.** (2004). Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* **279**, 23214-22.

**Krapivinsky, G., Kennedy, M. E., Nemej, J., Medina, I., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E.** (1998). Gbeta binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K<sup>+</sup> channel activation. *J Biol Chem* **273**, 16946-52.

**Krasel, C., Dammeier, S., Winstel, R., Brockmann, J., Mischak, H. and Lohse, M. J.** (2001). Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* **276**, 1911-5.

**Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K. and Haucke, V.** (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol* **162**, 113-24.

**Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S. and Hahn, K. M.** (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**, 333-7.

**Krebs, E. G. and Fischer, E. H.** (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **20**, 150-7.

**Krugmann, S., Andrews, S., Stephens, L. and Hawkins, P. T.** (2006). ARAP3 is essential for formation of lamellipodia after growth factor stimulation. *J Cell Sci* **119**, 425-32.

**Krupnick, J. G. and Benovic, J. L.** (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 289-319.

**Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H. and Benovic, J. L.** (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* **272**, 15011-6.

**Kuhn, H.** (1978). Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* **17**, 4389-95.

**Kuhn, H., Hall, S. W. and Wilden, U.** (1984). Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett* **176**, 473-8.

**Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C. and Young, P. R.** (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 533-8.

**Kwan, K. M. and Kirschner, M. W.** (2005). A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of *Xenopus laevis*. *Development* **132**, 4599-610.

**Lagane, B., Chow, K. Y., Balabanian, K., Levoe, A., Harriague, J., Planchenault, T., Baleux, F., Gunera-Saad, N., Arenzana-Seisdedos, F. and Bachelier, F.** (2008). CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* **112**, 34-44.

**Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

**Langille, S. E., Patki, V., Klarlund, J. K., Buxton, J. M., Holik, J. J., Chawla, A., Corvera, S. and Czech, M. P.** (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* **274**, 27099-104.

**Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. and Caron, M. G.** (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **275**, 23120-6.

**Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G. and Barak, L. S.** (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3712-7.

**Lefkowitz, R. J., Pitcher, J., Krueger, K. and Daaka, Y.** (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* **42**, 416-20.

**Levy, R., Malech, H. L. and Rotrosen, D.** (1990). Production of myeloid cell cytosols functionally and immunochemically deficient in the 47 kDa or 67 kDa NADPH oxidase cytosolic factors. *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 1114-20.

**Li, X., Huston, E., Lynch, M. J., Houslay, M. D. and Baillie, G. S.** (2006). Phosphodiesterase-4 influences the PKA phosphorylation status and membrane translocation of G-protein receptor kinase 2 (GRK2) in HEK-293beta2 cells and cardiac myocytes. *Biochem J* **394**, 427-35.

**Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W. and Anderson, R. A.** (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89-93.

**Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. and Prendergast, G. C.** (2001). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* **21**, 6906-12.

**Lock, J. G., Wehrle-Haller, B. and Stromblad, S.** (2008). Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol* **18**, 65-76.

- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-50.
- Loirand, G., Guilluy, C. and Pacaud, P.** (2006). Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 199-204.
- Lozano, E., Betson, M. and Braga, V. M.** (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* **25**, 452-63.
- Lu, Z. L., Saldanha, J. W. and Hulme, E. C.** (2002). Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 140-6.
- Lucius, R., Gallinat, S., Busche, S., Rosenstiel, P. and Unger, T.** (1999). Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol Life Sci* **56**, 1008-19.
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K. et al.** (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-61.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2449-54.
- Machesky, L. M. and Insall, R. H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**, 1347-56.
- Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P. and Franco, M.** (2004). The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**, 2389-98.
- Maier, U., Babich, A., Macrez, N., Leopoldt, D., Gierschik, P., Illenberger, D. and Nurnberg, B.** (2000). Gbeta 5gamma 2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem* **275**, 13746-54.
- Malliri, A., van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F. and Collard, J. G.** (2002). Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* **417**, 867-71.
- Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J. and Horwitz, A. R.** (2002). GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 1497-510.
- Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L.** (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* **1**, 183-92.
- Marks, P. W. and Kwiatkowski, D. J.** (1996). Genomic organization and chromosomal location of murine Cdc42. *Genomics* **38**, 13-8.
- Martin, N. P., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K.** (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 45954-9.
- Mathiesen, J. M. and Ramirez, M. T.** (2006). The metabotropic glutamate receptor 4 is internalized and desensitized upon protein kinase C activation. *Br J Pharmacol* **148**, 279-90.



**Matos, P., Collard, J. G. and Jordan, P.** (2003). Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* **278**, 50442-8.

**Mazaki, Y., Hashimoto, S., Okawa, K., Tsubouchi, A., Nakamura, K., Yagi, R., Yano, H., Kondo, A., Iwamatsu, A., Mizoguchi, A. et al.** (2001). An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol Biol Cell* **12**, 645-62.

**McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. and Lefkowitz, R. J.** (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-7.

**McDonald, P. H., Cote, N. L., Lin, F. T., Premont, R. T., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J.** (1999). Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem* **274**, 10677-80.

**McKay, M. M. and Morrison, D. K.** (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**, 3113-21.

**Meloche, S., Landry, J., Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Giasson, E.** (2000). p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H741-51.

**Menard, L., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bertrand, L., Premont, R. T., Colapietro, A. M., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G.** (1996). Members of the G protein-coupled receptor kinase family that phosphorylate the beta2-adrenergic receptor facilitate sequestration. *Biochemistry* **35**, 4155-60.

**Merlot, S. and Firtel, R. A.** (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3471-8.

**Mertens, A. E., Rygiel, T. P., Olivo, C., van der Kammen, R. and Collard, J. G.** (2005). The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* **170**, 1029-37.

**Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T.** (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-6.

**Millard, T. H., Sharp, S. J. and Machesky, L. M.** (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**, 1-17.

**Mira, J. P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L. C. and Knaus, U. G.** (2000). Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 185-9.

**Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W. and Sealfon, S. C.** (1998). Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* **392**, 411-4.

**Moon, S. Y. and Zheng, Y.** (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.

**Moore, C. A., Milano, S. K. and Benovic, J. L.** (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 451-82.

- Morii, N., Kawano, K., Sekine, A., Yamada, T. and Narumiya, S.** (1991). Purification of GTPase-activating protein specific for the rho gene products. *J Biol Chem* **266**, 7646-50.
- Moss, J. and Vaughan, M.** (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem* **270**, 12327-30.
- Mukherjee, S., Gurevich, V. V., Jones, J. C., Casanova, J. E., Frank, S. R., Maizels, E. T., Bader, M. F., Kahn, R. A., Palczewski, K., Aktories, K. et al.** (2000). The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5901-6.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J.** (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**, 24539-42.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E.** (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-6.
- Muslin, A. J.** (2005). Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 225-9.
- Myers, K. R. and Casanova, J. E.** (2008). Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. *Trends Cell Biol* **18**, 184-92.
- Nadal, J. A., Scicli, G. M., Carbini, L. A. and Scicli, A. G.** (2002). Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H739-48.
- Naga Prasad, S. V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A. and Rockman, H. A.** (2005). Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **7**, 785-96.
- Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M. and Horwitz, A. R.** (2006). Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol* **173**, 587-9.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C. and Robinson, D. G.** (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* **130**, 1102-8.
- Neer, E. J. and Clapham, D. E.** (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* **333**, 129-34.
- Newton, A. C.** (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **370**, 361-71.
- Nicole, S., White, P. S., Topaloglu, H., Beigthon, P., Salih, M., Hentati, F. and Fontaine, B.** (1999). The human CDC42 gene: genomic organization, evidence for the existence of a putative pseudogene and exclusion as a SJS1 candidate gene. *Hum Genet* **105**, 98-103.
- Nie, Z. and Randazzo, P. A.** (2006). Arf GAPs and membrane traffic. *J Cell Sci* **119**, 1203-11.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G. and Chavrier, P.** (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* **161**, 1143-50.

**Nimnual, A. S., Yatsula, B. A. and Bar-Sagi, D.** (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**, 560-3.

**Nishiya, N., Kiosses, W. B., Han, J. and Ginsberg, M. H.** (2005). An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol* **7**, 343-52.

**Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.

**Noble, P. J., Wilde, G., White, M. R., Pennington, S. R., Dockray, G. J. and Varro, A.** (2003). Stimulation of gastrin-CCKB receptor promotes migration of gastric AGS cells via multiple paracrine pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G75-84.

**Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. and Barak, L. S.** (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**, 17201-10.

**Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* **275**, 3577-82.

**Olofsson, B.** (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 545-54.

**Olson, M. F., Pasteris, N. G., Gorski, J. L. and Hall, A.** (1996). Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr Biol* **6**, 1628-33.

**Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K. and Sugimura, H.** (2001). Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4385-90.

**Paing, M. M., Stutts, A. B., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J. and Trejo, J.** (2002). beta-Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem* **277**, 1292-300.

**Palacios, F. and D'Souza-Schorey, C.** (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J Biol Chem* **278**, 17395-400.

**Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G. and D'Souza-Schorey, C.** (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J* **20**, 4973-86.

**Palacios, F., Schweitzer, J. K., Boshans, R. L. and D'Souza-Schorey, C.** (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* **4**, 929-36.

**Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E. et al.** (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-45.

**Parameswaran, N., Pao, C. S., Leonhard, K. S., Kang, D. S., Kratz, M., Ley, S. C. and Benovic, J. L.** (2006). Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages. *J Biol Chem* **281**, 34159-70.

- Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W. and Ernst, O. P.** (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**, 183-7.
- Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M. and Cherfils, J.** (2001). The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO Rep* **2**, 234-8.
- Paul, A. S. and Pollard, T. D.** (2008). The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr Biol* **18**, 9-19.
- Peacock, J. G., Miller, A. L., Bradley, W. D., Rodriguez, O. C., Webb, D. J. and Koleske, A. J.** (2007). The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell* **18**, 3860-72.
- Pellinen, T. and Ivaska, J.** (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* **119**, 3723-31.
- Peppel, K., Boekhoff, I., McDonald, P., Breer, H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1997). G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J Biol Chem* **272**, 25425-8.
- Peters, P. J., Hsu, V. W., Ooi, C. E., Finazzi, D., Teal, S. B., Oorschot, V., Donaldson, J. G. and Klausner, R. D.** (1995). Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol* **128**, 1003-17.
- Phillips, M. I. and Kagiya, S.** (2002). Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 569-77.
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J.** (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 653-92.
- Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V. K. and Oppermann, M.** (2003). Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem* **278**, 2190-8.
- Poupart, M. E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S. A. and Claing, A.** (2007). ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. *Cell Signal* **19**, 2370-8.
- Prasad, M. V., Dermott, J. M., Heasley, L. E., Johnson, G. L. and Dhanasekaran, N.** (1995). Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem* **270**, 18655-9.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M. and Lefkowitz, R. J.** (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14082-7.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S. J. and Lefkowitz, R. J.** (2000). The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem* **275**, 22373-80.
- Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. and Claing, A.** (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**, 1001-11.
- Pronin, A. N., Carman, C. V. and Benovic, J. L.** (1998). Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J Biol Chem* **273**, 31510-8.

- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. and Donaldson, J. G.** (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* **112** ( Pt 6), 855-66.
- Radhakrishna, H., Klausner, R. D. and Donaldson, J. G.** (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol* **134**, 935-47.
- Raman, D., Baugher, P. J., Thu, Y. M. and Richmond, A.** (2007a). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* **256**, 137-65.
- Raman, M., Chen, W. and Cobb, M. H.** (2007b). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-12.
- Randazzo, P. A. and Hirsch, D. S.** (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal* **16**, 401-13.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F. et al.** (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-7.
- Reif, K. and Cyster, J. G.** (2000). RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J Immunol* **164**, 4720-9.
- Ren, X. R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W. and Lefkowitz, R. J.** (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1448-53.
- Riaz, A. A., Wang, Y., Schramm, R., Sato, T., Menger, M. D., Jeppsson, B. and Thorlacius, H.** (2004). Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. *Faseb J* **18**, 881-3.
- 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**, 913-22.
- Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Small, J. V. and Kaverina, I.** (2005). The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**, 161-71.
- Ridley, A. J.** (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* **11**, 471-7.
- Ridley, A. J. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10.
- Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J. and Ellis, C.** (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J* **12**, 5151-60.
- Rockman, H. A., Choi, D. J., Akhter, S. A., Jaber, M., Giros, B., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Koch, W. J.** (1998). Control of myocardial contractile function by

the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem* **273**, 18180-4.

