

Université de Montréal

**GREBP, un nouveau facteur de transcription contrôlant l'expression de la
guanylate cyclase A, récepteur de l'ANP, via l'élément de réponse au cGMP.**

par

Guy Martel

Programme de Sciences Biomédicales, CRCHUM

Faculté de Médecine

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

en Sciences Biomédicales

Décembre 2010

© Guy Martel, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**GREBP, un nouveau facteur de transcription contrôlant l'expression de la
guanylate cyclase A, récepteur de l'ANP, via l'élément de réponse au cGMP.**

Présentée par :

Guy Martel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jolanta Gutkowska, président-rapporteur

Johanne Tremblay, directrice de recherche

Marc Servant, membre du jury

Richard Larivière, examinateur externe

John S.D. Chan, représentant du doyen de la FES

Résumé en français

La découverte du système des peptides natriurétiques (NP), au début des années 80, fut une découverte majeure qui révéla le rôle endocrinien du cœur. Les connaissances sur la relaxation vasculaire, la diurèse et la natriurèse provoquées par ce système ont évolué vers un niveau de complexité insoupçonné à cette époque. Nous savons à présent que les NP sont impliqués dans plusieurs autres mécanismes dont la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) et le métabolisme des adipocytes. Le métabolisme des lipides est maintenant devenu une cible de choix dans la lutte contre l'obésité. Cette condition aux proportions pandémiques est un facteur de risque majeur dans l'apparition de l'hypertension et du syndrome métabolique (MetS). La compréhension des mécanismes et des défauts de la voie des NP pourrait avoir un impact positif sur le contrôle du MetS et de l'hypertension.

L'expression du récepteur des peptides natriuretiques de type 1 (NPR1/GCA) est contrôlée par plusieurs agents incluant son propre ligand, le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP). La découverte d'une boucle de retro-inhibition, dans les années 90, a été un événement majeur dans le domaine des NP. En effet, suite à une stimulation à l'ANP, le NPR1/GCA peut inhiber l'activité transcriptionnelle de son propre gène par un mécanisme dépendant du cGMP.

Notre groupe a identifié un élément *cis*-régulateur responsable de cette sensibilité au cGMP et mon projet consistait à identifier la ou les protéine(s) liant cet élément de réponse au cGMP (cGMP-RE).

Nous avons identifié un clone liant le cGMP-RE en utilisant la technique du simple hybride chez la levure et une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de rein

humain. Ce clone provient d'un ADNc de 1083-bp dont le gène est localisé sur le chromosome 1 humain (1p33.36) et codant pour une protéine dont la fonction était inconnue jusqu'ici. Nous avons nommé cette nouvelle protéine GREBP en raison de sa fonction de *cGMP Response Element Binding Protein*. Des essais de liaison à l'ADN ont montré que cette protéine possède une affinité 18 fois plus élevée pour le cGMP-RE que le contrôle, tandis que des expériences de retard sur gel (EMSA) ont confirmé la spécificité des interactions protéine-ADN. De plus, l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a prouvé que GREBP lie le cGMP-RE dans des conditions physiologiques. La liaison de GREBP au cGMP-RE inhibe l'expression du gène rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur de *npr1/gca*. L'inhibition de GREBP à l'aide d'ARN interférant active le promoteur de *npr1/gca*. Dans les cellules NCI-H295R, l'ANP stimule l'expression de *grebp* de 60% après seulement 3 heures et inhibe l'expression de *npr1/gca* de 30%.

GREBP est une protéine nucléaire surtout exprimée dans le cœur et ayant le facteur eIF3F comme partenaire. Les variations nucléotidiques du gène sont plus fréquentes chez les patients hypertendus que chez des patients normotendus ou hypertendus souffrant de MetS.

Nous rapportons ici l'existence d'un gène spécifique à l'humain qui agit comme répresseur transcriptionnel de *npr1/gca* et potentiellement impliqué dans le développement de l'hypertension.

Mots-clés: Hypertension, Syndrome métabolique, Obésité, Peptide natriurétique de l'oreillette, Récepteur des peptides natriuretiques de type 1, Régulation génique, Élément de réponse au cGMP, Répresseur transcriptionnel, Protéine nucléaire.

Résumé en anglais (abstract)

The natriuretic peptide (NP) system was a milestone discovery that revealed the endocrine role of the heart for the first time in the early 1980s. From its vasodilatory, natriuretic and diuretic actions, knowledge about this system has evolved to a degree of complexity unsuspected at that time. Now, through cGMP generation, NPs are involved in several other mechanisms, such as cell proliferation, apoptosis, renin-angiotensine-aldosterone system (RAAS) inhibition, and fat cell function. The latter point is of growing interest in lipid metabolism and has become an important issue in the fight against obesity. This pandemic condition is one of the main risk factors leading to hypertension development and metabolic syndrome (MetS) progression. Thus, understanding, at least in part, the lipid mobilization pathways controlled by NPs could have a positive impact in MetS management. As with hypertension, identifying defects in signaling pathways will certainly help to identify mechanisms implicated in lost sensitivity of the NP system.

Natriuretic peptide receptor 1 (*npr1/gca*) expression is controlled by several agents including its own ligand, the atrial natriuretic peptide (ANP). A major finding in NPs field occurred in the mid-90s when a mechanism involving a retro-inhibition loop was described. Indeed, after ANP stimulation, NPR1/GCA down-regulates the transcriptional activity of its gene via a cGMP-dependent mechanism.

Since our group previously identified a *cis*-acting element responsible for this cGMP sensitivity, I proceeded to explore novel putative protein binding to the cGMP-response element (cGMP-RE).

Using the yeast-one-hybrid technique with a human kidney cDNA library, we identified a strongly positive clone able to bind cGMP-RE. The clone was derived

from a 1083-bp long cDNA of a gene of yet unknown function localized on human chromosome 1 (1p33.36). We named this new protein GREBP for cGMP-Response Element-Binding Protein. DNA-binding assays showed 18-fold higher cGMP-RE-binding capacity than the controls while electromobility shift assay (EMSA) indicated a specific binding for the cGMP-RE and chromatin immuno-precipitation (ChIP) confirmed the binding of GREBP to the element under physiological conditions. By acting on cGMP-RE, GREBP inhibited the activity of a luciferase-coupled NPR1 promoter construct. In H295R cells, ANP heightened GREBP expression by 60% after just 3 hours of treatment while inhibiting *npr1/gca* expression by 30%. Silencing GREBP with specific small interfering RNA increased the activity of the luciferase-coupled NPR1/GCA promoter and NPR1/GCA mRNA levels.

GREBP is a nuclear protein mainly expressed in the heart and has the eIF3F factor as partner. Its nucleotide variations are more frequent in non-obese hypertensive patients than normotensive subjects or hypertensive patients suffering from MetS.

We report here the existence of a human specific gene acting as a transcriptional repressor of *npr1/gca* gene that could be implicated in hypertension development.

Keywords: Hypertension, Metabolic syndrome, Obesity, Atrial natriuretic peptide, Natriuretic peptide receptor 1, Gene regulation, cGMP-response element, Transcriptional repressor, Nuclear protein.

Table des matières

Résumé en français.....	iv
Résumé en anglais (abstract).....	v
Table des matières	viii
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux	xiv
Liste des sigles et abréviations	xv
Remerciements	xx
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Généralités.....	2
1.2 L'arginine-vasopressine	2
1.3 Le système rénine-angiotensine-aldostérone.....	3
1.4 Les endothélines	6
1.5 L'oxyde nitrique	8
1.6 Le système des peptides natriurétiques	11
1.6.1 Les voies de signalisation des récepteurs des peptides natriurétiques	11
1.6.2 La régulation de l'expression et de l'activité des NPR.....	16
1.6.3 Signalisation post-guanylate cyclase et événements cellulaires	22
1.6.3.1 La relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires	23
1.6.3.2 L'ANP, les reins et le système antagonique rénine-angiotensine-aldostérone.....	26
1.6.3.3 Le cGMP et la prolifération cellulaire	27
1.6.3.4 Les effets pro- et anti-apoptotiques	28
1.6.3.5 Fonction et métabolisme dans les adipocytes.....	29

1.6.4 Rôle du système des NP dans l'hypertension et le syndrome métabolique : la génétique expérimentale et les troubles de signalisation cellulaire	33
1.6.4.1 Le rôle dans la progression du syndrome métabolique	33
1.6.5 Rôle du système des NP dans la régulation de la pression sanguine et son potentiel diagnostique et thérapeutique dans l'hypertension	35
1.7 Facteurs de transcription, éléments cis-régulateurs et nucléotides cycliques	42
1.8 Objectifs du travail	44
Chapitre 2 Clonage d'une protéine liant l'élément de réponse au cGMP présent dans le promoteur de <i>npr1/gca</i>	46
2.1 Introduction au chapitre.....	47
2.2 Méthodologie.....	47
2.2.1 Criblage par simple hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de rein humain.....	47
2.2.2 Extension d'amorce et détermination de la taille de l'ARNm	49
2.3 Résultats	50
2.3.1 Criblage d'une banque d'ADNc de rein humain.....	50
2.3.2 Le gène, l'ARNm et la protéine	51
Chapitre 3 Interaction de GREBP avec l'ADN.....	58
3.1 Introduction au chapitre.....	59
3.2 Méthodologie.....	59
3.2.1 Les constructions plasmidiques	59
3.2.2 L'interaction GREBP-cGMP-RE : l'essai <i>in vitro</i> sur colonne d'affinité	61
3.2.3 L'interaction GREBP-cGMP-RE : les essais de retard sur gel	63
3.2.4 Localisation cellulaire de GREBP par microscopie en fluorescence.....	66

3.2.5 Immuno-précipitation de la chromatine suite à son interaction avec GREBP	67
3.3 Résultats	68
3.3.1 Interaction entre le cGMP-RE et GREBP	68
3.3.2 L'immuno-précipitation de la chromatine	78
3.3.3 Localisation cellulaire de GREBP	79
Chapitre 4 Contrôle de l'expression de <i>npr1/gca</i> par GREBP et l'ANP	81
4.1 Introduction au chapitre.....	82
4.2 Méthodologie.....	82
4.2.1 Les constructions plasmidiques	82
4.2.2 Études fonctionnelles de GREBP	84
4.2.3 Profil d'expression des gènes <i>grebp</i> et <i>npr1/gca</i>	85
4.3 Résultats	86
4.3.1 GREBP régule l'activité du promoteur de <i>npr1/gca</i>	86
4.3.2 Les effets de l'ANP sur l'expression des gènes <i>grebp</i> et <i>npr1/gca</i>	94
Chapitre 5 Les polymorphismes, les partenaires et la distribution tissulaire de GREBP	97
5.1 Introduction au chapitre.....	98
5.2 Méthodologie.....	98
5.2.1 Analyse de l'expression de <i>grebp</i> chez l'humain	98
5.2.2 Criblage par double hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de cœur humain.....	99
5.2.3 Co-immunoprécipitation du partenaire de GREBP	100
5.2.4 Séquençage du gène <i>grebp</i>	101

5.3 Résultats	101
5.3.1 Profil d'expression de <i>grebp</i> chez l'humain	101
5.3.2 Recherche des partenaires de GREBP	104
5.3.3 Variations de la séquence <i>grebp</i>	105
Chapitre 6 Discussion.....	113
Chapitre 7 Conclusion et perspectives	124
Bibliographie	130
Annexe I	xx
CENTRAL ROLE OF GUANYLYL CYCLASE IN NATRIURETIC PEPTIDE SIGNALING IN HYPERTENSION AND METABOLIC SYNDROME	xx
Annexe II.....	lxix
GREBP: A cGMP RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN REPRESSING THE TRANSCRIPTION OF NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR 1 (NPR1/GCA).....	lxix

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1	Les effets du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS).....	6
Figure 1.2	La voie de l'oxyde nitrique et de la guanylate cyclase soluble	10
Figure 1.3	Les récepteurs des peptides natriurétiques	15
Figure 1.4	L'ANP module l'activité et l'expression de NPR1/GCA	21
Figure 1.5	La relaxation des VSMC par l'ANP.....	25
Figure 1.6	Effets antagonistes de la stimulation par l'ANP et l'angiotensine II (ANG II) dans les adipocytes humains	32
Figure 1.7	Les associations génétiques du chromosome 1 humain	39

Chapitre 2

Figure 2.1	La technique du simple hybride chez la levure	51
Figure 2.2	Détermination de la taille du transcrit de GREBP	53
Figure 2.3	Les séquences nucléotidique et protéique de GREBP.....	55

Chapitre 3

Figure 3.1	Le protocole de liaison à l'ADN <i>in vitro</i>	63
Figure 3.2	Essai de liaison et déplacement <i>in vitro</i> du cGMP-RE aux protéines GST et GST-GREBP.....	69
Figure 3.3	Affinité des protéines GST et GST-GREBP pour le cGMP-RE	70
Figure 3.4	Interaction de GREBP avec le cGMP-RE par EMSA.....	72
Figure 3.5	Effet de la taille du cGMP-RE sur l'affinité avec GREBP	74
Figure 3.6	Inhibition de l'interaction entre les protéines GREBP-StrepTagII et le cGMP-RE par l'anticorps dirigé contre l'étiquette StrepTagII	76

Figure 3.7	Inhibition de l'interaction entre les protéines GREBP-HisTag et le cGMP-RE par l'anticorps dirigé contre l'étiquette HisTagII	77
Figure 3.8	Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) du complexe GREBP/cGMP-RE	79
Figure 3.9	Localisation cellulaire de GREBP.....	80
Chapitre 4		
Figure 4.1	L'activité du promoteur de <i>npr1/gca</i> est inhibée de façon dose-dépendante par la surexpression de <i>grebp</i>	87
Figure 4.2	L'inhibition du promoteur de <i>npr1/gca</i> est dépendante du cGMP-RE	89
Figure 4.3	La surexpression de <i>grebp</i> influence l'expression endogène de <i>npr1/gca</i>	91
Figure 4.4	La régulation transcriptionnelle de <i>npr1/gca</i> nécessite l'expression de <i>grebp</i>	93
Figure 4.5	L'expression de <i>grebp</i> est stimulée par l'ANP	94
Figure 4.6	La stimulation par l'ANP module l'expression de <i>grebp</i> et de <i>npr1/gca</i>	96
Chapitre 5		
Figure 5.1	Le profil de l'expression de <i>grebp</i> chez l'humain.....	103
Figure 5.2	Co-immunoprecipitation de eIF3F et GREBP dans des cellules HEK293	105

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I	Les différences entre certains facteurs de transcription spécifiques ...	43
-----------	--	----

Chapitre 2

Tableau II	Les prévisions de la phosphorylation des sérines de GREBP	56
Tableau III	Les prévisions de la phosphorylation des thréonines de GREBP	57

Chapitre 3

Tableau IV	Sondes utilisées pour les EMSA	66
------------	--------------------------------------	----

Chapitre 5

Tableau V	Polymorphismes de la séquence de <i>grebp</i> : la base de données de NCBI.....	106
Tableau VI	Polymorphismes de la séquence de <i>grebp</i> : les normotendus du SLSJ.....	108
Tableau VII	Polymorphismes de la séquence de <i>grebp</i> : les hypertendus du SLSJ.....	110
Tableau VIII	Polymorphismes de la séquence de <i>grebp</i> : les hypertendus avec syndrome métabolique du SLSJ	112

Liste des sigles et abréviations

ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ACTH	hormone adrenocorticotropique
ANG	angiotensine
ANP	peptide natriurétique des oreillettes (<i>atrial natriuretic peptide</i>)
ARE	élément riche en AU
ATP	adénosine triphosphate
AT-R	récepteur de l'angiotensine
AVC	accident vasculaire cérébral
AVP	arginine vasopressine
Bcl2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
bFGF	facteur de croissance basique des fibroblastes
BH4	(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine
BKCa	canal potassique activé par le calcium
BLAST	outil de recherche d'alignement local
BMI	index de masse corporelle
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 3
BNP	peptide natriurétique de type 3 (<i>brain natriuretic peptide</i>)
bp	paire de bases
BSA	albumine sérique bovine
CaM	calmoduline
cAMP	adénosine monophosphate-3',5' cyclique
cGMP	guanosine monophosphate-3',5'cyclique

cGMP-RE	élément de réponse au GMPc
GTP	guanosine triphosphate
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
CREBP	protéine de liaison à l'élément de réponse au AMPc
eGFP	protéine fluorescente verte améliorée
eIF3F	facteur d'initiation de la traduction eucaryotique, sous-unité F
EMSA	essai de retard sur gel
eNOS	NOS de type endothéliale
ET	endothéline
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAS	acide gras synthase
FFA	acide gras libre
FGF	facteur de croissance du fibroblaste
FMN	flavine mononucléotide
GC	guanylate cyclase
GFR	taux de filtration glomérulaire
GPCR	récepteur couplé aux protéines G
GREBP	protéine de liaison de l'élément de réponse au cGMP
GST	glutathion-S-transférase
GTP	guanosine triphosphate
HSL	lipase hormono-sensible
IP	immunoprécipitation
IP3	inositol triphosphate
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

IR	récepteur de l'IP ₃
IRAG	Substrat associé au récepteur de l'IP ₃ de la PKG
IRAP	aminopeptidase régulée par l'insuline-récepteur de l'ANG IV
JNK1	kinase NH ₂ terminal-1 c-Jun
KHD	domaine d'homologie kinase
LOD	logarithme de risque
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MetS	syndrome métabolique
MLC	chaînes légères de la myosine
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	phosphatase des chaînes légères de la myosine
M-MLV-RT	transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydé)
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NCBI	centre national de l'information en biotechnologie
NEFA	acide gras non-estérifié
NEP	endopeptidase neutre
NHE-1	échangeur Na ⁺ /H ⁺ de type 1
NO	oxyde nitrique
NOS	synthétase d'oxyde nitrique
NP	peptide natriurétique

NPR	récepteur des peptides natriurétiques
ONPG	ortho-nitrophényl- β -galactoside
PCG-1 α	coactivateur 1 α du récepteur nucléaire PPAR γ
PDE	phosphodiesterase
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP2	phosphatidylinositol bisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PLC	phospholipase C
pRB	protéine du rétinoblastome
QTL	locus de caractère quantitatif
RAAS	système rénine-angiotensine-aldostérone
SERCA	pompe à calcium ATPase du réticulum sarco-endoplasmique
SF1	facteur d'épissage 1
sGC	guanylate cyclase soluble
SHR	rat spontanément hypertendu
SNP	polymorphisme nucléotidique simple
TA	tension artérielle
TAG	triacylglyceride
UTR	région non-traduite
VDCC	canaux calciques dépendant du voltage
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VSMC cellules musculaires lisses vasculaires

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche, D^{re} Johanne Tremblay, qui, en m'acceptant au sein de son équipe, m'a offert la chance de développer mon expertise et d'acquérir de nouvelles compétences. Merci d'avoir cru en mon potentiel, de m'avoir fait confiance et surtout, de m'avoir offert un projet palpitant et novateur. J'ai appris énormément grâce à son encadrement et sa patience exemplaire a tempéré les moments plus difficiles. Merci aussi au D^r Pavel Hamet pour ses encouragements et les impromptues, mais enrichissantes, discussions de couloir.

J'aimerais remercier particulièrement l'équipe laboratoire sans qui ces années n'auraient jamais été aussi fantastiques. Carlos, Nathalie, Sandra, Evelyne, Christian, Valérie, Hiroyuki, Catherine; vous avez tous agrémenté mes longues heures au laboratoire et mis un peu, parfois même beaucoup, de vie dans les congrès. Un merci tout spécial à Suzanne qui a pris le temps de partager son expérience et pour toutes les nombreuses discussions animées sur l'impact de tel ou tel joueur.

Merci à ma famille et mes amis qui n'ont cessé de m'encourager tout au long de mes études. Surtout, Jessica, merci pour tout. Ta présence, ton écoute et ton amour ont fait de cette idée folle une réalité. C'est grâce à ton support et tes encouragements que, même dans le doute, j'ai persévéré. Merci, je t'aime.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Généralités

Le réseau vasculaire de tout organisme évolué est soumis à des variations de pression opérant en circuit fermé. Cet état permet une circulation sanguine efficace dans les divers organes. Afin de maintenir une efficacité optimale de perfusion, le réseau vasculaire doit être en mesure de répondre efficacement à différents stimuli. Les facteurs influençant la tension artérielle (TA) sont nombreux et complexes. Les plus importants modulateurs de la TA sont l'arginine-vasopressine (AVP), les endothélines (ET), le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS), l'oxyde nitrique (NO) et le système des peptides natriurétiques (NP). Les effets de l'AVP, des ET, du NO et du RAAS seront brièvement décrits alors que le système des NP sera le thème principal de cette thèse. L'accent est mis sur le système des NP puisque nos recherches portent exclusivement sur l'étude de cette voie de signalisation et son impact sur l'hypertension.

1.2 L'arginine-vasopressine

L'hormone AVP, un polypeptide de 9 acides aminés, est synthétisée par les neurones magnocellulaires et parvocellulaires situés dans l'hypothalamus (1). La relâche d'AVP est stimulée par une augmentation de l'osmolarité plasmatique, une chute de la TA ou une réduction du volume sanguin (2). L'AVP lie et stimule des récepteurs couplés aux protéines G possédant 7 passages transmembranaires (GPCR) (3). Le récepteur V_1 est présent sur plusieurs cellules dont les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) et sa stimulation par l'AVP provoque une vasoconstriction (4). La contraction des VSMC est causée par l'activation de la phospholipase C_β (PLC_β) par l'intermédiaire de la protéine $G_{\alpha_q/11}$ (5). Le produit de l'hydrolyse du

phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) par la PLC_β en diacylglycérol (DAG) et en inositol trisphosphate (IP₃), activeront respectivement la protéine kinase C (PKC) et la relâche de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (6).

Le second récepteur (V₂) se trouve dans plusieurs types cellulaires, mais notamment au niveau du tube collecteur du rein. Sa stimulation par l'AVP provoque l'activation de l'adénylate cyclase qui produit de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) (7;8). Par conséquent, le cAMP active la protéine kinase A (PKA) et induit la translocation de l'aquaporine-2 au niveau de la membrane cellulaire, du côté luminal du tube collecteur des néphrons (9). Les effets induits par la sécrétion d'AVP sont essentiels au contrôle de la tension artérielle (TA), à la modulation sympathique du système cardiovasculaire et à la prévention de l'hypotension (10;11).