**Rockman, H. A., Choi, D. J., Rahman, N. U., Akhter, S. A., Lefkowitz, R. J. and Koch, W. J.** (1996). Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9954-9.

**Rodbell, M., Birnbaumer, L. and Pohl, S. L.** (1971). Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylate cyclase system. *Biochem J* **125**, 58P-59P.

**Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R. B., Hunt, L. T., Graziani, G., Tronick, S. R., Aaronson, S. A. and Eva, A.** (1991). A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol* **3**, 372-9.

**Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C. et al.** (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-73.

**Ross, E. M. and Gilman, A. G.** (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**, 6966-9.

**Rossmann, K. L., Der, C. J. and Sondek, J.** (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80.

**Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J. J. and Egido, J.** (2001). Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* **38**, 1382-7.

**Sadoshima, J.** (1998). Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **82**, 1352-5.

**Sallese, M., Mariggio, S., Collodel, G., Moretti, E., Piomboni, P., Baccetti, B. and De Blasi, A.** (1997). G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem* **272**, 10188-95.

**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**, 826-31.

**Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F. and Collard, J. G.** (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* **143**, 1385-98.

**Santy, L. C. and Casanova, J. E.** (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol* **154**, 599-610.

**Santy, L. C., Ravichandran, K. S. and Casanova, J. E.** (2005). The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol* **15**, 1749-54.

**Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T.** (1991). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**, 230-3.

- Sasaki, T. and Takai, Y.** (1998). The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 641-5.
- Schleicher, A., Kuhn, H. and Hofmann, K. P.** (1989). Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II. *Biochemistry* **28**, 1770-5.
- Schmalzgaug, R., Phee, H., Davidson, C. E., Weiss, A. and Premont, R. T.** (2007). Differential expression of the ARF GAP genes GIT1 and GIT2 in mouse tissues. *J Histochem Cytochem* **55**, 1039-48.
- Schmidt, A. and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.
- Schmitz, U., Thommes, K., Beier, I., Wagner, W., Sachinidis, A., Dusing, R. and Vetter, H.** (2001). Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* **276**, 22003-10.
- Schneider, I. C. and Haugh, J. M.** (2006). Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation. *Cell Cycle* **5**, 1130-4.
- Schober, M., Raghavan, S., Nikolova, M., Polak, L., Pasolli, H. A., Beggs, H. E., Reichardt, L. F. and Fuchs, E.** (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* **176**, 667-80.
- Scott, J. D.** (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther* **50**, 123-45.
- Scott, M. G., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbe-Jullie, C., Pitcher, J. A. and Marullo, S.** (2006). Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol Cell Biol* **26**, 3432-45.
- Seibold, A., Williams, B., Huang, Z. F., Friedman, J., Moore, R. H., Knoll, B. J. and Clark, R. B.** (2000). Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol Pharmacol* **58**, 1162-73.
- 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**, 1261-73.
- Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 14498-506.
- Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J.** (2005). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem* **280**, 15315-24.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**, 1307-13.
- Shi, C. S. and Kehrl, J. H.** (2001). PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem* **276**, 31845-50.
- Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J. P. and Laporte, S. A.** (2005). Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal* **17**, 1074-83.

**Storez, H., Scott, M. G., Issafras, H., Burtsey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Pilot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M. et al.** (2005). Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* **280**, 40210-5.

**Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. et al.** (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-33.

**Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P. and Finkel, T.** (1996). rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **16**, 7115-21.

**Sun, W., Kesavan, K., Schaefer, B. C., Garrington, T. P., Ware, M., Johnson, N. L., Gelfand, E. W. and Johnson, G. L.** (2001). MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem* **276**, 5093-100.

**Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L. and Pei, G.** (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**, 49212-9.

**Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Sulciner, D. J., Gutkind, J. S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P. J. and Finkel, T.** (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* **318 ( Pt 2)**, 379-82.

**Sunyer, T., Monastirsky, B., Codina, J. and Birnbaumer, L.** (1989). Studies on nucleotide and receptor regulation of Gi proteins: effects of pertussis toxin. *Mol Endocrinol* **3**, 1115-24.

**Sutherland, E. W., Jr. and Wosilait, W. D.** (1955). Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169-70.

**Suzuki, T., Kanai, Y., Hara, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Kohara, M., Maehama, T., Taya, C., Shitara, H., Yonekawa, H. et al.** (2006). Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol Cell Biol* **26**, 6149-56.

**Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M. and Egido, J.** (2000). Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. *J Nephrol* **13 Suppl 3**, S101-10.

**Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V. and Egido, J.** (2003). Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 881-900.

**Svensson, H. G., West, M. A., Mollahan, P., Prescott, A. R., Zaru, R. and Watts, C.** (2008). A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *Eur J Immunol* **38**, 818-28.

**Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M. and Borisy, G. G.** (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**, 409-21.

**Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., Hall, K. L., Miller-Wing, A. V., Stobb, J. W., Cook, V. I., Harding, E. C. et al.** (1992). Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* **40**, 409-19.

**Taboubi, S., Milanini, J., Delamarre, E., Parat, F., Garrouste, F., Pommier, G., Takasaki, J., Hubaud, J. C., Kovacic, H. and Lehmann, M.** (2007). G alpha(q/11)-coupled P2Y2 nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *Faseb J* **21**, 4047-58.



- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. and Nakayama, K.** (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J* **365**, 369-78.
- Tan, W., Martin, D. and Gutkind, J. S.** (2006). The G $\alpha$ 13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* **281**, 39542-9.
- Tanabe, K., Kon, S., Natsume, W., Torii, T., Watanabe, T. and Satake, M.** (2006). Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer Sci* **97**, 801-6.
- Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J.** (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-9.
- Tatenhorst, L., Senner, V., Puttmann, S. and Paulus, W.** (2004). Regulators of G-protein signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) are associated with glioma cell motility. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 210-22.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. and Yonemoto, W.** (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**, 971-1005.
- ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. and Hordijk, P. L.** (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**, 759-69.
- Thacker, E., Kearns, B., Chapman, C., Hammond, J., Howell, A. and Theibert, A.** (2004). The arf6 GAP centaurin alpha-1 is a neuronal actin-binding protein which also functions via GAP-independent activity to regulate the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* **83**, 541-54.
- Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Luttrell, L. M.** (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* **278**, 6258-67.
- 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**, 9429-36.
- Tojo, T., Ushio-Fukai, M., Yamaoka-Tojo, M., Ikeda, S., Patrushev, N. and Alexander, R. W.** (2005). Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* **111**, 2347-55.
- Totaro, A., Paris, S., Asperti, C. and de Curtis, I.** (2007). Identification of an intramolecular interaction important for the regulation of GIT1 functions. *Mol Biol Cell* **18**, 5124-38.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L.** (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-72.
- Tran, T. M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R. H. and Clark, R. B.** (2004). Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase

and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol* **65**, 196-206.

**Trumpp-Kallmeyer, S., Chini, B., Mouillac, B., Barberis, C., Hoflack, J. and Hibert, M.** (1995). Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv* **70**, 255-62.

**Tsao, P., Cao, T. and von Zastrow, M.** (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 91-6.

**Tsuchiya, M., Price, S. R., Nightingale, M. S., Moss, J. and Vaughan, M.** (1989). Tissue and species distribution of mRNA encoding two ADP-ribosylation factors, 20-kDa guanine nucleotide binding proteins. *Biochemistry* **28**, 9668-73.

**Tsuchiya, M., Price, S. R., Tsai, S. C., Moss, J. and Vaughan, M.** (1991). Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **266**, 2772-7.

**Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P. S.** (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* **145**, 851-63.

**Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**, 103-10.

**van Hengel, J., D'Hooge, P., Hooghe, B., Wu, X., Libbrecht, L., De Vos, R., Quondamatteo, F., Klempt, M., Brakebusch, C. and van Roy, F.** (2008). Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in cdc42-deficient mouse liver. *Gastroenterology* **134**, 781-92.

**Vaughan, D. J., Millman, E. E., Godines, V., Friedman, J., Tran, T. M., Dai, W., Knoll, B. J., Clark, R. B. and Moore, R. H.** (2006). Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J Biol Chem* **281**, 7684-92.

**Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S. and Cohen, P.** (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett* **527**, 101-4.

**Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C. K. and Horwitz, A. F.** (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* **176**, 573-80.

**Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M. D., Peloquin, J., Svitkina, T. and Borisy, G. G.** (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol* **160**, 951-62.

**Virion, B., Firsov, D., Cheval, L., Reiter, E., Troispoux, C., Guillou, F. and Elalouf, J. M.** (1998). Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* **139**, 2784-95.

**Visvikis, O., Lores, P., Boyer, L., Chardin, P., Lemichez, E. and Gacon, G.** (2008). Activated Rac1, but not the tumorigenic variant Rac1b, is ubiquitinated on Lys 147 through a JNK-regulated process. *Febs J* **275**, 386-96.

**Vitale, N., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R. J. and Premont, R. T.** (2000). GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-

trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *J Biol Chem* **275**, 13901-6.

**Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J. and Kahn, R. A.** (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**, 4495-508.

**von Zastrow, M. and Kobilka, B. K.** (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* **267**, 3530-8.

**Vroon, A., Heijnen, C. J., Lombardi, M. S., Cobelens, P. M., Mayor, F., Jr., Caron, M. G. and Kavelaars, A.** (2004). Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J Leukoc Biol* **75**, 901-9.

**Walker, J. K., Fong, A. M., Lawson, B. L., Savov, J. D., Patel, D. D., Schwartz, D. A. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Beta-arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *J Clin Invest* **112**, 566-74.

**Walker, J. K., Peppel, K., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Fisher, J. T.** (1999). Altered airway and cardiac responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 3. *Am J Physiol* **276**, R1214-21.

**Wang, H. R., Ogunjimi, A. A., Zhang, Y., Ozdamar, B., Bose, R. and Wrana, J. L.** (2006a). Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase. *Methods Enzymol* **406**, 437-47.

**Wang, P. and DeFea, K. A.** (2006). Protease-activated receptor-2 simultaneously directs beta-arrestin-1-dependent inhibition and Galphaq-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemistry* **45**, 9374-85.

**Wang, P., Kumar, P., Wang, C. and DeFea, K. A.** (2007). Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 alpha and beta by protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *Biochem J* **408**, 221-30.

**Wang, Y., Tang, Y., Teng, L., Wu, Y., Zhao, X. and Pei, G.** (2006b). Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 139-47.

**Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. and Narumiya, S.** (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* **1**, 136-43.

**Waterman-Storer, C. M., Worthyake, R. A., Liu, B. P., Burrridge, K. and Salmon, E. D.** (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**, 45-50.

**Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* **6**, 154-61.

**Webb, D. J., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* **4**, E97-100.

**Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10782-7.

- Weinstock, J. V., Blum, A. M. and Kassab, J. T.** (1987). Angiotensin II is chemotactic for a T-cell subset which can express migration inhibition factor activity in murine schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol* **107**, 180-7.
- Welchman, R. L., Gordon, C. and Mayer, R. J.** (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R.** (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 875-85.
- Wenk, M. R. and De Camilli, P.** (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8262-9.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-6.
- Wheeler, A. P. and Ridley, A. J.** (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* **301**, 43-9.
- Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X. N., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de Jong, P., Reed, R. R., Simon, M. I. et al.** (1992). Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* **1**, 85-91.
- Wilkins, A. and Carpenter, C. L.** (2008). Regulation of RhoBTB2 by the Cul3 ubiquitin ligase complex. *Methods Enzymol* **439**, 103-9.
- Wojcikiewicz, R. J.** (2004). Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 35-41.
- Wolfe, B. L. and Trejo, J.** (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**, 462-70.
- Worth, D. C. and Parsons, M.** (2008). Adhesion dynamics: mechanisms and measurements. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2397-409.
- Worthylake, D. K., Rossman, K. L. and Sondek, J.** (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**, 682-8.
- Wu, W. J., Tu, S. and Cerione, R. A.** (2003). Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* **114**, 715-25.
- Xia, C., Ma, W., Stafford, L. J., Liu, C., Gong, L., Martin, J. F. and Liu, M.** (2003). GGAPs, a new family of bifunctional GTP-binding and GTPase-activating proteins. *Mol Cell Biol* **23**, 2476-88.
- Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd and Lefkowitz, R. J.** (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12011-6.
- Xie, Z., Ho, W. T., Spellman, R., Cai, S. and Exton, J. H.** (2002). Mechanisms of regulation of phospholipase D1 and D2 by the heterotrimeric G proteins G13 and Gq. *J Biol Chem* **277**, 11979-86.
- Xu, T. R., Baillie, G. S., Bhari, N., Houslay, T. M., Pitt, A. M., Adams, D. R., Kolch, W., Houslay, M. D. and Milligan, G.** (2008). Mutations of beta-arrestin 2 that limit self-association also interfere with interactions with the beta2-adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: implications for beta2-adrenoceptor signalling via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem J* **413**, 51-60.