1.3 Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Le RAAS joue aussi un rôle central dans le contrôle de la TA, du volume sanguin et de l'équilibre sodique. Une hyperactivité de ce système contribue au développement de plusieurs pathologies dont l'athérosclérose, l'hypertension, l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque (12). Dans le modèle endocrinien du RAAS, la cascade d'événements débute par la sécrétion hépatique de l'angiotensinogène et sa digestion par la rénine, une enzyme sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire du rein, en angiotensine (ANG) I (13-15). L'ANG I est alors transformée en ANG II par l'enzyme de conversion de l'ANG (ACE), une métalloprotéase surtout présente à la surface des cellules endothéliales vasculaires

pulmonaires (13;16-18). Bien que l'ANG II soit la molécule induisant les effets majeurs du système RAAS, des métabolites (ANG III, IV et 1-7) provenant de sa digestion subséquente par les aminopeptidases A et N peuvent également avoir des fonctions biologiques significatives (19). Au niveau du système nerveux central, l'ANG III peut avoir des effets importants dans le maintien de la TA et le développement de l'hypertension (19). L'ANG IV peut augmenter la TA en interagissant avec l'ANG II dans la liaison à son récepteur (19). Récemment, un autre sous-produit de l'ANG II, l'ANG 1-7, a été découvert et identifié à la voie du RAAS. Initialement relié à la sécrétion de vasopressine (20), des études ultérieures ont démontré que ce peptide est plutôt un antagoniste de la voie classique du RAAS (21). Cette transformation de l'ANG II en ANG 1-7 s'effectue sous l'action de l'ACE type 2 (ACE2), une peptidase très similaire à ACE. ACE et ACE2 sont toutes les deux des métalloprotéases transmembranaires homologues à 42% dans leur séquence protéique. L'organisation des introns et des exons suggère que ces deux gènes proviendraient d'un gène ancestral commun (22;23). Il existe à ce jour quatre types de récepteurs à l'ANG (AT-R) appartenant tous à la classe des GPCR. L'AT-R de type 1 (AT1-R) est largement distribué dans plusieurs tissus et serait responsable du contrôle de nombreuses fonctions physiologiques dont l'activité sympathique neuronale, la réabsorption du chlorure de sodium (NaCl), l'excrétion du potassium (K⁺), la vasoconstriction, la sécrétion d'aldostérone et d'AVP (24;25). L'AT-R de type 2 (AT2-R) est surtout présent dans les tissus fœtaux et en faible concentration chez l'adulte. Il contrôlerait la vasodilatation, la prolifération et l'apoptose des VSMC tout en inhibant la croissance et le remodelage du cœur (25;26). Le troisième type d'AT-R est le récepteur *Insulin Regulated-Aminopeptidase* (IRAP), une

aminopeptidase régulée par l'insuline et agissant comme récepteur de l'ANG IV. L'ANG IV lie IRAP et son activation peut provoquer une vasodilatation rénale, contrôler la croissance de diverses cellules (fibroblastes cardiaques, cellules endothéliales et VSMC) et induire une réponse inflammatoire vasculaire (27). Le dernier type de cette famille est le récepteur cardiaque Mas qui est stimulé par l'ANG 1-7. L'activation de MAS produit différentes réponses telles que la vasodilatation, la diminution de l'hypertrophie, la prolifération cellulaire et la fibrose (21). Les effets physiologiques de l'ANG 1-7 sont partiellement transmis par le récepteur Mas et également par la clairance de l'ANG II par ACE2, provoquant une diminution de la quantité circulante d'ANG II (21). Le RAAS est un système très complexe d'effets dont le dérèglement peut provoquer certaines pathologies graves. La figure 1.1 résume les effets classiques du RAAS et de ses principaux acteurs.

En plus de son statut endocrinien, le système rénine-angiotensine (RAS) possède une dimension plus locale et plusieurs tissus expriment les composantes du RAS. Les RAS tissulaires ont pour but d'amplifier la réponse du système circulant. Des études ont confirmé que l'expression de l'angiotensinogène et de ACE dans le rein provoque une augmentation locale de l'ANG II (28;29). La paroi des vaisseaux sanguins sécrète de la rénine et son substrat, l'angiotensinogène (30;31). De plus, ces vaisseaux expriment ACE2 et convertissent localement l'ANG II en ANG 1-7 pour activer le récepteur MAS (32). La production de ACE et ANG II a été observée dans le cœur, tandis que l'existence d'une rénine cardiaque est encore incertaine (33-35). De plus, l'ANG II stimule l'expression surrénaliennes d'une forme particulière de rénine (sans exon 1) régulant la synthèse d'hormones stéroïdiennes (36). Les deux mécanismes

fonctionnent en complémentarité. Ainsi, le RAS circulant est associé à des réponses aiguës tandis que le système tissulaire module les effets chroniques de l'ANG, tels que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (37).

Les effets du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS)

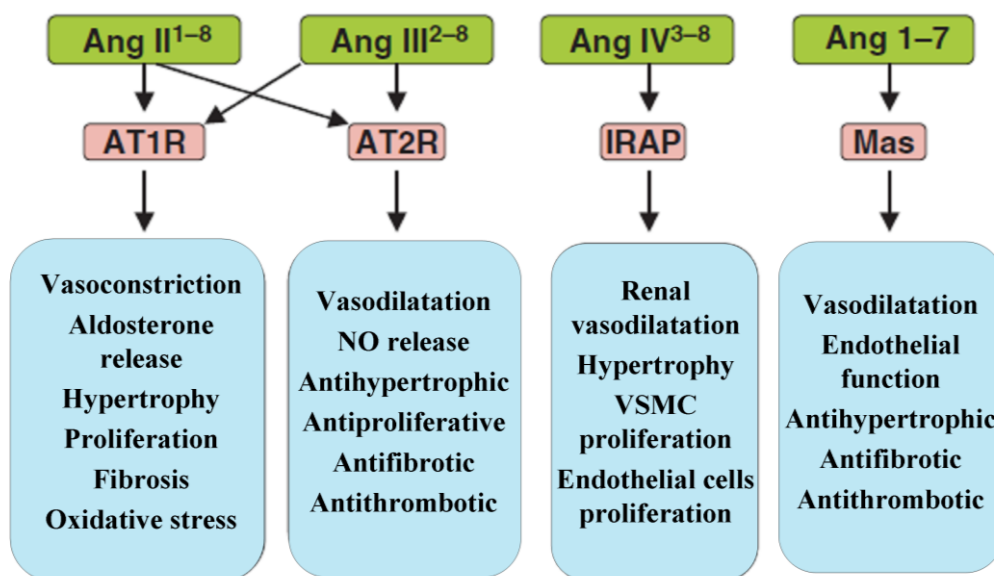


Figure 1.1 Les peptides actifs issus de la conversion de l'angiotensinogène provoquent leurs effets via les différents récepteurs de l'angiotensine (ANG). Ainsi, l'ANG II et l'ANG III sont en mesure de se lier à AT1-R et AT2-R tandis que l'ANG IV et l'ANG 1-7 se lient respectivement aux récepteurs IRAP et MAS. Figure tirée de Fyhrquist F, Saijonmaa O. (2008) *J Intern Med.* 264, 224-236.

1.4 Les endothélines

Les ET sont une famille d'hormones qui a été identifiée vers la fin des années 80. Les ET possèdent non seulement de puissants effets vasoconstricteurs, mais induisent

aussi une relaxation vasculaire indirecte. Les gènes humains de l'*et-1*, *et-2* et *et-3* sont situés respectivement sur les chromosomes 6, 1 et 20. L'ET-1 est exprimé par plusieurs types cellulaires tels que les VSCM, les cellules vasculaires endothéliales, les myocytes cardiaques, les fibroblastes, le pancréas et les cellules épithéliales des voies respiratoires (38;39). L'ET-2 est produit dans les cellules épithéliales intestinales et les ovaires. L'ET-3 est exprimé dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales intestinales (38). L'ET-1 est le plus connu des trois peptides. Son expression est notamment stimulée par l'insuline, l'épinéphrine, l'ANG II, le cortisol, la thrombine et la cyclosporine tandis qu'elle est inhibée par le NO et le guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (40). Les ET se lient à des récepteurs couplés aux protéines G possédant 7 passages transmembranaires. Le récepteur de type A (R-ET_A) lie préférentiellement l'ET-1, mais aussi les ET-2 et -3. Le récepteur de type B (R-ET_B) lie les trois formes d'ET avec la même affinité (41;42). La majorité des tissus expriment les R-ET et leurs distributions variées suggèrent un système multifonctionnel. Ainsi, la stimulation du R-ET_A des VSMC provoque une vasoconstriction soutenue tandis que la stimulation endothéliale de R-ET_B provoque une vasodilatation (41;43). L'action vasodilatatrice de R-ET_B passe par l'activation de la eNOS et la production de NO diffusant vers les VSMC (40). Le R-ET_A est couplé à la protéine G_{αq/11} qui stimule la phospholipase C_β provoquant l'augmentation de la concentration de DAG et, subséquemment, l'activation de la PKC (44;45). Des études ont aussi montré que la stimulation du R-ET_A provoque une hausse de la concentration de cAMP induisant ainsi l'activation de la PKA (46-48). La stimulation du R-ET_B et son interaction avec la protéine G_{αi/o} inhibe la formation de cAMP (49-51). Le système des endothélines est impliqué dans plusieurs pathologies. Les

patients souffrant d'hypertension pulmonaire ont des taux d'expression plus élevés d'ET-1 dans les cellules endothéliales pulmonaires (52). Les concentrations sériques d'ET-1 sont associées à une résistance vasculaire pulmonaire accrue et à une pression élevée dans l'oreillette droite (53;54). De plus, les taux circulants d'ET-1 sont étroitement liés à la sévérité des symptômes de l'insuffisance cardiaque (55;56). D'autres études ont montré que la paroi des vaisseaux sanguins des patients hypertendus renferme une concentration anormalement élevée d'ET-1 (57;58). Il ne fait aucun doute que les systèmes des endothélines ont un impact sur le développement des maladies cardiovasculaires.

1.5 L'oxyde nitrique

La voie du NO est un autre système de contrôle cardiovasculaire. Ce système débute avec l'oxydation de L-arginine par la NO synthétase (NOS) et produit le NO (59). La forme de NOS qui nous intéresse est la eNOS, ou NOS3, produite par les cardiomyocytes et les cellules endothéliales du système cardiovasculaire. Cette protéine dimérisée de 133 kDa contenant des domaines réductase et oxygénase est principalement associée aux cavéoles (60). La réaction enzymatique produite par la eNOS est complexe et nécessite plusieurs co-facteurs dont la calmoduline (CaM), la (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4), un noyau d'hème, la flavine adénine dinucléotide (FAD) ainsi que la flavine mononucléotide (FMN) (60). La réaction catalysée par eNOS utilise la L-arginine, l'oxygène et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). Les produits de cette réaction sont la L-citrulline, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (NADP) et la molécule active qui est le NO (61). Celui-ci active alors la guanylate cyclase (GC)

soluble (sGC) en diffusant librement des cellules endothéliales jusqu'au VSMC. L'appellation enzyme soluble est controversée car des études ont mis en évidence que la GC peut aussi se retrouver dans les fractions membranaires (62). Plutôt que d'être ancrée à la membrane plasmique, elle y serait plutôt associée par des interactions protéine-protéine (63). La nomenclature pourrait alors représenter son mécanisme comme étant *NO-sensitive GC* puisque la sGC se trouve en majorité à la membrane dans les cellules endothéliales tandis qu'elle se concentre dans le cytoplasme des VSMC (63). Le débat continue. L'activation de la sGC provoque l'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP) en cGMP, une molécule puissante dont les effets seront discutés dans les sections subséquentes. La sGC est composée de deux sous-unités, α et β , possédant chacune deux isoformes (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) pouvant homo- ou hétéro-dimériser (64-66). Les formes α_1 , α_2 et β_1 sont exprimées dans divers tissus comme le cerveau, les poumons, le cœur, la rate, les reins et les muscles (67-70). Chez l'humain, la forme β_2 est exclusivement exprimée dans les tumeurs gastriques (71). La sGC est divisée en trois domaines distincts. Un domaine N-terminal, ou domaine de régulation, contenant un noyau d'hème coincé entre deux sous-unités nécessaires à la reconnaissance et à la liaison du ligand NO (72). Un domaine central sert à assembler les sous-unités afin de former un dimère actif (73). Le domaine C-terminal contient les éléments catalytiques essentiels à l'hydrolyse du GTP en cGMP (74). Les taux de sGC sont sous le contrôle de plusieurs facteurs dont l'estrogène, le cAMP, les générateurs de NO, le facteur de croissance neural, les lipopolysaccharides (LPS) ainsi que l'interleukine-1 β (75-79). C'est dans sa capacité à produire le cGMP que le système NO tire son importante contribution au système cardiovasculaire. Une défectuosité dans sa voie de signalisation ou une perte de la biodisponibilité du NO

peut entraîner des pathologies majeures telles que l'athérosclérose, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, une sténose vasculaire, une inflammation ou des accidents vasculaires cérébraux (80). La figure 1.2 résume les mécanismes catalytiques du système NO.

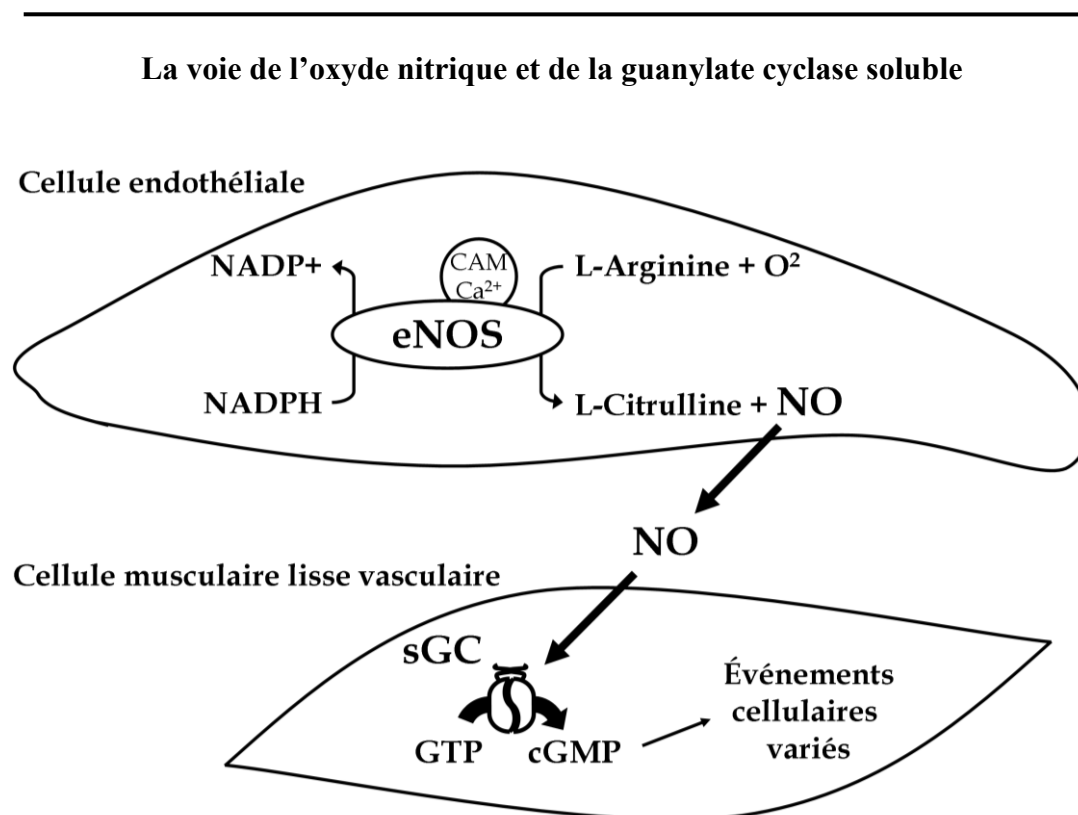


Figure 1.2 La voie de l'oxyde nitrique (NO) dans le tissu vasculaire débute avec la conversion de L-Arginine (par l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS)) en NO dans les cellules endothéliales. Le NO diffuse librement jusqu'aux cellules musculaires lisses vasculaires pour stimuler la guanylate cyclase soluble (sGC) favorisant la production de cGMP à partir de GTP. Le second messager, le cGMP, atteint ses cibles afin de produire différents effets sur la cellule.

1.6 Le système des peptides natriurétiques

Étudié depuis près de 30 ans pour sa capacité à contrôler plusieurs fonctions, le système des NP est de plus en plus considéré comme un joueur important dans diverses voies métaboliques. Son rôle premier est de diminuer la résistance périphérique du réseau vasculaire et d'augmenter la filtration glomérulaire pour abaisser la TA générale. En plus de moduler la TA, les NP agissent directement sur le cœur en inhibant l'hypertrophie, la fibrose et le remodelage cardiaque. Le système des NP est étroitement lié au développement de l'obésité et du syndrome métabolique (MetS). Initialement étudié au niveau de l'hypertension, ce système fait aujourd'hui l'objet de nouvelles approches appliquées à la pathologie pandémique qu'est l'obésité. Les prochaines sections traitent des différents aspects du systèmes des NP qui sont résumés dans une publication récente (annexe I (81)).

1.6.1 Les voies de signalisation des récepteurs des peptides natriurétiques

Depuis la découverte du NP auriculaire (ANP) en 1981 (82), l'étude des voies de signalisation associées aux récepteurs des NP (NPR) est devenue l'intérêt majeur de nombreux groupes de recherche (83-101). À la suite à une injection intraveineuse d'un homogénat d'oreillettes de rats, il a été démontré que le composé actif contenu dans les oreillettes est un peptide qui abaisse rapidement la TA et promeut les excréctions d'eau et de sodium par un mécanisme dépendant du cGMP (92). La famille des NP des mammifères compte deux autres membres importants, soit les NP de type B (BNP) et de type C (CNP), tous deux identifiés dans le cerveau du porc (96;97). D'autres NP ont par la suite été identifiés. L'urodilatine est une hormone natriurétique produite par les tubules distaux du rein. Elle agit localement et

correspond à une forme tronquée de la pro-hormone ANP (102). La guanyline et l'uroguanyline sont exprimées par l'épithélium intestinal en réponse aux repas salés. Ces deux peptides sont impliqués dans l'absorption d'eau par l'intestin et l'excrétion des électrolytes par les reins (103;104). Un peptide possédant les caractéristiques des NP a été isolé dans les muscles et les os (105;106). L'ostéocrine, ou musculine, est exprimée par les ostéoblastes durant le développement néonatal et le remodelage des os (107). Les connaissances sur ce peptide sont encore fragmentaires. Nous examinerons plus profondément les particularités de l'ANP, du BNP et du CNP. Ces trois peptides partagent une structure similaire constituée d'un anneau de 17 acides aminés formé par un pont disulfure. Chez l'humain, la forme active de l'ANP est un peptide composé de 28 acides aminés alors que le BNP et le CNP comptent respectivement 32 et 22 acides aminés. L'ANP est surtout produit dans les oreillettes et s'accumule dans des granules sous la forme de pro-ANP, un peptide de 126 acides aminés. La sécrétion du pro-ANP est stimulée par l'étirement de l'oreillette causé par un surplus de volume sanguin auriculaire (88). Plusieurs hormones telles que l'endothéline, l'ANG II, l'AVP et l'ocytocine stimulent également la sécrétion de pro-ANP (108-111). La corin, une protéase sérine transmembranaire agissant à titre d'enzyme de conversion, clive le pro-ANP afin de relâcher l'ANP sous sa forme active (88;101). L'ANP circulant agit subséquentement sur le cœur, les reins, les poumons, le muscle lisse vasculaire ainsi que le tissu adipeux. Le BNP est un peptide long de 134 acides aminés qui agit sur les mêmes organes que l'ANP et est également produit par le cœur sous la forme pré-pro-BNP. Il est secrété lors de l'étirement des parois ventriculaires et le facteur de transcription GATA-4 en régule la production. (91;99). En comparaison à l'ANP et au BNP, le CNP agit de manière

autocrine/paracrine. Le CNP est sécrété par l'endothélium vasculaire afin de contrôler le tonus vasculaire ainsi que la croissance des cellules endothéliales (87). Chez l'humain, les gènes de l'*anp* et du *bnp* sont situés sur le chromosome 1 au même locus 1p36.3 alors que le gène du *cnp* est sur le chromosome 2 entre 2q24 et la fin du segment 2q. Chez la souris, les gènes de l'*anp* et du *bnp* sont sur le chromosome 4 (4E2) et le gène du *cnp* est situé sur le chromosome 1 au locus 1D. Les gènes *anp*, *bnp* et *cnp* du rat sont respectivement sur les chromosomes 5q35, 5q36 et 9q35. La structure similaire des NP suggère l'existence d'un gène commun ancestral. Il a été proposé que le gène du *cnp* aurait engendré les gènes de l'*anp* et du *bnp* par duplication (98).

La famille des NPR comprend trois membres, le NPR1 ou NPRA, NPR2 ou NPRB et NPR3 ou NPRC. NPR1 et NPR2 possèdent l'activité enzymatique nécessaire pour transmettre le signal provenant des NP. Aussi nommés guanylates cyclases A et B (GCA et GCB), ces récepteurs sont structurellement très semblables et s'assemblent en homodimère indépendamment de la liaison de l'hormone (112). Chaque monomère est composé d'un large domaine extracellulaire liant le NP, un domaine transmembranaire unique, un domaine d'homologie kinase (KHD) phosphorylé, un domaine de dimérisation de type « coil-coil » et un domaine catalytique GC à l'extrémité intracellulaire carboxy-terminale (89;90;95;100). La désignation KHD se rapporte à l'homologie avec un domaine kinase et non pas à la possibilité que cette section du NPR ait l'activité. Une étude récente a montré que la phosphorylation de 6 résidus sérines et thréonines du KHD est essentielle à l'activation du récepteur (113). Cependant, aucune étude n'a identifié la protéine kinase impliquée dans la

phosphorylation du KHD (113). Le domaine catalytique des GC membranaires est homologue en séquence et en structure aux sGC tel que décrit dans la section 1.4 (114). Bien que NPR1/GCA puisse lier tous les NP, il possède une affinité supérieure pour l'ANP et le BNP. NPR2/GCB est toutefois activé préférentiellement par le CNP (86). NPRC est un récepteur sans activité GC et contient un très court domaine intracellulaire de 37 acides aminés (94). Originellement décrit comme étant un récepteur de clairance des NP, d'autres études ont démontré son association au système de signalisation adénylyl cyclase/cAMP par une protéine G inhibitrice (83;84;93). La figure 1.3 schématise la structure des NPR et les NP reconnus.

Les récepteurs des peptides natriurétiques

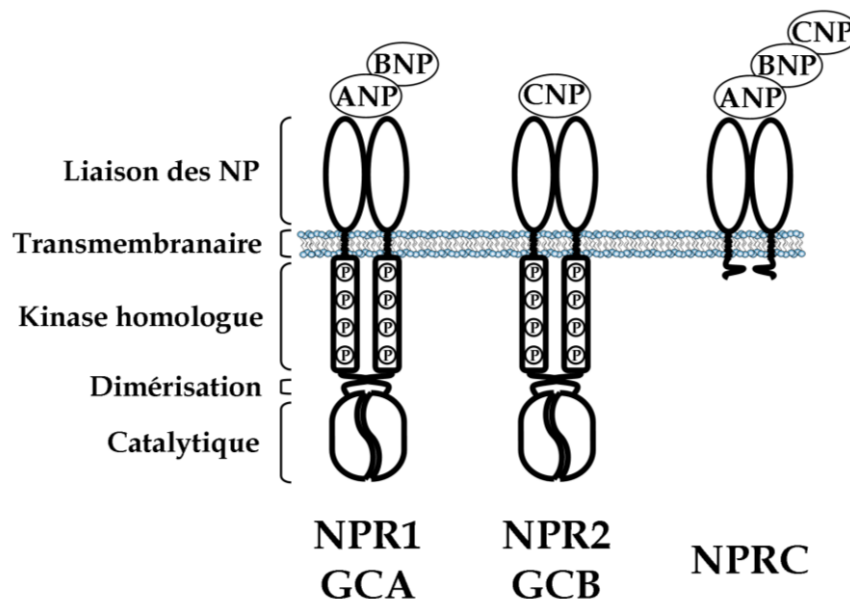


Figure 1.3 Les récepteurs NPR1/GCA et NPR2/GCB ont la même topologie. Ils sont composés d'un domaine extracellulaire liant les NP, un domaine transmembranaire, un domaine d'homologie kinase, un domaine de dimérisation et un domaine catalytique guanylyl cyclase. NPR1/GCA lie préférentiellement l'ANP et le BNP tandis que NPR2/GCB est activé par le CNP. Le récepteur NPRC lie les trois NP et ne possède pas de domaine d'activité catalytique mais une courte section intracellulaire.

Les activités de NPR1/GCA et de NPR2/GCB sont hautement contrôlées. À l'état basal, la conversion de GTP en GMP par le domaine GC est faible. La liaison d'un NP au domaine extracellulaire d'un récepteur homodimérisé provoque son activation en induisant un changement conformationnel du récepteur permettant à l'ATP de lier le KHD et d'activer le domaine catalytique GC. La GC active est composée des deux domaines du récepteur homodimérisé provoquant la production de cGMP. Ce second messenger transmet ultimement le signal du NP en ciblant plusieurs protéines dont la protéine kinase G (PKG), les canaux ioniques ainsi que les phosphodiésterases (PDE) (85). Les cibles du cGMP seront discutées ultérieurement.