- Yasuda, S., Taniguchi, H., Ocegüera-Yanez, F., Ando, Y., Watanabe, S., Monypenny, J. and Narumiya, S.** (2006). An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells. *FEBS Lett* **580**, 3375-80.
- Yeh, L. H., Park, Y. J., Hansalia, R. J., Ahmed, I. S., Deshpande, S. S., Goldschmidt-Clermont, P. J., Irani, K. and Alevriadou, B. R.** (1999). Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am J Physiol* **276**, C838-47.
- Yin, G., Haendeler, J., Yan, C. and Berk, B. C.** (2004). GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **24**, 875-85.
- Yin, H. L. and Janmey, P. A.** (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.
- Yoon, C. M., Hong, B. S., Moon, H. G., Lim, S., Suh, P. G., Kim, Y. K., Chae, C. B. and Gho, Y. S.** (2008). Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Blood* **112**, 1129-38.
- Yuan, N., Friedman, J., Whaley, B. S. and Clark, R. B.** (1994). cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylylcyclase. *J Biol Chem* **269**, 23032-8.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B.** (2007a). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**, 858-67.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z. and Geiger, B.** (2007b). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **120**, 137-48.
- Zarubin, T. and Han, J.** (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**, 11-8.
- Zeniou-Meyer, M., Borg, J. P. and Vitale, N.** (2005). [The GIT-PIX protein complex: a hub to ARF and Rac/Cdc42 GTPases]. *Med Sci (Paris)* **21**, 849-53.
- Zenke, F. T., Krendel, M., DerMardirossian, C., King, C. C., Bohl, B. P. and Bokoch, G. M.** (2004). p21-activated kinase 1 phosphorylates and regulates 14-3-3 binding to GEF-H1, a microtubule-localized Rho exchange factor. *J Biol Chem* **279**, 18392-400.
- Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. and Greenberg, S.** (1999). ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* **19**, 8158-68.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G. and Greenberg, S.** (1998). A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* **273**, 19977-81.
- Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H. and Lim, L.** (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* **20**, 6354-63.
- Zheng, Y., Fischer, D. J., Santos, M. F., Tigyi, G., Pasteris, N. G., Gorski, J. L. and Xu, Y.** (1996). The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **271**, 33169-72.
- 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**, 2827-31.

**Zoudilova, M., Kumar, P., Ge, L., Wang, P., Bokoch, G. M. and DeFea, K. A.** (2007). Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem* **282**, 20634-46.

**ANNEXE:****G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration.**

Mathieu Cotton, Audrey Claing\*

Department of Pharmacology, University of Montreal, Canada

\* corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, P.O. box 6128, downtown station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

(publié dans le journal: Cellular Signalling, 2009 Jul;21(7):1045-53.)

**Contribution des auteurs:**

**MC:** réalisation des expériences, des schémas, conceptualisation et écriture.

**AC :** conceptualisation et écriture

Keywords : ADP-ribosylation factor, Rac, actin, ruffling, migration, G protein-coupled receptors

**Abstract**

Cell migration is a fundamental biological process involved in normal physiology. Altered motile phenotypes are however often associated with the development and progression of diseases such as cancer and atherosclerosis. Remodeling of the actin cytoskeleton is required for cell shape changes and is controlled by a broad variety of cellular proteins. Interestingly, several extracellular stimuli can promote actin reorganization and result in enhanced cell migration. Namely, G protein-coupled receptors (GPCRs), which are activated by factors ranging from small amines, to hormones, and chemokines, initiate signalling cascades resulting in cell shape changes, formation of a migrating front (leading edge) and altered adhesion. GPCRs are heptahelical membrane proteins, which classically transmit signal via the activation of heterotrimeric G proteins. Sustained stimulation leads to the activation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and the recruitment of arrestin proteins, which engage alternative signalling pathways. In this review, we will discuss the role of GPCR mediated signal transduction and review their importance in the regulation of actin remodeling leading to cell migration.



## 1. Introduction.

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest family of membrane receptors. Analysis of the human genome has revealed that more than 800 genes encode these 7 trans-membrane receptors. These are activated by a large variety of stimuli ranging from small molecules such as neurotransmitters to larger hormones. The stimulation of GPCRs has been reported to engage a broad range of physiological responses, such as blood pressure regulation, smooth muscle contraction, neurotransmission, chemotaxis, and proliferation. All are important for maintaining homeostasis, but in some cases, dysregulation of GPCR function leads to the development of pathological conditions. In this review, we will discuss the molecular mechanisms by which GPCRs control the process of cell migration markedly enhanced in diseases such as cancer and atherosclerosis.

Chemokines are small molecular weight proteins that bind to their cognate receptors to elicit directional migration or chemotaxis. The activation of receptors such as CXCR2 play an important role in leucocyte chemotaxis, wound healing, angiogenesis, and inflammation [1]. All these biological processes require enhanced cellular motility. Dysregulation of the function of these chemokine receptors has been linked to several pathologies including chronic inflammation, metastatic progression, and aberrant angiogenesis during tumor progression. Alternatively, activation of CXCR4, another chemokine receptor, plays an important role in hematopoiesis as well as in the development, and organization of the immune system. Increasing evidences suggest an important role for this receptor in different types of cancer of both hematopoietic and nonhematopoietic origins [2]. For example, enhanced CXCR4 expression increases the migratory capacity of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells [3]. In addition, it was shown that breast cancer cells typically express high levels of functional CXCR4 receptors that can direct chemotaxis and invasive responses [4]. Treatment with anti-CXCR4 monoclonal antibodies (mAbs) was shown to inhibit the metastatic spread to target organs in vivo [4].

Several bioactive lipids such as Sphingosine 1-phosphate (S1P) also regulate cell migration in different conditions. S1P stimulation enhances motility of endothelial cells [5], while decreasing migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) [6]. Lysophosphatidic acid (LPA), another bioactive lipid, mediates multiple cellular responses, including proliferation, differentiation, motility, and survival in both normal physiological conditions and disease states. Importantly, LPA can mediate many of the "hallmarks of cancer" [7], including angiogenesis, and tissue invasion, two phenomena characterized by enhanced migration [8, 9]. These biological actions, coupled with aberrant receptor expression and elevated production of LPA in malignancies, indicate that LPA is intimately involved in tumor progression. Chen and colleagues have demonstrated that activation of the LPA1 (EDG2) and LPA2 (EDG4) receptors mediate LPA stimulated migration of breast cancer cells [10].

Hormones like angiotensin II (Ang II) and endothelins (ET) are well known for their effects on the cardiovascular system. Through the stimulation of their receptors (ATR), Ang II stimulates hypertrophy and hyperplasia of VSMCs [11]. This vasoactive peptide was also shown to stimulate VSMC migration, through a different molecular mechanism involving the activation of the MAP kinase pathway [12]. Similarly, ET stimulation also leads to increased migration. For example, activation of ET<sub>B</sub> receptors promotes activation of intracellular signalling cascades regulating turnover of focal adhesion complexes leading to enhanced motility in endothelial cells [13]. These are only a few examples to illustrate that stimulation of GPCRs can promote reorganization of the actin cytoskeleton and lead to altered motile phenotypes in a broad variety of cells.

## **2. Activation of heterotrimeric G proteins.**

GPCR classically transmit their signal via the activation of G protein heterotrimer, which contains  $\alpha\beta$  and  $\gamma$  subunits. Binding of agonists induces reorientation of the tri-dimensional structure of the receptor, which results in GTP-loading of the G $\alpha$  subunit. This first signalling event results in reorganization of the G proteins structure and propagation of downstream signalling by both the  $\alpha$  and

$\beta$   $\gamma$  subunits. There are four major families of G proteins:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$  [14]. All are activated to engage effectors and stimulate signalling cascades resulting in diverse biological responses (Fig. 1).

### *Receptor coupling to $G_i$*

In several cases, the classical activation of heterotrimeric G proteins is a mean by which GPCR ligands initiate signalling cascades to regulate migration of different cell types. Namely, signalling through the  $G_{i/o}$  subtype can enhance cell motility. Members of this family include  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_{gust}$ , and  $G\alpha_t$ . All isoforms can be irreversibly uncoupled from receptors by pertussis toxin (PTX) [15]. PTX catalyzes ADP-ribosylation of a specific cysteine residue at position -4 from the C-terminus of the  $\alpha$  subunits, and thus blocks downstream pathways by preventing receptor coupling to the G protein [16]. This bacterial toxin was proven to be an excellent tool in dissecting the essential role of  $G\alpha_i$  proteins in a variety of physiological effects. For example, activation of this G protein isoform is responsible for increased leukocytes chemotaxis to PAF stimulation. Although the PAF receptor was shown to couple to both  $G_i$  and  $G_q$  to regulate phosphatidylinositol (PI) hydrolysis, reorganization of the actin cytoskeleton leading to migration was exclusively mediated by  $G_i$  activation [17]. S1P stimulation of human lymphatic endothelial cells (HLECs) enhanced migration, and formation of capillary-like tubes. Pretreatment with PTX completely blocked these effects suggesting that S1P promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/ $G_i$  signalling pathways [18]. The use of knock down cellular models has revealed that different  $G_i$  subtypes may play distinct roles. Although T lymphocytes express  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$ , these two G proteins may act differentially to regulate cell migration. For example, stimulation of CXCR3 by CXCL9, CXCL10 or CXCL11 promotes migration through the activation of  $G\alpha_{i2}$  as the lack of this G protein markedly impairs the agonist mediated response. In contrast, T cells isolated from  $G\alpha_{i3}$  knock out mice displayed a significant increase in CXCR3 stimulated migration suggesting that this  $G_i$  isoform may act negatively to regulate the migratory process [19]. It is well establish that CXCR4 is coupled to  $G_i$ , which

promotes the activation of PI3K and the accumulation of D3-phosphoinositol lipids [20, 21]. Signalling through this pathway leads to SDF-1 dependent cell migration by a molecular mechanism involving the tyrosine kinases Src, ITK as well as phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [22]. In Jurkat cells, G  $\beta\gamma$  subunits, when released from G<sub>i</sub>, are also involved in SDF-1 induced cell migration by a mechanism involving the activation of monomeric G proteins [23]. A similar molecular mechanism was described for LPA2 receptors. LPA induced migration of CAOV-3 ovarian cancer cells was shown to involve the activation of the G<sub>i</sub>/Src/epidermal growth factor receptor (EGFR)/Erk signalling axis [24]. These upstream signalling events are depicted in figure 1.

#### *Receptor coupling to G<sub>s</sub>*

GPCR signalling through G<sub>s</sub> has classically been associated with the activation of adenylate cyclase, and the production of the second messenger cAMP. Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), via the stimulation of the EP2 receptors, promotes squamous cell carcinoma growth and invasion through a mechanism involving G<sub>s</sub> activation, cAMP accumulation, PKA activation and EGF receptor transactivation [25] (Fig. 1). In addition, activation of EP4 receptors by PGE<sub>2</sub> also participates in regulating cell migration. Using i.v. injected Lewis lung carcinoma (3LL) cells, tumor metastasis to lung was significantly reduced when mice were treated with a specific EP4 antagonist or when EP4 receptor expression was knocked down using RNA interference technology [26] suggesting that these receptors, which transmit signal through the activation of G<sub>s</sub>, are potential drug targets for cancer progression. Whether all G<sub>s</sub>-coupled receptors promote migration by a pathway involving PKA/Src/EGFR/Erk remains to be determined.