1.6.2 La régulation de l'expression et de l'activité des NPR.

L'expression et l'activité des récepteurs des NP sont contrôlées par plusieurs facteurs incluant les facteurs de croissance, l'ANG II, les endothélines, les glucocorticoïdes et les NP eux-mêmes. La régulation de l'activité transcriptionnelle du *npr1/gca* est la plus étudiée des trois NPR. Le promoteur des gènes de *npr1/gca* de l'humain, du rat et de la souris est composé d'une boîte inversée CCAAT remplaçant la typique boîte TATA, et constitue l'élément de base nécessaire au recrutement des facteurs de transcription. Le promoteur du gène de *npr1/gca* contient plusieurs éléments régulateurs de l'expression de son ARN messager. Parmi ceux-ci, il y a trois sites de liaison Sp1 contrôlant l'activité transcriptionnelle. La mutation d'un seul de ces sites entraîne une baisse de l'activité promotrice du gène *npr1/gca* de 50%, et de plus de 90% lors de la délétion de tous les sites Sp1. La surexpression du facteur de transcription Ets-1 dans les cellules mésangiales de souris résulte en une augmentation du transcrit NPR1/GCA de 12 fois en comparaison au contrôle, alors

que la mutation de l'élément c-Ets-1 abolit complètement cette hausse d'expression (115). La position du site de départ de la transcription est une différence majeure entre les gènes *npr1/gca* de l'humain, du rat et de la souris. Ainsi, le site initiateur de la transcription de l'humain se situe à 88 paires de bases (bp) en amont du site d'initiation de la traduction du NPR1/GCA, alors que cette même région 5' non-traduite est de 362 bp chez la souris et de 370 bp chez le rat (116). Ceci suggère l'existence de mécanismes de transcription distincts entre les espèces. Un de ces mécanismes a déjà été élucidé chez le rat. Le promoteur du gène de *npr1/gca* de rat contient une répétition de nucléotides T et A dont le nombre est inversement proportionnel à l'expression du transcrit NPR1/GCA. Malgré la réponse exagérée à l'ANP chez le rat spontanément hypertendu (SHR), un modèle animal d'hypertension, cette longue répétition de dinucléotides T et A est associée à un taux réduit d'ARNm de NPR1/GCA comparativement à la souche normotendue *Brown Norway* (BN) (117;118). Un nombre intermédiaire de nucléotides T et A, compris entre les 10 répétitions de la souche BN et les 40 de la souche SHR, produit un taux intermédiaire de l'expression du transcrit NPR1/GCA (118).

Les ligands naturels des NPR contrôlent directement les quantités de récepteurs exprimés. Un pré-traitement *in vitro* d'ANP entraîne une diminution de la densité de NPR1/GCA et une inhibition de la synthèse de cGMP dans les cellules endothéliales et les VSMC (119-124). Une pré-stimulation à l'ANP de cellules musculaires lisses de l'aorte du rat entraîne une diminution de la liaison subséquente de l'ANP; cet effet est dépendant de la dose utilisée et du temps (125). Les taux de NPR1/GCA sont contrôlés par une boucle de rétro-inhibition impliquant une molécule clé, le cGMP.

La stimulation par l'ANP du promoteur du gène *npr1/gca* inhibe sa propre expression par un mécanisme cGMP-dépendant (125). Cette inhibition transcriptionnelle peut être enclenchée par les trois NP et le bromo-8-cGMP (un analogue non hydrolysable du cGMP) et amplifiée par l'inhibition des PDE. Cependant, aucune inhibition n'est observée suite à la stimulation spécifique de NPRC avec du C-ANF, un homologue de l'ANP incapable d'activer les GC membranaires (126). L'élévation du cGMP intracellulaire par la stimulation des NPR1/GCA et NPR2/GCB entraîne donc l'inhibition transcriptionnelle du gène *npr1/gca*. D'autres enzymes influençant les concentrations de cGMP (par exemple la sGC) pourraient également être impliqués dans ce phénomène. Près de 10 ans après cette découverte, une partie de ce mécanisme a été élucidée. L'inhibition transcriptionnelle est sous le contrôle d'un élément de régulation-*cis*, présent dans le promoteur du gène *npr1/gca*, appelé élément de réponse au cGMP (cGMP-RE) (127). Il s'agit d'un court segment du promoteur de *npr1/gca* en position -1546 à -1523 bp chez l'humain ayant la séquence 5'-AGGAAATGTACTTCAACATTCTGC-3'. Ce cGMP-RE a aussi été caractérisé chez la souris (5'-AGAAAATAGATTTCAACAGTTTGC-3') et le rat (5'-AGAAAATAGACTTCAACAGTTTGC-3'). Cet élément module l'expression du promoteur de *npr1/gca* suite à la stimulation des cellules par l'ANP. La délétion du cGMP-RE rend le promoteur de *npr1/gca* insensible au cGMP, alors que sa seule présence permet d'inhiber un gène rapporteur couplé à la luciférase (127). Les facteurs-*trans* impliqués dans la sensibilité au cGMP ne sont pas encore identifiés.

Pareillement au *npr1/gca*, le promoteur de *npr2/gcb* ne contient pas de boîte TATA, mais est contrôlé par une boîte CCAAT inversée et possède plusieurs sites de liaison

Sp1. Par contre, le cGMP-RE présent dans le promoteur de *npr1/gca* est absent dans celui de NPR2/GCB, suggérant que la boucle de rétro-inhibition n'implique pas le même élément *cis* ou que ce type de rétroaction est absent dans la voie de signalisation CNP-NPR2/GCB-cGMP.

La désensibilisation est un mécanisme supplémentaire qui peut également contrôler l'action des NP en affectant l'activité du récepteur plutôt que ses taux d'expression. Le mécanisme de désensibilisation homologue se produit rapidement après la liaison des NP au récepteur, et ce, indépendamment de l'accumulation de cGMP (128). Suite à la liaison et l'activation du récepteur par un NP, l'état de phosphorylation du domaine KHD de la région intracellulaire des NPR1/GCA et NPR2/GCB est rapidement réduit sous l'action d'une protéine phosphatase causant la dissociation des monomères et la diminution de l'activité cyclase du domaine GC. Ce mécanisme de désensibilisation homologue a été observé au niveau des récepteurs NPR1/GCA et NPR2/GCB. Une étude a identifié une protéine de 55 kDa interagissant avec le domaine KDH de NPR1/GCA et contenant un domaine catalytique de type sérine phosphatase (129). Ce groupe a aussi identifié la protéine phosphatase 5 (PP5) comme étant la phosphatase responsable de la désensibilisation de NPR1/GCA (130). Son mode d'action est cependant ambigu et son implication dans le mécanisme de déphosphorylation du récepteur est controversée. Il se pourrait que l'interaction PP5-NPR1/GCA soit directe ou favorisée par la chaperonne hsp90 (*heat shock protein 90*) (130). La figure 1.4 résume ces mécanismes de modulation de l'activité et l'expression de NPR1/GCA dépendante de l'ANP. Certains agents dont l'ANG II, l'acide lysophosphatidique, le sphingosine-1-phosphate, le facteur de croissance

dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance fibroblastique (bFGF) et les endothélines peuvent induire la désensibilisation hétérologue des récepteurs NPR1/GCA et NPR2/GCB. L'activation de la PKC par ces agents provoque la déphosphorylation de résidus du KHD qui sont différents de ceux déphosphorylés lors de la désensibilisation induite par les NP (131). En plus de la voie PKC, une élévation du calcium intracellulaire sous l'action de l'IP₃ peut causer la désensibilisation du récepteur NPRB (132).

Le mouvement des NPR dans la cellule joue aussi un rôle important dans la modulation des signaux provenant des NP. Ainsi, l'activité des NPR est contrôlée par l'internalisation et la dégradation des récepteurs (133). Après la stimulation, le ligand et le récepteur sont internalisés et dirigés par les endosomes vers les lysosomes. La majorité de l'ANP et environ 60% des récepteurs NPR1/GCA internalisés sont dégradés. Les récepteurs restant sont redirigés vers la membrane plasmique. Ce processus ne prend que quelques minutes, permettant aux NPR d'être rapidement stimulés de nouveau. Cependant, la vitesse et le taux de récupération des NPRC sont plus lents que ceux des NPR1/GCA et NPR2/GCB (133;134). Les mécanismes d'internalisation sont encore mal compris, mais une séquence présente dans le domaine C-terminal joue un rôle important. Le motif GDAY (glycine-acide aspartique-alanine-tyrosine) est un déterminant du mouvement intracellulaire des récepteurs (135). L'utilisation de NPRA mutants a montré que la glycine et la tyrosine sont essentielles à l'internalisation du récepteur tandis que l'acide aspartique est indispensable au transport du récepteur à la surface de la cellule (135).

L'ANP module l'activité et l'expression de NPR1/GCA.

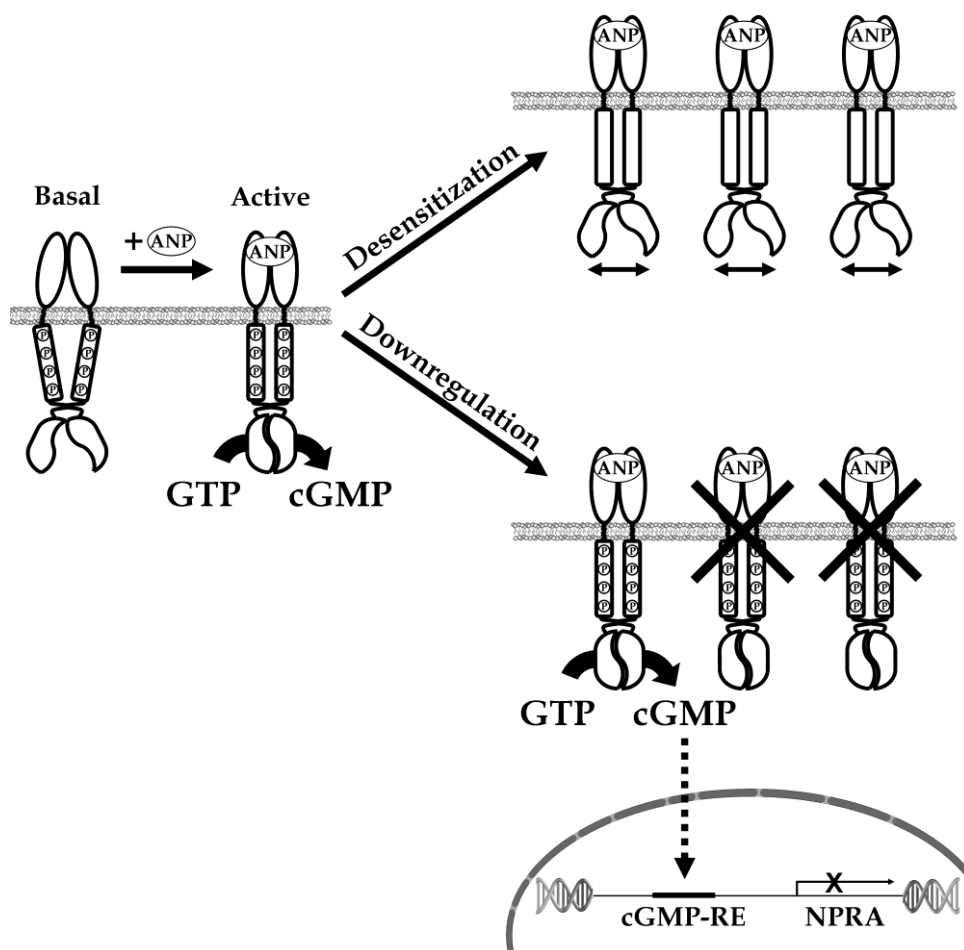


Figure 1.4 À l'état basal, les deux sous-unités catalytiques du récepteur sont inactives et séparées l'une de l'autre. Après la liaison de l'hormone, un réarrangement du récepteur permet au domaine cyclase de s'assembler et de convertir le GTP en cGMP. La modulation des récepteurs actifs peut s'effectuer par deux voies bien distinctes. Le mécanisme de désensibilisation (*desensitization*) implique une déphosphorylation rapide du domaine kinase qui empêche la conversion de GTP en cGMP sans affecter le nombre de récepteurs. La stimulation chronique par l'ANP entraîne l'inhibition transcriptionnelle (*downregulation*) du gène par des mécanismes dépendant du cGMP et du cGMP-RE présent dans le promoteur de *npr1/gca*. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *Mol. Cell Biochem.* 334, 53-65.

L'expression du troisième récepteur, NPRC, est également modulée par plusieurs agents. La stimulation de cellules musculaires lisses d'artéioles pulmonaires par les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF-1 et -2) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) provoque une réduction des taux d'ARNm de NPRC (136). Le traitement de VSMC avec la noradrénaline, la forskoline, le fluorure de sodium ou le bromo-8-cAMP est associé à une baisse des taux de protéines et d'ARNm de NPRC sans affecter les taux de NPR1/GCA et NPR2/GCB (137). La consommation de sel a aussi été associée à une diminution des transcrits d'ARNm de NPRC dans les reins, indépendamment de la stimulation de l'ANP, et ce, sans effet sur les taux de NPR1/GCA et NPR2/GCB (138). Plusieurs études confirment l'existence d'un mécanisme d'inhibition transcriptionnelle de NPRC, mais ce dernier n'est pas totalement élucidé.

Une étude récente (139) rapporte qu'une forme de NPR1/GCA ayant subi un épissage alternatif, précédemment rapportée par notre groupe (140), résulte en une délétion de 16 acides aminés situés dans le domaine extracellulaire (Lys³¹⁴ à Gln³³⁰). La protéine est exprimée de façon ubiquitaire, mais à de bas taux (<1%). Cette autre forme de NPR1/GCA est incapable de lier les NP. Ce variant peut former des dimères avec la forme normale du récepteur (*wild-type*) et interfère avec son activité. Il s'agit d'un mécanisme supplémentaire pouvant moduler la réactivité des récepteurs à l'ANP (139).

1.6.3 Signalisation post-guanylate cyclase et événements cellulaires

1.6.3.1 La relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires

La vasodilatation résultant d'une stimulation des NPR est probablement le phénomène le plus étudié dans la voie de signalisation du cGMP. Ce mécanisme touche toutes les VSCM du réseau vasculaire. L'élévation du cGMP par les NP conduit à la relaxation d'anneaux aortiques de rat préalablement contractés avec de la phényléphrine et norépinéphrine (141-143). La contraction et la relaxation des VSMC sont sous le contrôle du calcium cytoplasmique. Une variation de la concentration en calcium peut faire basculer une cellule d'un état de contraction vers celui de relaxation ou vice versa (144-146). La contraction d'une cellule est déclenchée par l'élévation du calcium cytoplasmique et sa liaison à la CaM. Le complexe Ca^{2+}/CaM provoque l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). Cette dernière entraîne la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) et l'activation de la myosine adénosine triphosphatase (*ATPase*) (145;147-149).

La relaxation des VSMC par l'ANP nécessite la PKG I. Ainsi, les souris déficientes en PKG I ne répondent plus aux NP ou aux donneurs de NO (150). La relaxation cGMP-dépendante n'est donc observée qu'à la suite de l'activation de PKG I qui agit sur la concentration calcique intracellulaire. Dans ce mécanisme, PKG-I α phosphoryle les canaux potassiques activés par le calcium (BKCa). Ceci engendre une hyperpolarisation de la membrane par l'ouverture des canaux potassiques et une fuite subséquente du potassium (151;152). Les canaux calciques voltage-dépendant (VDCC) sont alors inhibés par cette hyperpolarisation de la membrane (153). De plus, PKG I est en mesure d'inhiber directement les canaux VDCC afin de prévenir toute nouvelle entrée de calcium (154). L'activation de la pompe à calcium ATPase

du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA) est un mécanisme additionnel par lequel PKG I abaisse la concentration de calcium intracellulaire et inhibe la machinerie contractile (155;156). La kinase affecte également la relâche de calcium du réticulum sarcoplasmique en phosphorylant le récepteur de l'IP₃ (IR) et le substrat associé à l'IR (IRAG) (157;158). Les effets directs de PKG I sur la machinerie contractile proviennent de l'aptitude de PKG I à activer la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP). MLCP réduit la quantité globale de phosphates sur les MLC provoquant un relâchement de la tension (144;159;160). La totalité de ces effets engendrés par le cGMP, illustrés dans la figure 1.5, contribue à la relaxation des cellules musculaires lisses.

La relaxation des VSMC par l'ANP

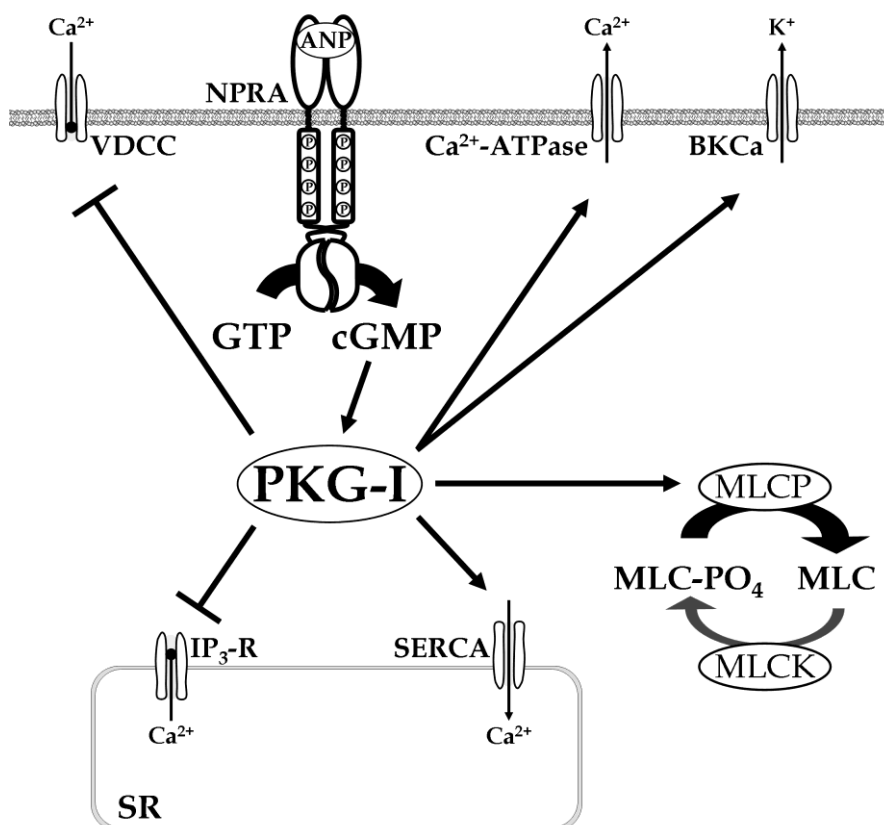


Figure 1.5 L'ANP relaxe les VSMC contractées par l'activation de PKG I. La kinase phosphoryle plusieurs cibles liées aux concentrations de calcium intracellulaire. Le calcium est séquestré dans le réticulum sarcoplasmique par la phosphorylation de la pompe calcium-ATPase (Ca²⁺-ATPase) de la membrane plasmique alors que la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) abaisse la concentration de calcium cytoplasmique. Le blocage du récepteur IP₃ et du canal calcique dépendant du voltage (VDCC) prévient la fuite du calcium vers le cytoplasme. La phosphorylation du canal potassique activé par le calcium (BKCa) entraîne une hyperpolarisation de la membrane suite au flux de potassium plus élevé. L'activation de la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) par PKG I relâche la contraction et abaisse la sensibilité au calcium. MLC—myosin light chain, MLCK—myosin light chain kinase. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *Mol. Cell Biochem.* 334, 53-65.

1.6.3.2 L'ANP, les reins et le système antagoniste rénine-angiotensine-aldostérone

En plus du cœur et des vaisseaux sanguins, le rein est aussi ciblé par l'ANP. L'augmentation de la concentration de cGMP hausse le taux de filtration glomérulaire (GFR) par des mécanismes coordonnés de vasoconstriction de l'artériole efférente et de vasodilatation de l'artériole afférente (161). Ce processus est exclusivement médié par les NPR1/GCA glomérulaires puisque le traitement avec les antagonistes HS-142 et A71915 annule l'effet de l'ANP (162-164). La réabsorption ANG-dépendante de l'eau et du sodium dans les tubules proximaux ANG-dépendante, est inhibée par une stimulation péri-tubulaire à l'ANP (165). Le cGMP supprime également le transport du sodium dans les tubes collecteurs en inhibant les canaux sodiques sensibles à l'amiloride (166). Les cellules juxtaglomérulaires sont aussi affectées puisqu'une injection intra-rénale d'ANP bloque leur sécrétion de rénine par un mécanisme PKG II-dépendant (167;168). En plus de ces effets, le RAAS est inhibé par l'ANP directement aux surrénales. Il réduit la sécrétion basale de d'aldostérone (169). De plus, l'ANP annule l'effet stimulateur de l'ANG II et de l'hormone corticotrope (ACTH) sur la production d'aldostérone (170;171). Les voies de signalisation responsables de l'inhibition de la sécrétion d'aldostérone sont encore inconnues, mais quelques hypothèses ont été proposées. La stimulation avec de l'ANP pourrait activer la PDE 2 sensible au cGMP et dégrader le cAMP, un second messager nécessaire à la synthèse de l'aldostérone (172). Alternativement, la production et/ou la phosphorylation de protéines régulatrices pourraient dérégler la voie de la stéroïdogénèse (173;174). La combinaison de ces mécanismes permet de maintenir le volume homéostatique en augmentant l'excrétion des fluides et des électrolytes.

1.6.3.3 Le cGMP et la prolifération cellulaire

Malgré le rôle controversé du cGMP dans la prolifération cellulaire, les NP sont clairement identifiés comme étant des agents anti-prolifératifs régulant la croissance vasculaire. Ces différents proviennent d'études démontrant le potentiel angiogénique des donneurs de NO dans plusieurs lignées cellulaires. Ces molécules induisent l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et mène à la formation de vaisseaux par un mécanisme dépendant du cGMP (175-178). Cependant, l'ANP est un puissant inhibiteur de la prolifération de plusieurs lignées cellulaires incluant les cellules mésangiales rénales, les VSMC, les cellules endothéliales ainsi que les fibroblastes cardiaques (179-182). Ces effets anti-prolifératifs sont médiés par NPR1/GCA dans un mécanisme dépendant du cGMP qui inhibe la kinase Ras et la voie de signalisation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) (183;184). Ici, la PKG inhibe directement Ras par phosphorylation. Le CNP est un inhibiteur de la prolifération des VSMC 10 fois plus puissant que l'ANP et peut être impliqué dans le remodelage vasculaire (185). Ce peptide est très efficace pour inhiber l'épaississement de l'intima de la carotide suite à des dommages causés par une angioplastie à ballonnet (186-188). L'action autocrine du CNP sur les fibroblastes cardiaques pourrait aussi prévenir leur prolifération et ainsi, protéger le cœur de la fibrose. Cette hypothèse a été émise suite à des études démontrant que l'augmentation du cGMP par le CNP inhibe la synthèse d'ADN et la production de collagène dans des fibroblastes cardiaques en culture (189). Les effets des NP et du NO sont bien caractérisés, mais les voies de signalisation impliquées demeurent encore inconnues.