#### *Receptor coupling to G<sub>q</sub>*

Activation of G<sub>q</sub> has been associated with the activation of phospholipase C (PLC) and transformation of membrane D2-phosphatidyl inositol (PIP<sub>2</sub>) into inositol tri-phosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG). Binding of IP<sub>3</sub> to its receptors, localized onto the sarcoplasmic reticulum, leads to increase

intracellular calcium concentration, a biologically important second messenger. In turn, DAG generation promotes the activation of protein kinase C (PKC), which phosphorylates several downstream effectors such as calmodulin known to regulate calcium dependent signaling (Fig. 1). In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), oxytocin stimulation leads to enhanced migration and invasion by a mechanism involving receptor coupling to  $G_q$  and activation of the PLC pathway [27]. Although oxytocin receptors (OTXR) can couple to  $G_i$ , activation of this G protein subtype was not found to be important for the motile response. Similarly, stimulation of VSMCs by LPA resulted in  $G_q$  activation and increased migration [28]. However, for some other types of receptor, coupling to  $G_{q/11}$  acts negatively to regulate migration. Taboubi and colleagues recently demonstrated that stimulation of the  $P2Y_2$  nucleotide receptor led to the activation of this G protein isoform to inhibit human keratinocyte spreading and migration [29], although activation of this receptor subtype has been linked to increased migration in several cell models [30-33]. In addition to activating  $G_{\alpha_q}$ , receptors that classically couple to this G protein have the ability to promote cell migration through other G proteins isoforms ( $G_{12/13}$ ) and signaling molecules ( $\beta$ arrestins) as will be described below.

#### *Receptor coupling to $G_{12/13}$*

Activation of the  $G_{12/13}$  subtype has been linked to the activation of small GTP binding proteins of the Rho family. Briefly, these small GTPase are characterized as modulators of the actin cytoskeleton. For example, studies conducted in both fibroblasts and neuronal cells have shown that LPA activates RhoA through the  $G_{12/13}$  subfamily of G proteins [34, 35]. In addition, LPA induced cell migration was shown to require the activation of the  $G_{12/13}$ /RhoA/ROCK signalling pathway in ovarian cancer (SK-OV3) cells [36] (Fig. 1). In VSMCs, S1P activate S1P2 receptors to promote Rho activation via both the  $G_q$  and  $G_{12/13}$  proteins, which in turn mediates the inhibition of Rac and chemotaxis [37]. Although  $G_i$  activation and  $\beta\gamma$  subunits are important to promote CXCR4 dependent cell migration, signalling through  $G_{13}$  was reported to mediate SDF-1

induced effects. Contribution of this signalling pathway was demonstrated by sequestering activated  $G_{12/13}$  and knock down of  $G_{13}$  subunit [23].

Initiation of the migration process has been associated with heterotrimeric, but also monomeric G proteins. In the next section, we will therefore discuss the role of small GTP-binding proteins.

### **3. Monomeric G proteins as central regulators of actin remodeling and cell migration.**

#### *Rho GTPases*

It is well recognized that small GTP-binding proteins of the Rho family are central regulators of the dynamic reorganization of actin-based cytoskeleton and are key mediators of several cellular processes, including cell migration and polarity [38]. These GTPases are highly conserved through species and act as molecular switches to transmit signals from different sources. Like all G proteins, Rho family members are inactive when bound to GDP and become activated upon GTP loading. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP, while GTPase activating proteins (GAPs) promote GTP hydrolysis. Guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) preferentially bind to GDP-bound Rho proteins and act to maintain these in their inactive state. Rho GTPases activate two different kinds of molecules that directly stimulate actin polymerization, WASP/WAVE proteins and Diaphanous-related formins (DRFs). WASP/WAVE proteins induce actin polymerization via the Arp2/3 complex, which stimulates the formation of a new actin filament [39]. Twenty-two mammalian members of the Rho GTPases have been identified so far. They can be subdivided into 8 distinct subgroups: Rho, Rac, Cdc42, RhoD/F, Rnd, RhoU/V, RhoH and RhoBTB [40, 41].

Classically, Rho activation has been associated with stress fiber formation. Higher vertebrates express three Rho proteins, RhoA, RhoB, and RhoC, which share 85% amino acid sequence homology. RhoA plays a key role in the regulation of actomyosin contractility. RhoB activation has been associated with

cytokine trafficking and cell survival, while the function of the last isoform, RhoC, remains controversial. Different reports suggest that it may act to regulate cell motility [42, 43]. Most of the functions described for Rho are based on the study of RhoA. Under basal conditions, the major cellular fraction of Rho is found in the cytosol bound to Rho GDIs [44]. Upon agonist stimulation, activated Rho is translocated to the plasma membrane through its C-terminal geranyl-geranylated tail to interact with its specific targets. The C3 exoenzyme, a toxin isolated from *Clostridium botulinum*, has been a valuable tool for analyzing Rho involvement in various cellular functions. This enzyme specifically ADP-ribosylates Rho in its effector domain, rendering it inactive [45, 46]. When activated RhoA is microinjected into fibroblasts, actin fibers undergo reorganization to form stress fibers. Activated Rho relays extracellular signals to a number of downstream effectors, which include Rho kinase (ROCK), rhotekin, rhotekin and diaphanous proteins amongst others [47]. In Swiss 3T3 cells, the ability of LPA to induce stress fibers appears to be Rho dependent, since this biological response can be inhibited by the C3 exoenzyme [48]. Several GPCR agonists such as LPA, S1P, PGE<sub>2</sub>, and thrombin can promote the endogenous activation of Rho GTPases [49-52]. The molecular mechanism that control Rho activation remains under intense investigation. Using a genetic approach, it was demonstrated that several GPCRs activate Rho by a mechanism involving receptor coupling to G<sub>12/13</sub> proteins. LPA, thrombin and bradykinin (BK) can promote the activation of Rho in a G<sub>12/13</sub> as well as G<sub>q/11</sub> dependent fashion. However, agonist concentrations required to activate the G<sub>q/11</sub> pathway were proven to be much higher [53]. In VSMCs, S1P stimulation was demonstrated to increase Rho activation through a mechanism involving S1P<sub>2</sub> receptors, G<sub>q</sub>, and G<sub>12/13</sub> [37]. In Swiss 3T3 cells, the G protein G<sub>13</sub> but not G<sub>12</sub> mediates signalling from the LPA receptor to Rho via transactivation of the EGFR [54]. These data suggest that activation of tyrosine kinase receptors can also lead to Rho activation by a GPCR. Alternatively, in some cell types, Rho activation can be blocked by PTX suggesting that the activation of G<sub>i</sub> or G<sub>o</sub> may also be involved. In Swiss 3T3 cells, LPA promoted recruitment of Rho to the plasma membrane was reported to be sensitive to PTX

[55]. Similarly,  $\alpha_2$ -adrenergic receptor ( $\alpha_2$ AR) stimulation of Rho can be inhibited by PTX [56]. Altogether, these findings demonstrate that activation of  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  and  $G_{12/13}$  can all lead to Rho activation (Fig. 1).

Rac activation has been associated with membrane ruffles and formation of lamellipodial protrusions [48]. Three Rac proteins are present in the human genome: Rac1, 2 and 3. These are highly homologous, but differ in their transcriptional regulation and tissue distribution. Rac1 is ubiquitously expressed, Rac2 is hematopoietically specific, whereas Rac3 is highly enriched in the brain and expressed at lower levels in a wide range of tissues [40, 57]. Rac1 is the best characterized isoform and the use of knock down approaches has demonstrated that this GTPase is essential for enhanced cellular migration in a broad variety of cellular models and conditions. For example, Rac1 is highly expressed in invasive breast cancer cell line (MDA-MB-231) compared to non-invasive mammary epithelial cells (MCF-7). Inhibition of Rac1, by siRNA, was shown to reduce migration and invasive properties of cancer cells [58]. Similarly, S1P induced changes in epithelial ovarian cancer invasion and attachment are mediated by  $G_i$  and Rac [59]. Depletion of this GTPase strongly inhibits lamellipodia formation, cell migration and invasion in SNB19 glioblastoma cells [60]. In Jurkat cells, SDF-1 stimulation was reported to promote Rac and Rho activation through  $G_i$  and  $G_{13}$ , respectively [23]. In HEK 293 cells, Ang II promoted Rac1 activation was suggested to involve another family of GTP-binding proteins, the ARF GTPases [61]. In some cases, activation of Rac was reported to decrease migration. For example, in VSMCs, S1P2 stimulation led to the inhibition of Rac via a mechanism involving  $G_{12/13}$  and  $G_q$ . This process was shown to be dependent on Rho but not Rho kinase [37].

The Rho GTPase Cdc42 plays a critical role in filopodia formation and cell polarity in most eukaryotic organisms. These highly dynamic actin-rich structures are believed to be important for sensing the extracellular environment, either for soluble signals or for other cells [62]. Expression of dominant negative Cdc42 was described to prevent filopodium formation in Swiss 3T3 cells and primary fibroblasts [63-65]. Moreover, Cdc42 deficient embryonic stem (ES) cells were



reported to lack spike-like protrusions, which were readily observed in wild-type ES cells [66]. Surprisingly, Cdc42-null fibroblastoid cells can still form filopodia [67]. Because, Rif/RhoF, RhoD and Wrch1 can all promote filopodium extension, these Rho GTPases might therefore substitute for Cdc42 in Cdc42-null cells. A significant body of evidence has indicated a crucial role for Cdc42 in cell migration [68]. Dominant negative inhibition of Cdc42 in migrating primary fibroblasts and astrocytes was demonstrated to impair directed migration [65, 69]. There are only a few reports demonstrating that GPCR stimulation promotes Cdc42 activation. In HEK 293 cells, ET-1 stimulation can enhance GTP loading of Cdc42, a signalling event associated with the inhibition of cell migration [70]. In addition, serotonin (5-HT) type 7 receptors was shown to stimulate Rho and Cdc42, but not Rac1 in NIH 3T3 cells via a mechanism involving G<sub>12</sub> activation [71] (Fig. 1). As illustrated in figure 2, activation of the ATR can result in the formation of stress fibers, lamellipodial protrusions and filopodia formation, which are respectively associated with RhoA, Rac1, and Cdc42 activation. The nature of the signaling pathways leading to these actin remodeling dependent cell responses may vary between cell types depending on the complement of proteins expressed.

### *ARF GTPases*

The ADP-ribosylation factors (ARFs) are well known for their effects on the actin cytoskeleton. Six isoforms of these GTPases have been identified. ARF1 and ARF6 are the best characterized and both present at the plasma membrane, although ARF1 is highly expressed at the Golgi to regulate vesicle trafficking [72, 73]. The importance of ARF proteins in regulating cytoskeleton reorganization was initially demonstrated using dominant negative forms of this GTPase. Overexpression of ARF6T<sup>27</sup>N blocked membrane ruffling induced by overexpression of a constitutively active Rac1 mutant [74, 75]. Aluminum fluoride (AlF) treatment of ARF6 transfected HeLa cells resulted in a redistribution of both ARF6 and actin to discrete sites on the plasma membrane, which became increasingly protrusive over time [76]. In dendritic cells, overexpression of mutant ARF6 inhibited basal migration [77].

Activation of GPCRs such as the angiotensin and the endothelin receptors can promote the activation of ARF6, and lead to enhanced cell migration [13, 61]. For example, depletion of ARF6 resulted in the spontaneous activation of Rac1, which led to increased migration of HEK 293 cells [61]. In contrast, knockdown of ARF6 in endothelial cells was reported to reduce basal and ET-1 stimulated migratory phenotypes by affecting focal adhesion turnover [13]. Expression levels of both ARF6 and Rac1 in different cell lines could explain how ARF6 might control Rac1 activation. For example, ARF6 is expressed to a similar level in both HEK 293 and endothelial cells. In contrast, Rac1 is expressed to a greater level in HEK 293 cells (Fig. 3). The expression levels of the two GTPases in each cell line might be indicative of their function in the regulation of actin remodeling. Finally, stimulation of the calcium sensing receptor (CaSR) was demonstrated to promote membrane ruffling by a mechanism involving activation of ARF6 since transfection of a dominant negative mutant (ARF6T<sup>27</sup>N) could block ruffle formation [78].

Many cellular events such as lamellipodia formation, neurite outgrowth and epithelial cell scattering are regulated by the coordinated activations of ARF6 and Rac1 [79-83]. Several adaptor proteins have been shown to play a role in the cross talk between ARF6 and Rac1. For instance, ARF6 mediated peripheral actin rearrangement is proposed to involve POR1 (arfaptin 2), a Rac-interacting protein [84]. Other proteins such as Arfaptin 1 and p95-APP1 can promote the formation of a complex including both ARF6 and Rac1 [85, 86]. In addition, the DOCK180/Elmo complex has been shown to couple ARNO mediated ARF6 activation to the downstream activation of Rac1 [87]. ARF6 was reported to promote the recruitment of the Rac GEF kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation [82, 83]. We have shown that stimulation of the ATR can promote the formation of a complex including ARF6 and Rac1 and that in an in vitro setting both GTPases can interact directly [61]. The exact molecular mechanism by which GPCRs activate ARF proteins remains to be defined. Some receptors were proposed to directly associate with this GTPase [88]. We have shown that  $\beta$ arrestin proteins important for receptor desensitization and

internalization directly bind to ARF6 [89], suggesting that this scaffold might act to mediate GPCR dependent ARF activation.

#### **4. Role of G protein-coupled receptor kinases (GRKs), arrestins and regulators of G protein signalling (RGS) in the control of cell migration.**

One common characteristic of GPCRs is their ability to initiate their own desensitization. This process mainly serves to prevent sustained coupling to heterotrimeric G proteins upon chronic exposure to stimuli. Following their activation, GPCRs are phosphorylated by specific enzymes such as the G protein-coupled receptor kinases (GRKs). Receptor phosphorylation serves to create high affinity binding sites for the recruitment of  $\beta$ arrestin proteins, which are responsible for desensitization [90]. In addition, GTP hydrolysis on the  $\alpha$  subunit of heterotrimeric G proteins, by regulators of G protein signalling (RGS) proteins, markedly contributes to turning off G protein dependent pathways. Because a great number of interacting partners have been identified for proteins involved in the desensitization process, it is now widely accepted that these may act as scaffold proteins to initiate the activation of alternative signalling pathways. Here, we will discuss the role of GRKs,  $\beta$ arrestins and RGS proteins in regulating receptor stimulated cell migration (Fig. 4).

##### *GRKs*

GRKs are a family of seven serine/threonine kinases that specifically bind and phosphorylate activated GPCRs. They are distributed in three subfamilies according to amino acid sequence homology: the rhodopsin kinases (GRK1, and GRK7), the  $\beta$ ARK subfamily (GRK2 and 3), and the GRK4, 5 and 6 subfamily [91]. Four members are ubiquitously expressed (GRK2, 3, 5, 6), while GRK4 is found mainly in the brain, testis and kidney [92-94]. GRK1 and 7 are associated with phototransduction signalling in retina and act to specifically phosphorylate rhodopsin receptors [95, 96]. Other GRKs appear to act specifically in mediating

receptor desensitization since generation of GRK-deficient mice showed that there is no redundancy between GRK family members [97].

Very few studies directly addressing the role of GRKs in migration have been conducted, and most of the knowledge comes from the analysis of GRK-deficient mice. For example, in T-cells obtained from GRK2<sup>-/+</sup> mice, CCR5 induced migration was reported to be enhanced [98]. In granulocytes lacking GRK6 expression, chemotaxis driven by the stimulation of either the leukotriene B4 (BLTR) or C5 anaphylatoxin (C5aR) receptors was also shown to be increased [99, 100]. Similarly, SDF-1 promoted migration is potentiated in GRK6-deficient neutrophils [101]. However, CXCR4 activation by the same agonist, in GRK6-deficient B and T cells, led to increased GTPase activity suggesting impaired desensitization, but decreased chemotaxis [102]. These unexpected results suggest that GRKs, in some cell types, may contribute to initiate signal transduction events independent of their usual role in receptor desensitization. This hypothesis is supported by the finding that several GRKs partners, such as MEK [103], the ARF GAPs GIT1 and GIT2 [104, 105] or PI3K [106] act to control cell migration [107]. Alternatively, it has been shown that GRK2 and GRK5 can bind, through their catalytic domain, to tubulin and promote its phosphorylation [108, 109]. Moreover, it was shown that M1MR dependent GRK2 phosphorylation of the Ezrin/Radixin/Moesin complex is essential for actin remodeling during initiation of membrane ruffling [110] (Fig. 2).

Arraes and colleagues demonstrated that neutrophils from severe septic patients are unable to migrate toward chemoattractants such as formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp), LTB4 or IL-8. This observation is correlated with elevated GRK2 and GRK5 expression levels suggesting that endogenous mediators produced during sepsis might continually activate circulating neutrophils and GRK activation, which may in turn, induce neutrophil desensitization to chemoattractants [111]. Notably, the IL-8 receptor, CXCR1 was shown to be desensitized by GRK2 [112]. Altogether, these observations highlight the role of GRKs in regulating signalling events important for actin remodeling.

### *Arrestins*

Following receptor phosphorylation, arrestins proteins are recruited to the activated receptor [90]. In mammals, four arrestins have been cloned and characterized: two visual isoforms (v-arrestin/arrestin1 and c-arrestin/arrestin4) are found in retinal rods and cones, and two are ubiquitously expressed ( $\beta$ arrestin1/arrestin2 and  $\beta$ arrestin2/arrestin3) [113]. In addition to playing a central role in receptor desensitization,  $\beta$ arrestins also act as scaffold proteins and a large number of interacting partners have been identified [114]. One of its main function is to orchestrate the formation of clathrin coated pits (CCPs) by interacting with the components of the clathrin coat, the adaptor protein 2 (AP-2) and clathrin [115].  $\beta$ arrestin proteins are also known to initiate a broad variety of signalling events. Namely, these act to control activation of the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) pathway [116, 117]. For example, stimulation of the ATR can promote Erk1/2 activation through two independent cascades: heterotrimeric G protein and  $\beta$ arrestin2 [118, 119].

These new signal transduction perspectives have been linked to physiological outputs such as cell migration. The first evidence that  $\beta$ arrestins are involved in chemotaxis came from the observation that lymphocytes from  $\beta$ arrestin2-deficient mice are unable to migrate under CXCL12 stimulation [102]. Furthermore,  $\beta$ arrestin proteins are also required in the process of migration triggered by CXCR1, CXCR2, CXCR3 and CCR5 activation [120-123] and T cells lacking  $\beta$ arrestin2 expression are no longer able to migrate to inflammation sites in an animal model of asthma [124].

Protease Activated Receptor-2 (PAR-2) dependent migration was shown to be suppressed following  $\beta$ arrestins depletion in an invasive breast cancer cell line (MDA-MB-231) [125, 126]. Stimulation of this receptor was reported to promote  $\beta$ arrestin dependent dephosphorylation and activation of the actin filament-severing protein cofilin independently of  $G_{\alpha_q}/Ca^{2+}$  signalling. In addition,  $\beta$ arrestins can interact with LIMKinase as well as chronophin and are found colocalizing with these partners in membrane protrusions [126]. These data suggest that  $\beta$ arrestins may spatially regulate the activities of both LIMKinase and

chronophin. It was proposed that  $\beta$ arrestins also act to sequester an activated pool of Erk1/2 in pseudopodia of PAR-2 stimulated NIH3T3 cells [127]. Other MAPKs have been reported to be involved in the regulation of  $\beta$ arrestin dependent cell migration. In HEK 293 cells, knockdown of  $\beta$ arrestin2 blocked CXCR4 mediated chemotaxis by a mechanism involving the activation of p38 MAPK [128]. In addition, ATR stimulated chemotaxis was shown to be orchestrated by  $\beta$ arrestin2 and p38 activation [129]. Alternatively, in Hep2 cells, ATR and M1 muscarinic receptors require both  $\beta$ arrestins to initiate membrane ruffling via a mechanism involving filamin A and Erk1/2 [130]. Finally, it was also demonstrated that  $\beta$ arrestin1 and  $G_q$  play a role in actin rearrangement following Ang II stimulation by controlling the activity of the small GTPase RhoA [131]. The different signaling events regulated by  $\beta$ arrestin recruitment to the receptor are depicted in figure 4.

$\beta$ arrestin dependent regulation of cell migration has been shown to be of pathological relevance. For example, WHIM syndrome (warts, hypogammaglobulinemia, infections and myelokathexis) is characterized by the homozygous expression of truncated form of CXCR4. This mutated receptor is unable to undergo desensitization and exhibit enhanced  $\beta$ arrestin2 dependent Erk1/2 activation, resulting in enhanced leucocytes chemotaxis [132]. In atherosclerosis, it has been proposed that both  $\beta$ arrestins play reciprocal roles toward VSMC migration and proliferation, pointing  $\beta$ arrestin2 as a neointimal hyperplasia enhancer factor [133]. Finally, in colorectal cancer cells,  $\beta$ arrestin1 was reported to be involved in the c-Src mediated, PGE<sub>2</sub> dependent, EGFR transactivation responsible for Akt signalling and cell migration [134].

## RGS

RGS proteins are a family of GTPase activating proteins, which interact directly with several  $\alpha$  subunits of heterotrimeric G proteins to catalyze GTP hydrolysis and G protein down regulation [135]. This family of proteins counts 20 members in mammalian cells classified into 9 subfamilies according to sequence homology. In addition to controlling the fate of  $G_\alpha$ , RGS proteins have been

involved in regulating cell migration. The first evidence came from the observation that overexpression of RGS1, -3 and -4, but not RGS2, led to the inhibition of  $G\alpha_i$  dependent chemotaxis in lymphoid cells [136]. Similarly, induction of RGS3 expression significantly reduced LPA mediated cell migration in mIMCD-3 cells [137]. In B cells, RGS1 and a short isoform of RGS3 were reported to inhibit chemokine dependent migration, while RGS2 had no noticeable effects [138]. In CD4(+) and CD8(+) cells expressing RGS16, SDF-1 dependent chemotaxis was shown to be markedly reduced. This led to impaired cell recruitment to the lung after acute allergen inhalation [139]. In megakaryocytes, inhibition of this RGS protein was associated with decreased MAPK and Akt signalling, and impaired CXCR4 triggered migration [140]. RGS13 is also a negative regulator of SDF-1 mediated T cells chemotaxis [141]. In progenitor B cells, high levels of RGS1 were associated with impaired SDF-1 directed chemotaxis due to the diminution of focal adhesion kinase (FAK) membrane recruitment and phosphorylation [142]. In regulatory T cells, the ability of a cell to migrate was inversely correlated with RGS1, -9 and -16 expression levels [143]. Several studies therefore support a regulatory role for RGS proteins in GPCR dependent cell migration (Fig. 4).

In fast migrating glioma cells, a screening of overactivated genes, comparing to those present in a slower glioma cell line, revealed that RGS3 and RGS4 were overexpressed resulting to enhanced adhesion and chemotaxis [144]. Similarly, LPA induced cell migration involving  $G_{i2}$  signalling was greatly reduced in SKOV-3 ovarian cancer cells when RGS proteins were functional. Specifically, inhibition of RGS interaction with  $G\alpha_{i2}$  delayed hydrolysis of GTP-bound  $G\alpha_{i2}$  activity, resulting in more potent LPA dependent cAMP production [145]. These observations provide strong evidence of RGS involvement in cancer cells invasiveness.