Le NPR1/GCA pourrait également jouer un rôle dans la progression du cancer. Une étude récente a démontré que les souris déficientes en NPR1/GCA sont protégées contre l'apparition du cancer de la peau, des poumons et des ovaires, par un mécanisme complexe impliquant l'inflammation et l'autorégulation de l'expression de ce récepteur (190). De plus, l'absence de NPR1/GCA inhibe l'expression de VEGF et stimule la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb). Le gène *prb* est un suppresseur de tumeur impliqué dans le contrôle de la prolifération et la progression du cycle cellulaire. Il contrôle aussi les étapes vérifiant l'intégrité de l'ADN. La perte de la fonction de pRb annonce le développement de plusieurs types de tumeurs causées par l'emballement du cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb dans les souris déficientes en NPR1/GCA joue donc un rôle protecteur. L'inhibition de VEGF dans ces souris abaisse le potentiel angiogénique empêchant la vascularisation des tumeurs naissantes. Le mécanisme précis par lequel la perte de NPR1/GCA inhibe l'expression de VEGF reste inconnu mais pRb pourrait être impliqué (190).

1.6.3.4 Les effets pro- et anti-apoptotiques

L'apoptose, essentielle dans tout développement normal, est un processus de mort cellulaire extrêmement bien organisé. La signalisation post-GC est impliquée dans la régulation d'une multitude de gènes associés à l'apoptose pouvant avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques. L'augmentation du cGMP peut induire l'apoptose des VSMC, des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (191-194). Ces effets pro-apoptotiques causés par le cGMP sont médiés par la PKG I (190;192). Cette kinase

peut aussi induire indirectement l'apoptose par l'activation de la kinase c-Jun N-terminale 1 (JNK 1) et la phosphorylation/dégradation de la β -caténine qui contrôle normalement plusieurs gènes anti-apoptotiques (195-197). L'augmentation du cGMP causée par l'ANP inhibe l'expression du gène *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1), un agent anti-apoptotique homologue au gène *B-cell cll/lymphoma 2* (Bcl2), et favorise l'apoptose des cardiomyocytes (194). Dans certaines lignées cellulaires, le cGMP peut également avoir des effets anti-apoptotiques. Dans les neurones cérébelleux, les effets protecteurs du cGMP sont associés à une augmentation de la phosphorylation du *cAMP response element-binding protein* (CREB) ainsi qu'à une expression plus élevée du gène *bcl-2* (198). L'inhibition transcriptionnelle de la protéine pro-apoptotique liant Bcl-2 de type 3 (BNIP3) par le cGMP contrecarre l'apoptose des hépatocytes (199). Le cGMP joue potentiellement les deux rôles, soit pro- ou anti-apoptotiques, selon le type cellulaire ciblé.

1.6.3.5 Fonction et métabolisme dans les adipocytes

La recherche sur la signalisation post-GC et ses conséquences sur le métabolisme des lipides a connu un essor considérable ces dernières années dû à l'augmentation chronique de l'obésité. Cet intérêt soudain est surtout lié au fait que la lipolyse médiée par l'ANP est strictement un phénomène exclusif aux primates. Les rongeurs, des modèles par ailleurs largement étudiés, sont inutilisables pour ces études de métabolisme puisque leur faible ratio adipocytaire NPR1/NPRC favorise plutôt la clairance des NP (200). La lipolyse peut être induite par l'ANP et le BNP, mais non par le CNP, et est dépendante de la voie de signalisation du cGMP puisque les effets peuvent être simulés par des analogues du cGMP (201). L'activation de PKG I par le

cGMP induit la phosphorylation de la périlipine et de la lipase hormono-sensible (HSL), deux événements initiateurs de la cascade lipolytique (201). En plus de la lipolyse dépendante du cGMP, les catécholamines peuvent induire la lipolyse par l'augmentation du cAMP et l'activation de la PKA (202). Les effets de ces deux voies de signalisation, celles du cAMP et du cGMP, convergent vers la stimulation de la lipolyse. Cependant, l'activation par l'insuline de la PDE 3B, une PDE hydrolysant le cAMP, inhibe les mécanismes lipolytiques déclenchés par l'adrénorécepteur- β (203). Le chevauchement des voies de signalisation de l'insuline et des NP est absent dans les adipocytes humains puisque l'activité de la PDE 5A n'est pas régulée par l'insuline (203). En plus de favoriser la lipolyse, l'ANP peut aussi inhiber la croissance des adipocytes viscéraux par un mécanisme cGMP-dépendant (204). Par contre, la lipolyse induite par les NP peut être neutralisée par l'action du RAAS. Les adipocytes possèdent la machinerie requise pour transmettre les signaux de l'ANG II et déclencher la lipogénèse et la différenciation des pré-adipocytes (205;206). La stimulation des AT₂-R adipocytaires par l'ANG II provoque une hausse de l'expression de la synthase des acides gras (FAS) (206). FAS est l'enzyme initiatrice de la voie lipogénique qui convertit le malonyl-CoenzymeA en acide stéarique-CoenzymeA. La suite des réactions menant aux triacylglycérides est prise en charge par une multitude d'enzymes de la membrane du réticulum endoplasmique (207). La capacité de l'ANG II à inhiber la lipolyse NP-dépendante résulte de l'activation de la PLC et implique deux processus distincts. Le phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) est scindé en DAG et IP₃ par la PLC (208). Le DAG active la PKC menant à la désensibilisation hétérologue de NPR1/GCA, alors que le IP₃ augmente le calcium cytoplasmique (131;209). Cette élévation conduit à l'activation directe de la PDE 3B

entraînant l'hydrolyse du cGMP en GMP, affectant l'activation initiale de la PKG par les NP (209). Il a aussi été démontré chez la souris que l'ANG II inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur *npr1/gca* (210). Les effets opposés des voies de signalisation de l'ANG II et de l'ANP pourraient jouer un rôle important dans le développement du tissu adipeux viscéral (204). Ces voies sont résumées brièvement dans la figure 1.6. L'ANP a aussi été identifié comme un régulateur potentiel de l'accumulation de tissu adipeux et de l'augmentation de la pression sanguine dans un modèle de souris post-ménopausées, lesquelles possédaient des taux réduits d'ANP (211). Un traitement à l'estradiol améliore les concentrations d'ANP chez ces souris en réduisant l'expression de NPRC et en augmentant la synthèse d'ANP. Ceci suggère un chevauchement probable des voies de signalisation des estrogènes et des NP dans les tissus adipeux (211).

**Effets antagonistes de la stimulation par l'ANP et l'angiotensine II
(ANG II) dans les adipocytes humains**

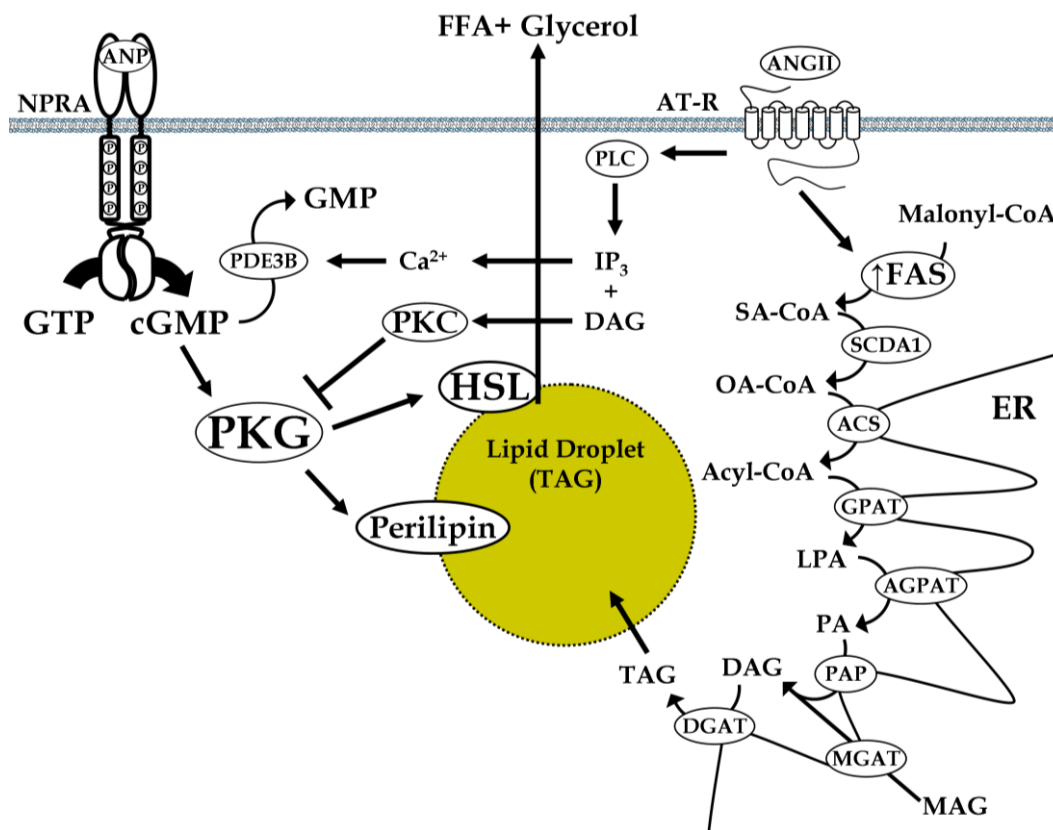


Figure 1.6 La stimulation du récepteur NPR1/GCA déclenche la lipolyse initiée par la production de cGMP et l'activation de la PKG. Les phosphorylations subséquentes par la PKG de la lipase hormono-sensible (HSL) et de la périlipine provoquent l'hydrolyse des triglycérides (TAG) en acides gras libres (FFA) et en glycérol. Cependant, cette voie peut être inhibée par la stimulation à l'ANG II. Une élévation de calcium et une activation de la phosphodiesterase 3B (PDE-3B) calcium-dépendante induisent alors l'hydrolyse de cGMP en GMP. L'effet antagoniste de l'ANG II provient aussi de sa capacité à produire des TAG. La stimulation par l'ANG II active l'enzyme initiant la lipogenèse, la synthèse d'acide gras (FAS). Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *Mol. Cell Biochem.* 334, 53-65.

1.6.4 Rôle du système des NP dans l'hypertension et le syndrome métabolique : la génétique expérimentale et les troubles de signalisation cellulaire

1.6.4.1 Le rôle dans la progression du syndrome métabolique

L'obésité associée à l'hypertension est le principal facteur de risque dans le développement de maladies cardiovasculaires. Le système des NP participe au maintien de l'équilibre entre un poids santé et un surpoids malsain. Ce fragile équilibre peut être perturbé par les éléments pouvant moduler le taux des NP ou de leurs récepteurs. L'effet anti-obésité du système des NP s'explique par plusieurs études métaboliques qui convergent vers la lipolyse des triglycérides et leur β -oxydation. Il a été mentionné précédemment que l'ANP stimule la mobilisation des lipides sous l'action de la HSL, mais cette lipolyse est également accentuée lors de la pratique d'exercices d'endurance (212). Durant un entraînement intense, l'augmentation des acides gras non-estérifiés (NEFA) par la HSL a pour effet de nourrir les muscles qui ne peuvent plus compter sur leurs réserves de glucose pour soutenir un effort à long terme. Des études récentes ont montré un lien évident entre le système ANP-NPR1/GCA et l'état post-prandial. Ils sont associés à une baisse de la pression sanguine, une élévation du glycérol et des NEFA veineux, une augmentation du taux d'oxydation des lipides ainsi qu'à une augmentation du flux sanguin dans le tissu adipeux (213;214). De plus, le cGMP a été identifié comme un facteur déclencheur de la biogenèse des mitochondries par l'induction du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*) (215). Ces effets coordonnés favorisent le catabolisme du tissu adipeux en augmentant la relâche de NEFA et en améliorant la capacité de β -

oxydation. Une multiplication des mitochondries fournit alors de nouvelles sources d'énergie aux muscles squelettiques et cardiaque. Ce scénario optimal est modifié chez les personnes obèses. En effet, les individus obèses ont des taux d'ANP plus bas que les personnes qui ont un poids santé. De plus, les patients souffrant de MetS ont généralement des taux d'ANP et de BNP inférieurs à la normale (216-218). Ces données peuvent être le résultat d'une baisse de sécrétion des NP cardiaques puisque les concentrations des fragments N-terminaux circulants du pro-ANP et du pro-BNP (qui ne peuvent pas lier les NPR) sont également inférieures chez ces patients (216). L'obésité affecte aussi le nombre de récepteurs des adipocytes bouleversant par conséquent le ratio NPR1/NPRC. Chez les patients obèses et hypertendus, ce rapport NPR1/NPRC est réduit dans le tissu adipeux sous-cutané suggérant un mécanisme anormal de clairance et une diminution de l'efficacité des NP à activer NPR1/GCA (219). Les effets combinés d'une baisse de sécrétion des NP et d'une augmentation de leur clairance peuvent avoir un impact significatif sur l'accumulation des lipides, surtout lors d'un apport calorique excessif. Cependant, cette condition est réversible par un simple jeûne qui se traduit par l'inhibition de l'expression de NPRC dans les tissus adipeux (220). Une infusion d'ANP chez des patients hypertendus et obèses soumis à une diète hypocalorique entraîne des effets plus importants en terme de diminution de la pression sanguine, d'élévation de la natriurèse, d'augmentation de la diurèse et du cGMP urinaire en comparaison avec un traitement identique avant la diète faible en calories. Cette étude démontre qu'une restriction calorique améliore l'activation de NPR1/GCA par l'ANP (221). La résistance à l'insuline dans le MetS est également liée aux concentrations de NP. En effet, une relation inverse entre les NP et les taux plasmatiques d'insuline et de glucose a été observée chez des

participants de l'étude Farmingham. Les taux inférieurs de NP circulant seraient une autre manifestation associée au MetS (222). De plus, l'ANP peut inhiber la sécrétion de glucagon des îlots pancréatiques (223). Dans des conditions où les taux d'ANP sont bas, ces mécanismes s'additionnent pour perturber la glycémie et favoriser la résistance à l'insuline, contribuant au développement du diabète de type 2.