## **5. Transactivation of tyrosine kinase receptors by G protein-coupled receptors, an alternative mechanism leading to cell migration.**

GPCRs can also diversify their signalization by communicating with and transactivating growth factor receptors. The first evidence of such a cross-talk between these two receptor families came from the observation that MAPK activation and DNA synthesis mediated by endothelin, LPA or thrombin treatments were blocked by a specific EGFR inhibitor [146]. Elucidation of the molecular mechanism demonstrated that EGFR transactivation was dependent upon the activation of metalloproteases of the ADAM family and the cleavage of pro-heparin binding EGF following GPCR activation [147, 148]. The specificity and mechanisms of activation of the ADAMS remains complex and dependent upon the nature of the receptor and cell type [149-151]. Because EGFR stimulation promotes cell migration through the activation of several signalling cascades such as the MAPK, the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) and PI3K pathways, transactivation of these receptors adds to the diversity of signalling cascades that can be stimulated by GPCRs [152-154] (Fig.4).

In VSMCs, migration stimulated by thrombin is proposed to be exclusively dependent upon EGFR transactivation since this biological process can be totally blocked by treatment with specific inhibitors of tyrosine kinase receptor activation [155]. In gastric epithelial cells, migration initiation has been linked to several growth factor receptors such as EGFR, Erb-B2 and Fibroblast Growth Factor-1 following gastrin-cholecystokinin(B) receptors activation [156]. Finally, AngII dependant chemotaxis was proposed to involve signal transduction emanating from the EGFR because migration of keratinocytes and fibroblasts was prevented by HB-EGF neutralizing antibodies and a pretreatment with an HB-EGF antagonist (CRM197) [157].

Transactivation of tyrosine kinase receptors by GPCRs has been implicated in cancer progression and formation of metastasis [158]. Gschwind and colleagues showed that LPA induced tumor cell migration was completely



dependant upon EGFR activity [159] triggered by the release of amphiregulin [160] in squamous carcinoma cells. More generally in breast, colon and renal carcinomas, RTK transactivation is one of the major events regulating chemotaxis following GPCR activation. It has been shown that treatment of breast cancer cells with either LPA, S1P or thrombin leads to EGFR activation and downstream signalling through Shc and Erk1/2. In this case, transactivation was mediated by a TACE metalloprotease, acting to cleaved HB-EGF [161]. In a colon carcinoma cell line, IL-8 mediated cell migration was also dependent upon transient EGFR activation. Pharmacological inhibitors of HB-EGF, ADAM proteases and MAPK were reported to be effective in blocking IL-8 induced motility [162]. Finally, in renal carcinoma cells, thrombin was shown to induce cell migration by activating the PAR-1, which in turn, transactivates EGFR [163].

## 6. Perspectives

Activation of GPCRs by extracellular stimuli promotes enhanced motile phenotypes for a broad variety of cells. This important biological process results from the activation of numerous signalling cascades involving proteins such as GTPases, kinases and  $\beta$ arrestins. These ultimately act in concert to regulate remodeling of the actin cytoskeleton. In this review, we have focused mainly on the early events activated following the stimulation of GPCRs. Ultimately, these signalling cascades act on others that have been shown to impact cell migration.

One of the key processes involves the turnover of focal adhesion complexes. Focal adhesions form a structural link between the extracellular matrix (ECM) and the actin cytoskeleton and are also important sites of signal transduction. Migrating cells continuously form and disassemble focal adhesion contacts at their leading edge, center and rear [164]. The regulation of focal adhesion kinase (FAK) activity as well as its interaction with signalling partners directly regulates adhesion dynamics. To date, approximately 150 different proteins have been shown to modulate formation of adhesion sites, stability and remodeling [165]. In order for adhesion to occur, integrins, engaged by binding to

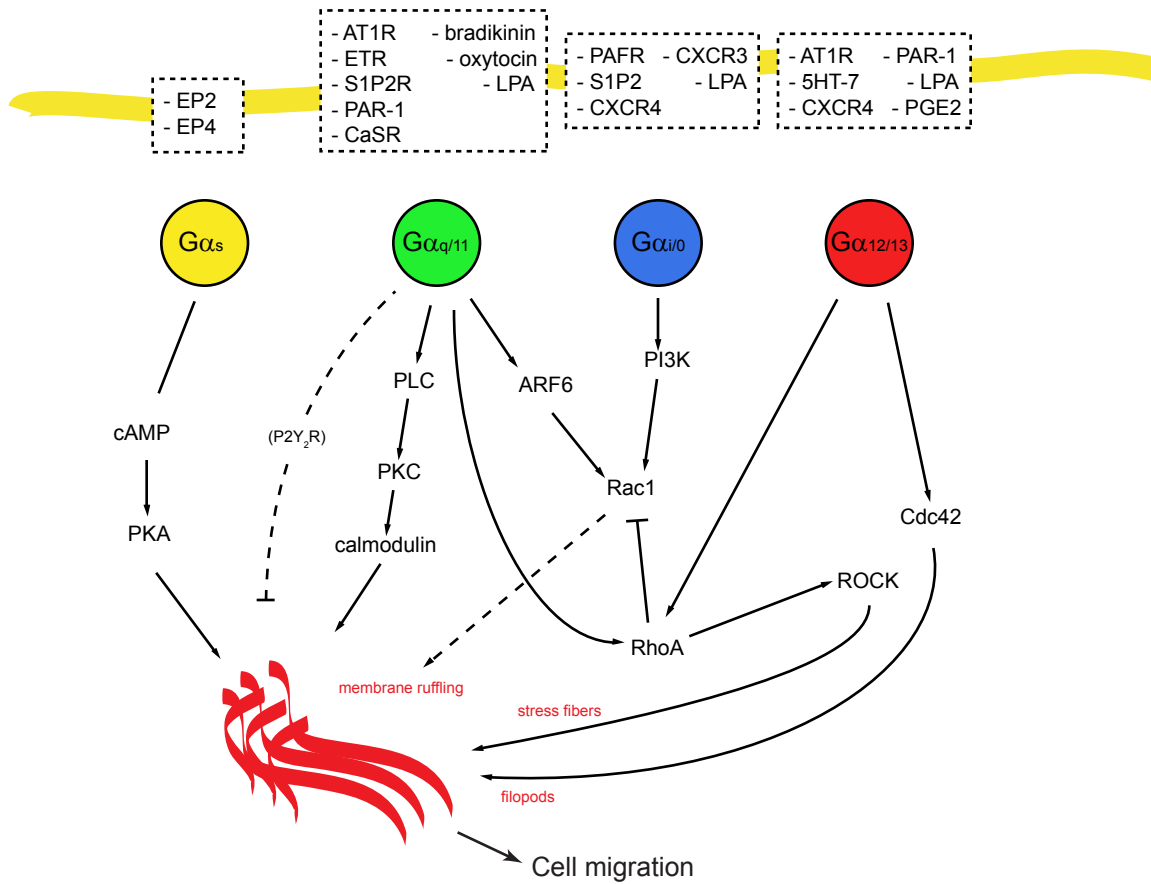
the ECM, act to recruit and activate talin, vinculin, paxillin, FAK and Src, amongst other proteins [166]. This newly formed signalling complex results in the generation of actin filament bundles, which are under the influence of Rho GTPases. FAK can regulate adhesion disassembly through activation of the MAPK pathway, myosin light chain kinase (MLCK), Src and p190RhoGAP, which decreases the activity of Rho and Rho kinase (ROCK) [167, 168]. This last event serves to recruit a complex containing the Rac/Cdc42 exchange factor PIX and the effector PAK. We have recently showed that the GTPase ARF6 is essential for focal adhesion turnover since its depletion greatly impairs deadhesion and migration of endothelial cells [13]. Ang II, LPA, ET-1 can all promote phosphorylation of FAK [13, 169], and therefore additionally act to control cell migration.

GPCR agonists that promote a change in cell shape can also lead to the activation of the MAPK Jnk, p38, and Erk. These are known for their roles in the regulation of cytoskeletal dynamics [170], because they act to phosphorylate downstream targets involved in the remodeling of actin. For example, Erk can phosphorylate myosin light chain kinase [171, 172], calpain [173], focal adhesion kinase [174], and other proteins, which all play important roles in cytoskeletal reorganization and cell migration. Activated Erk is found colocalizing with the muscarinic M1 receptor (M1MR) and  $\beta$ arrestin in dynamic plasma membrane ruffles and inhibition of Erk activation prevents M1MR dependent actin remodeling in Hep2 cells [130]. Alternatively, LPS induced U87 chemotaxis was shown to be mediated by p38, and Jnk, but also PI3K [175]. Similarly, inhibition of p38 led to decreased chemotaxis in HEK 293 cells [129]. Activation of the PI3K/Akt signalling cascade can also contribute to enhanced migration. For example, pretreatment of the cells with a PI3K inhibitor was shown to markedly reduce LPA and S1P induced breast cancer cell migration [161]. Although it is clear that remodeling of focal adhesions and activation of MAPKs regulate cell motility, the elucidation of the molecular mechanism by which GPCRs, in specific cell types, engage these pathways will require further investigation.

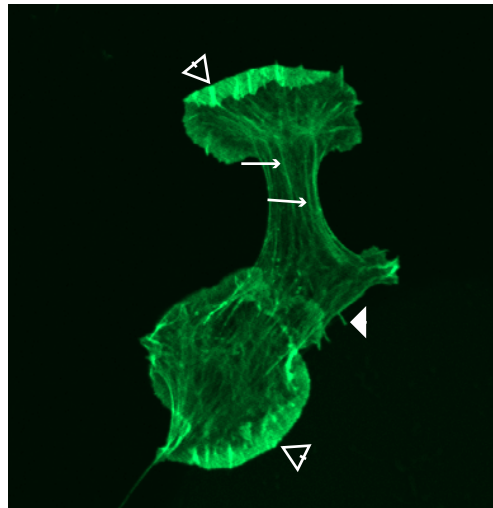
To this day, GPCRs remain an important pharmacological target. As describe in this review and others, these receptors control a large range of cellular responses, and their misregulation often results in pathological conditions [176-179]. The large number of identified receptors as well as the broad variety of stimuli by which their activity is regulated makes them a therapeutic target of choices. Although several proteins have been identified, the exact molecular mechanism by which signals are regulated in space and time to impair migration remains to be elucidated. A better understanding of these pathways will help generate more specific pharmacological tools for the treatment of pathologies characterized by impaired cell migration.

### **Acknowledgments**

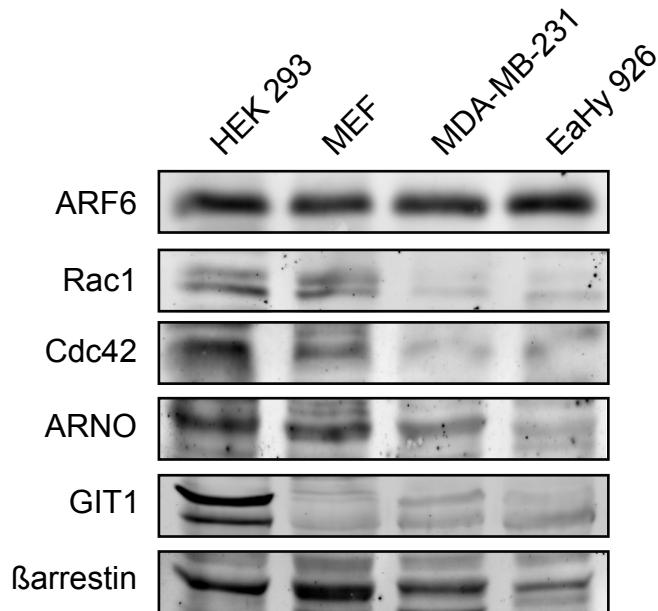
This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-79470 to AC. AC is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.



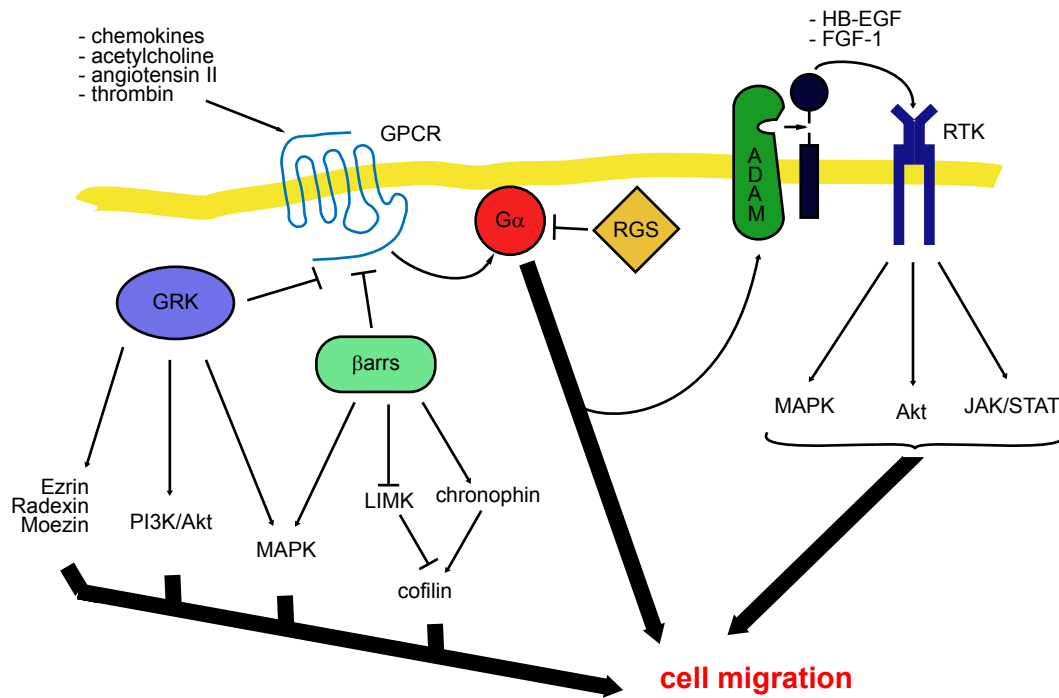
**Figure 1. G protein dependent pathways to migration.** All four major heterotrimeric G proteins are potentially linked to the induction of cell movement.  $G_s$  and  $G_q$  act through their cognate kinases (PKA and PKC).  $G_q$ ,  $G_i$  and  $G_{12/13}$  are also directly signalling via Rho GTPases to promote actin rearrangement.



**Figure 2. Stimulation of a G protein-coupled receptor leads to reorganization of the actin cytoskeleton.** Cells were stimulated for 30 min with AngII ( $1\mu\text{M}$ ), fixed, permeabilized and stained for the distribution of actin using phalloidin coupled to Alexa-488. Structures depicting lamellipodia are marked with empty arrows ends, filopodia with full arrow end and stress fibers are marked by thin arrows. This figure is representative of more than 50 cells in 4 independent experiments.



**Figure 3. Expression profile of key signaling proteins in different cell lines.** Lysates from HEK 293, Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), invasive breast cancer (MDA-MB-231), and endothelial (EaHy 926) cells were subjected to Western blot analysis. Endogenous levels of the GTPases ARF6, Rac1, and Cdc42, the ARF guanine nucleotide exchange factor ARNO, the ARF GTPase activating protein GIT1, and βarrestin proteins were examined using specific antibodies. This figure is representative of 3 independent experiments.



**Figure 4. The multiple ways for GPCR to mediate migration.** Following their activation, GPCRs can induce many signals dependent on either desensitizing proteins, such as GRK and arrestins, or transactivated RTKs, as EGFR and FGFR, revealing the many options for receptors to induce migration.

## 8. References.

- [1] Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. *Cancer Lett* 2007;256(2):137-165.
- [2] Burger JA, Kipps TJ. *Blood* 2006;107(5):1761-1767.
- [3] Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. *J Biol Chem* 2005;280(23):22473-22481.
- [4] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. *Nature* 2001;410(6824):50-56.
- [5] Hla T. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15(5):513-520.
- [6] Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S, Okamoto H, Matsui O, Takuwa Y. *Circ Res* 2002;90(3):325-332.
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- [8] Contos JJ, Ishii I, Chun J. *Mol Pharmacol* 2000;58(6):1188-1196.
- [9] Mills GB, Moolenaar WH. *Nat Rev Cancer* 2003;3(8):582-591.
- [10] Chen M, Towers LN, O'Connor KL. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(5):C1927-1933.
- [11] Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. *Hypertension* 1997;29(1 Pt 2):366-373.
- [12] Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(1):73-82.
- [13] Daher Z, Noel J, Claing A. *Cell Signal* 2008.
- [14] Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI, et al. *Nat Genet* 1992;1(2):85-91.
- [15] Kaslow HR, Burns DL. *Faseb J* 1992;6(9):2684-2690.
- [16] Sunyer T, Monastirsky B, Codina J, Birnbaumer L. *Mol Endocrinol* 1989;3(7):1115-1124.
- [17] Brown SL, Jala VR, Raghuwanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM. *J Immunol* 2006;177(5):3242-3249.



- [18] Yoon CM, Hong BS, Moon HG, Lim S, Suh PG, Kim YK, Chae CB, Gho YS. *Blood* 2008;112(4):1129-1138.
- [19] Thompson BD, Jin Y, Wu KH, Colvin RA, Luster AD, Birnbaumer L, Wu MX. *J Biol Chem* 2007;282(13):9547-9555.
- [20] Dutt P, Wang JF, Groopman JE. *J Immunol* 1998;161(7):3652-3658.
- [21] Curnock AP, Sotsios Y, Wright KL, Ward SG. *J Immunol* 2003;170(8):4021-4030.
- [22] Fischer AM, Mercer JC, Iyer A, Ragin MJ, August A. *J Biol Chem* 2004;279(28):29816-29820.
- [23] Tan W, Martin D, Gutkind JS. *J Biol Chem* 2006;281(51):39542-39549.
- [24] Jeong KJ, Park SY, Seo JH, Lee KB, Choi WS, Han JW, Kang JK, Park CG, Kim YK, Lee HY. *Exp Mol Med* 2008;40(6):607-616.
- [25] Donnini S, Finetti F, Solito R, Terzuoli E, Sacchetti A, Morbidelli L, Patrignani P, Ziche M. *Faseb J* 2007;21(10):2418-2430.
- [26] Yang L, Huang Y, Porta R, Yanagisawa K, Gonzalez A, Segi E, Johnson DH, Narumiya S, Carbone DP. *Cancer Res* 2006;66(19):9665-9672.
- [27] Cattaneo MG, Chini B, Vicentini LM. *Br J Pharmacol* 2008;153(4):728-736.
- [28] Kim J, Keys JR, Eckhart AD. *Cell Signal* 2006;18(10):1695-1701.
- [29] Taboubi S, Milanini J, Delamarre E, Parat F, Garrouste F, Pommier G, Takasaki J, Hubaud JC, Kovacic H, Lehmann M. *Faseb J* 2007;21(14):4047-4058.
- [30] Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, Loirand G, Pacaud P, Gadeau AP. *Circ Res* 2001;89(9):772-778.
- [31] Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V. *J Cell Biochem* 2004;93(6):1115-1133.
- [32] Wang M, Kong Q, Gonzalez FA, Sun G, Erb L, Seye C, Weisman GA. *J Neurochem* 2005;95(3):630-640.
- [33] Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. *Science* 2006;314(5806):1792-1795.
- [34] Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH. *Mol Biol Cell* 1999;10(6):1851-1857.

- [35] Yuan J, Slice LW, Gu J, Rozengurt E. *J Biol Chem* 2003;278(7):4882-4891.
- [36] Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, Ye RD, Huang S. *Oncogene* 2006;25(15):2234-2244.
- [37] Takashima S, Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y. *Cardiovasc Res* 2008;79(4):689-697.
- [38] Etienne-Manneville S, Hall A. *Nature* 2002;420(6916):629-635.
- [39] Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. *Biochem J* 2004;380(Pt 1):1-17.
- [40] Aspenstrom P, Ruusala A, Pacholsky D. *Exp Cell Res* 2007;313(17):3673-3679.
- [41] Ridley AJ. *Trends Cell Biol* 2006;16(10):522-529.
- [42] Wheeler AP, Ridley AJ. *Exp Cell Res* 2004;301(1):43-49.
- [43] Iizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Saito K, Furuta E, Liu W, Xing F, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. *Cancer Res* 2008;68(18):7613-7620.
- [44] Sasaki T, Takai Y. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(3):641-645.
- [45] Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. *J Biol Chem* 1989;264(15):8602-8605.
- [46] Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S, Narumiya S. *Oncogene* 1993;8(6):1449-1455.
- [47] Aspenstrom P. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(1):95-102.
- [48] Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. *Cell* 1992;70(3):401-410.
- [49] Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. *J Cell Biol* 1994;126(3):801-810.
- [50] Katoh H, Negishi M, Ichikawa A. *J Biol Chem* 1996;271(47):29780-29784.
- [51] Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Moolenaar WH. *Embo J* 1996;15(10):2388-2392.
- [52] Majumdar M, Seasholtz TM, Goldstein D, de Lanerolle P, Brown JH. *J Biol Chem* 1998;273(17):10099-10106.
- [53] Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S. *J Biol Chem* 2003;278(31):28743-28749.

- [54] Gohla A, Harhammer R, Schultz G. *J Biol Chem* 1998;273(8):4653-4659.
- [55] Fleming IN, Elliott CM, Exton JH. *J Biol Chem* 1996;271(51):33067-33073.
- [56] Betuing S, Daviaud D, Pages C, Bonnard E, Valet P, Lafontan M, Saulnier-Blache JS. *J Biol Chem* 1998;273(25):15804-15810.
- [57] Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. *J Biol Chem* 1997;272(33):20384-20388.
- [58] Han G, Fan B, Zhang Y, Zhou X, Wang Y, Dong H, Wei Y, Sun S, Hu M, Zhang J, Wei L. *Oncol Rep* 2008;20(4):929-939.
- [59] Devine KM, Smicun Y, Hope JM, Fishman DA. *Gynecol Oncol* 2008;110(2):237-245.
- [60] Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, Symons M. *Oncogene* 2005;24(53):7821-7829.
- [61] Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, Vitale N, Pitcher JA, Claing A. *Mol Biol Cell* 2007;18(2):501-511.
- [62] Kater SB, Rehder V. *Curr Opin Neurobiol* 1995;5(1):68-74.
- [63] Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. *Mol Cell Biol* 1995;15(4):1942-1952.
- [64] Nobes CD, Hall A. *Cell* 1995;81(1):53-62.
- [65] Nobes CD, Hall A. *J Cell Biol* 1999;144(6):1235-1244.
- [66] Chen F, Ma L, Parrini MC, Mao X, Lopez M, Wu C, Marks PW, Davidson L, Kwiatkowski DJ, Kirchhausen T, Orkin SH, Rosen FS, Mayer BJ, Kirschner MW, Alt FW. *Curr Biol* 2000;10(13):758-765.
- [67] Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R, Rottner K, Brakebusch C. *Mol Biol Cell* 2005;16(10):4473-4484.
- [68] Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(5):590-597.
- [69] Etienne-Manneville S, Hall A. *Cell* 2001;106(4):489-498.
- [70] Yamauchi J, Miyamoto Y, Kokubu H, Nishii H, Okamoto M, Sugawara Y, Hirasawa A, Tsujimoto G, Itoh H. *FEBS Lett* 2002;527(1-3):284-288.
- [71] Kvachnina E, Liu G, Dityatev A, Renner U, Dumuis A, Richter DW, Dityateva G, Schachner M, Voyno-Yasenetskaya TA, Ponimaskin EG. *J Neurosci* 2005;25(34):7821-7830.

- [72] Myers KR, Casanova JE. *Trends Cell Biol* 2008;18(4):184-192.
- [73] Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A. *J Biol Chem* 2008.
- [74] Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z, Donaldson JG. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 6):855-866.
- [75] Zhang Q, Cox D, Tseng CC, Donaldson JG, Greenberg S. *J Biol Chem* 1998;273(32):19977-19981.
- [76] Radhakrishna H, Klausner RD, Donaldson JG. *J Cell Biol* 1996;134(4):935-947.
- [77] Svensson HG, West MA, Mollahan P, Prescott AR, Zaru R, Watts C. *Eur J Immunol* 2008;38(3):818-828.
- [78] Bouschet T, Martin S, Kanamarlapudi V, Mundell S, Henley JM. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 15):2489-2497.
- [79] Santy LC, Casanova JE. *J Cell Biol* 2001;154(3):599-610.
- [80] Albertinazzi C, Za L, Paris S, de Curtis I. *Mol Biol Cell* 2003;14(4):1295-1307.
- [81] Palacios F, Schweitzer JK, Boshans RL, D'Souza-Schorey C. *Nat Cell Biol* 2002;4(12):929-936.
- [82] Koo TH, Eipper BA, Donaldson JG. *BMC Cell Biol* 2007;8:29.
- [83] Esteban PF, Yoon HY, Becker J, Dorsey SG, Caprari P, Palko ME, Coppola V, Saragovi HU, Randazzo PA, Tessarollo L. *J Cell Biol* 2006;173(2):291-299.
- [84] D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, Van Aelst L. *Embo J* 1997;16(17):5445-5454.
- [85] Tarricone C, Xiao B, Justin N, Walker PA, Rittinger K, Gamblin SJ, Smerdon SJ. *Nature* 2001;411(6834):215-219.
- [86] Di Cesare A, Paris S, Albertinazzi C, Dariozzi S, Andersen J, Mann M, Longhi R, de Curtis I. *Nat Cell Biol* 2000;2(8):521-530.
- [87] Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE. *Curr Biol* 2005;15(19):1749-1754.
- [88] Mitchell R, McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealton SC. *Nature* 1998;392(6674):411-414.

- [89] Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem* 2001;30:30.
- [90] Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Prog Neurobiol* 2002;66(2):61-79.
- [91] Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. *Annu Rev Biochem* 1998;67:653-692.
- [92] Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr M, Duyao M, Groot N, Church D, Wasmuth JJ, et al. *Hum Mol Genet* 1992;1(9):697-703.
- [93] Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. *J Biol Chem* 1997;272(15):10188-10195.
- [94] Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM. *Endocrinology* 1998;139(6):2784-2795.
- [95] Hargrave PA, McDowell JH. *Faseb J* 1992;6(6):2323-2331.
- [96] Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bertram PT, Wong F, Kraft TW, Osawa S. *Mol Vis* 1998;4:27.
- [97] Kohout TA, Lefkowitz RJ. *Mol Pharmacol* 2003;63(1):9-18.
- [98] Vroon A, Heijnen CJ, Lombardi MS, Cobelens PM, Mayor F, Jr., Caron MG, Kavelaars A. *J Leukoc Biol* 2004;75(5):901-909.
- [99] Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, Fong AM, Premont RT, Patel DD, Lefkowitz RJ, Heijnen CJ. *J Immunol* 2003;171(11):6128-6134.
- [100] Tarrant TK, Rampersad RR, Esserman D, Rothlein LR, Liu P, Premont RT, Lefkowitz RJ, Lee DM, Patel DD. *Clin Immunol* 2008;129(1):115-122.
- [101] Vroon A, Heijnen CJ, Raatgever R, Touw IP, Ploemacher RE, Premont RT, Kavelaars A. *J Leukoc Biol* 2004;75(4):698-704.
- [102] Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(11):7478-7483.
- [103] Jimenez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, Mayor F, Jr., Aragay AM. *Mol Biol Cell* 2006;17(1):25-31.

- [104] Premont RT, Claing A, Vitale N, Freeman JL, Pitcher JA, Patton WA, Moss J, Vaughan M, Lefkowitz RJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(24):14082-14087.
- [105] Premont RT, Claing A, Vitale N, Perry SJ, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem* 2000;275(29):22373-22380.
- [106] Naga Prasad SV, Jayatilleke A, Madamanchi A, Rockman HA. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):785-796.
- [107] Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor F, Jr. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(4):913-922.
- [108] Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL. *J Biol Chem* 1998;273(32):20308-20316.
- [109] Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SS, Hester S, Miller S, Caron MG, Lefkowitz RJ, Barak LS. *J Biol Chem* 1998;273(20):12316-12324.
- [110] Cant SH, Pitcher JA. *Mol Biol Cell* 2005;16(7):3088-3099.
- [111] Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. *Blood* 2006;108(9):2906-2913.
- [112] Barlic J, Khandaker MH, Mahon E, Andrews J, DeVries ME, Mitchell GB, Rahimpour R, Tan CM, Ferguson SS, Kelvin DJ. *J Biol Chem* 1999;274(23):16287-16294.
- [113] Kingsmore SF, Peppel K, Suh D, Caron MG, Lefkowitz RJ, Seldin MF. *Mamm Genome* 1995;6(4):306-307.
- [114] Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, 3rd, Lefkowitz RJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(29):12011-12016.
- [115] Wolfe BL, Trejo J. *Traffic* 2007;8(5):462-470.
- [116] McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ. *Science* 2000;290(5496):1574-1577.

- [117] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Science* 1999;283(5402):655-661.
- [118] Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(19):10782-10787.
- [119] Wei H, Ahn S, Barnes WG, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem* 2004;279(46):48255-48261.
- [120] Kraft K, Olbrich H, Majoul I, Mack M, Proudfoot A, Oppermann M. *J Biol Chem* 2001;276(37):34408-34418.
- [121] Richardson RM, Marjoram RJ, Barak LS, Snyderman R. *J Immunol* 2003;170(6):2904-2911.
- [122] Lagane B, Ballet S, Planchenault T, Balabanian K, Le Poul E, Blanpain C, Percherancier Y, Staropoli I, Vassart G, Oppermann M, Parmentier M, Bachelier F. *Mol Pharmacol* 2005;67(6):1966-1976.
- [123] Su Y, Raghuwanshi SK, Yu Y, Nanney LB, Richardson RM, Richmond A. *J Immunol* 2005;175(8):5396-5402.
- [124] Walker JK, Fong AM, Lawson BL, Savov JD, Patel DD, Schwartz DA, Lefkowitz RJ. *J Clin Invest* 2003;112(4):566-574.
- [125] Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. *J Biol Chem* 2004;279(53):55419-55424.
- [126] Zoudilova M, Kumar P, Ge L, Wang P, Bokoch GM, DeFea KA. *J Biol Chem* 2007;282(28):20634-20646.
- [127] Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K. *J Biol Chem* 2003;278(36):34418-34426.
- [128] Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. *J Biol Chem* 2002;277(51):49212-49219.
- [129] Hunton DL, Barnes WG, Kim J, Ren XR, Violin JD, Reiter E, Milligan G, Patel DD, Lefkowitz RJ. *Mol Pharmacol* 2005;67(4):1229-1236.
- [130] Scott MG, Pierotti V, Storez H, Lindberg E, Thuret A, Muntaner O, Labbe-Jullie C, Pitcher JA, Marullo S. *Mol Cell Biol* 2006;26(9):3432-3445.
- [131] Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren XR, Milligan G, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem* 2005;280(9):8041-8050.

- [132] Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, Baleux F, Gunera-Saad N, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F. *Blood* 2008;112(1):34-44.
- [133] Kim J, Zhang L, Peppel K, Wu JH, Zidar DA, Brian L, DeWire SM, Exum ST, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. *Circ Res* 2008;103(1):70-79.
- [134] Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(5):1492-1497.
- [135] De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:235-271.
- [136] Bowman EP, Campbell JJ, Druey KM, Scheschonka A, Kehrl JH, Butcher EC. *J Biol Chem* 1998;273(43):28040-28048.
- [137] Gruning W, Arnould T, Jochimsen F, Sellin L, Ananth S, Kim E, Walz G. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 2):F535-543.
- [138] Reif K, Cyster JG. *J Immunol* 2000;164(9):4720-4729.
- [139] Lippert E, Yowe DL, Gonzalo JA, Justice JP, Webster JM, Fedyk ER, Hodge M, Miller C, Gutierrez-Ramos JC, Borrego F, Keane-Myers A, Druey KM. *J Immunol* 2003;171(3):1542-1555.
- [140] Berthebaud M, Riviere C, Jarrier P, Foudi A, Zhang Y, Compagno D, Galy A, Vainchenker W, Louache F. *Blood* 2005;106(9):2962-2968.
- [141] Estes JD, Thacker TC, Hampton DL, Kell SA, Keele BF, Palenske EA, Druey KM, Burton GF. *J Immunol* 2004;173(10):6169-6178.
- [142] Le Y, Honczarenko M, Glodek AM, Ho DK, Silberstein LE. *J Immunol* 2005;174(5):2582-2590.
- [143] Agenes F, Bosco N, Mascarell L, Fritah S, Ceredig R. *Immunology* 2005;115(2):179-188.
- [144] Tatenhorst L, Senner V, Puttmann S, Paulus W. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(3):210-222.
- [145] Hurst JH, Henkel PA, Brown AL, Hooks SB. *Cell Signal* 2008;20(2):381-389.
- [146] Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. *Nature* 1996;379(6565):557-560.



- [147] Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. *Nature* 1999;402(6764):884-888.
- [148] Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1203-1208.
- [149] Schafer B, Gschwind A, Ullrich A. *Oncogene* 2004;23(4):991-999.
- [150] Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291(1):C1-10.
- [151] Rozengurt E. *J Cell Physiol* 2007;213(3):589-602.
- [152] Adam L, Vadlamudi R, Kondapaka SB, Chernoff J, Mendelsohn J, Kumar R. *J Biol Chem* 1998;273(43):28238-28246.
- [153] El-Obeid A, Bongcam-Rudloff E, Sorby M, Ostman A, Nister M, Westermark B. *Cancer Res* 1997;57(24):5598-5604.
- [154] Marone R, Hess D, Dankort D, Muller WJ, Hynes NE, Badache A. *Nat Cell Biol* 2004;6(6):515-522.
- [155] Kalmes A, Vesti BR, Daum G, Abraham JA, Clowes AW. *Circ Res* 2000;87(2):92-98.
- [156] Noble PJ, Wilde G, White MR, Pennington SR, Dockray GJ, Varro A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G75-84.
- [157] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, Tsuda T, Sayama K, Iwai M, Horiuchi M, Hashimoto K. *J Biol Chem* 2006;281(19):13209-13216.
- [158] Bholra NE, Grandis JR. *Front Biosci* 2008;13:1857-1865.
- [159] Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A. *Cancer Res* 2002;62(21):6329-6336.
- [160] Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A. *Embo J* 2003;22(10):2411-2421.
- [161] Hart S, Fischer OM, Prenzel N, Zwick-Wallasch E, Schneider M, Hennighausen L, Ullrich A. *Biol Chem* 2005;386(9):845-855.
- [162] Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T, Kubota H, Mori Y, Ohara H, Nomura T, Higashiyama S, Itoh M. *Cytokine* 2005;29(6):275-282.

- [163] Bergmann S, Junker K, Henklein P, Hollenberg MD, Settmacher U, Kaufmann R. *Oncol Rep* 2006;15(4):889-893.
- [164] Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20(1):85-90.
- [165] Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. *Nat Cell Biol* 2007;9(8):858-867.
- [166] Worth DC, Parsons M. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(11):2397-2409.
- [167] Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. *Nat Cell Biol* 2004;6(2):154-161.
- [168] Schober M, Raghavan S, Nikolova M, Polak L, Pasolli HA, Beggs HE, Reichardt LF, Fuchs E. *J Cell Biol* 2007;176(5):667-680.
- [169] Jiang X, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. *Cell Signal* 2007;19(5):1000-1010.
- [170] Huang C, Jacobson K, Schaller MD. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 20):4619-4628.
- [171] Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. *J Cell Biol* 1997;137(2):481-492.
- [172] Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, Sankovic M, Walker LA, Somlyo AV, Weber MJ, Gonias SL. *J Cell Biol* 1999;146(1):149-164.
- [173] Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A. *Mol Cell Biol* 2004;24(6):2499-2512.
- [174] Hunger-Glaser I, Salazar EP, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. *J Biol Chem* 2003;278(25):22631-22643.
- [175] Lee SY, Lee HY, Kim SD, Jo SH, Shim JW, Lee HJ, Yun J, Bae YS. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374(1):147-151.
- [176] Druey KM. *Immunol Res* 2008.
- [177] Dorsam RT, Gutkind JS. *Nat Rev Cancer* 2007;7(2):79-94.
- [178] Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T. *Pharmacol Ther* 2008;119(3):291-310.
- [179] Harris DM, Cohn HI, Pesant S, Eckhart AD. *Clin Sci (Lond)* 2008;115(3):79-89.