1.6.5 Rôle du système des NP dans la régulation de la pression sanguine et son potentiel diagnostique et thérapeutique dans l'hypertension

L'hypertension, associée ou non au MetS, est une pathologie très complexe dont une partie est sous le contrôle du système des NP. La contribution des NP et de leurs récepteurs a été étudiée dans différents modèles de souris et de rats. Les effets des NP sur la régulation du volume sanguin, de la diurèse et de la natriurèse ainsi que de la relaxation vasculaire déterminent la pression artérielle globale. De plus, Chez des souris transgéniques, une augmentation de 8 fois la concentration d'ANP plasmatique induit une baisse de la pression sanguine de 30 mmHg sans affecter le volume urinaire et l'excrétion de sels (224). Inversement, des souris homozygotes déficientes (*knockout*) pour le gène de l'*anp* ont une augmentation de la TA de 8 à 23 mmHg lorsque soumises à une diète contenant 0.5% ou 2% de sel (NaCl) (225). Dans cette étude, la souche hétérozygote possède une TA normale sous diète standard, mais leur TA augmente drastiquement de 27 mmHg lorsque les souris sont soumises à une diète riche en sel (8% NaCl). Ces résultats indiquent qu'une réduction d'ANP peut mener à l'hypertension sensible au sel (225). Les souris homozygotes *knockout* pour le gène de l'*anp* présentent également une hypertrophie ventriculaire bilatérale accompagnée

d'une augmentation de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire et des métalloprotéases (226). La natriurèse est également perturbée chez ces souris puisqu'elles ne peuvent excréter adéquatement le sodium administré par l'infusion de solutions salines, et ce, même si la filtration glomérulaire est similaire au groupe contrôle (227). La réabsorption élevée de NaCl dans les tubules collecteurs suggère que l'ANP est essentiel pour maintenir le volume intravasculaire (227). Il existe aussi une corrélation inversement proportionnelle entre le nombre de copies du gène *npr1/gca* et la TA des souris transgéniques (228). La délétion homozygote de *npr1/gca* entraîne une hypertension sensible au sel, une augmentation de la mortalité ainsi qu'une hypertrophie cardiaque causée par l'hyperactivité de l'échangeur Na^+/H^+ de type 1 (NHE-1) (229-231). La délétion cardiaque de *npr1/gca* déclenche une hypertrophie modérée, une augmentation de la sécrétion d'ANP et une réduction de la TA, des phénomènes possiblement causés par l'action systémique de l'ANP (232). La délétion de *npr1/gca* dans les cellules musculaires lisses n'a eu aucun impact sur la TA en condition normale. Suite à l'infusion d'ANP, des souris homozygotes *knockout* pour le gène *npr1/gca* perdent leur capacité de vasodilatation et l'augmentation brusque du volume intravasculaire provoque une hausse rapide de la TA (233). La délétion de *npr1/gca* dans les cellules endothéliales vasculaires a entraîné une hypertension marquée, une hypertrophie cardiaque et un arrêt de l'extravasation des fluides ANP-dépendant vers l'espace interstitiel (234). Par contre, la surexpression générale de *npr1/gca* abaisse la TA et protège contre l'hypertension sensible au sel alors qu'une surexpression cardiaque de *npr1/gca* réduit la taille des cardiomyocytes et l'expression d'*anp* (228;235). Les souris transgéniques surexprimant le *bnp* ont une élévation significative du cGMP plasmatique accompagnée d'une baisse de la TA, en

comparaison avec la souche non-transgénique (236). Les taux élevés de BNP circulant ont aussi causé des anomalies squelettiques dues à la rétroaction (*turnover*) élevée de l'ossification endochondrale et à l'augmentation de l'épaisseur du primordium cartilagineux (237). La délétion du gène du *bnp* n'induit pas d'hypertension ni d'hypertrophie ventriculaire, mais se traduit par des lésions fibrotiques des ventricules qui s'étendent et se multiplient en réponse à une surcharge ventriculaire (238). L'absence du gène du *cnp* conduit au nanisme alors que sa surexpression chez ces souris *knockout* rétablit le phénotype normal sans affecter la TA (239;240). La délétion du gène *npr2/gcb* chez la souris ne provoque pas d'hypertension, mais engendre une dysfonction de l'ossification endochondrale et une diminution de la croissance longitudinale des membres et des vertèbres (241). La surexpression d'un dominant négatif de NPR2/GCB chez le rat entraîne une hypertrophie cardiaque qui n'est pas reliée à la TA, ainsi qu'une augmentation du pouls. NPR2/GCB est ainsi impliqué dans la croissance du muscle cardiaque (242). La suppression de NPRC produit plusieurs effets dont une diminution de la TA, une augmentation légère de la diurèse, une réduction du volume sanguin et une augmentation de la croissance osseuse. Ces phénotypes sont associés à une clairance réduite des NP (243).

Une association directe est observée entre l'hypertension et le locus contenant *npr1/gca*. Des études sur des rats congéniques, produits par le croisement de souches hypertendues et normotendues, ont confirmé l'existence d'un locus de traits quantitatifs (QTL) sur le locus de *npr1/gca* (244). Notre groupe a effectué un balayage complet du génome humain en utilisant comme marqueurs les

microsatellites et les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP). Les familles ciblées comprenaient des individus souffrant d'hypertension et de dyslipidémie. L'analyse a révélé des QTL liés à la TA et des caractéristiques reliées à l'hypertension. Plus spécifiquement, un QTL possédant une valeur de probabilité logarithmique (*LOD score*) ≥ 1.9 a été localisé à la position des gènes de l'*anp* et du *bnp* (1p36) pour l'hypertension de même que pour l'hypertension associée à l'obésité (245). Le *LOD score* représente la probabilité que le phénotype observé soit directement lié au génotype identifié, tel que défini par Newton E. Morton (246). Une valeur supérieure ou égale à 1.9 confirme l'association entre le phénotype et le génotype. Ainsi, les variations génomiques de la région chromosomique 1p36 sont associées à l'hypertension dans la population étudiée (245). Les individus obèses normotendus de cette cohorte ne partagent pas les variations retrouvées chez les deux autres groupes. La région 1p36 n'est pas associée à l'obésité seule. La figure 1.7 montre la relation entre le phénotype et le génotype du chromosome 1 humain.

Les associations génétiques du chromosome 1 humain

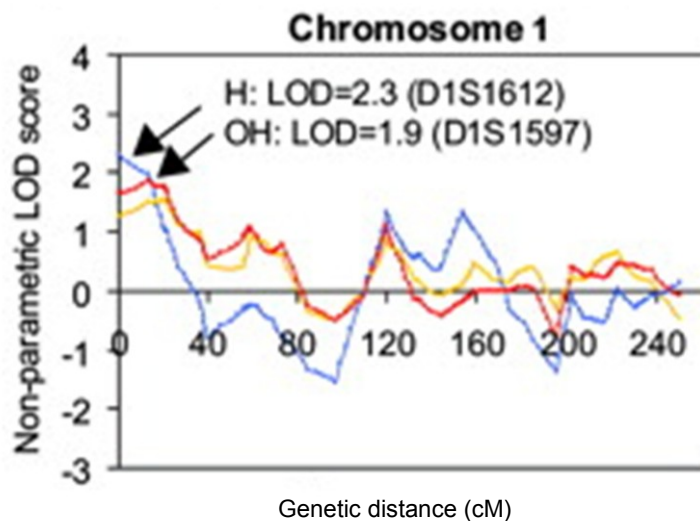


Figure 1.7 L'analyse des polymorphismes des microsatellites ont montré que la région 1p36 (0 à 20 cM) du chromosome 1 de l'humain est liée à l'hypertension (H, en bleu) et à l'hypertension associée à l'obésité (OH, en rouge). Cette même région n'est pas liée à l'obésité seule (jaune). Figure tirée de Pausova *et al.* (2005) *Hypertension*. 46, 1280-1285

Une région du chromosome 1q a aussi été positivement associée à plusieurs phénotypes métaboliques dont l'index de masse corporelle (BMI), le pourcentage de gras corporel, le taux d'insuline et la TA (247). Au total, 13 phénotypes possédant des valeurs LOD de 2.1 à 3.9 ont été identifiés dans l'intervalle 170-233 centiMorgan (cM) du chromosome 1, une région renfermant plusieurs gènes candidats dont *npr1/gca* (247). Une étude récente a aussi démontré une relation évidente entre trois SNP et les taux circulants des NP. La présence des allèles mineurs des SNP rs5068, rs198358 et rs632793 au locus des gènes de l'*anp* et du *bnp* est directement liée à une augmentation du taux de ces NP chez les patients hypertendus et normotendus (248).

De plus, les allèles mineurs des SNP rs5098 et rs190358 ont aussi été associés à une légère baisse des pressions systolique et diastolique, ainsi qu'à une réduction du risque de développer de l'hypertension (248). Ces études génétiques chez l'humain montrent que des variations dans les gènes des NP influencent leurs taux circulants et que les gènes *anp/bnp* et *npr1/gca* sont des candidats pouvant être impliqués dans les troubles d'obésité et d'hypertension. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'élucider les interactions complexes entre ces gènes du chromosome 1.

Les NP sont utilisés comme marqueurs diagnostiques et agents thérapeutiques de plusieurs conditions physiopathologiques. Ainsi, l'élévation des concentrations circulantes d'ANP et de BNP est fortement associée à l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et l'insuffisance rénale chronique (249-251). L'élévation du BNP plasmatique est un marqueur de la dysfonction ventriculaire gauche et prédit la mortalité subséquente à un accident vasculaire cérébral (AVC) ainsi que le pronostic dans les cas d'insuffisance cardiaque (250;252-254). Comme mentionné précédemment, un faible taux de NP est souvent associé à l'hypertension et au MetS. Plusieurs études ont été menées afin de rétablir cliniquement les concentrations de NP et leurs réponses physiologiques. L'injection d'ANP chez des patients hypertendus diminue la TA tout en favorisant la natriurèse et la diurèse (255;256). Chez le singe hypertendu, l'infusion d'ANP provoque aussi une baisse soutenue de la TA (257). Malgré ces résultats prometteurs, un traitement de longue durée est peu envisageable puisque l'administration d'ANP en continue comporte des difficultés techniques complexes. Des thérapies géniques ont aussi été testées afin de contrôler l'hypertension de façon persistante. Des injections intraveineuses d'une construction

ADN d'ANP humain produit une baisse constante de la TA de 21 mmHg chez des jeunes rats SHR sans effets secondaires apparents (258). Cependant, les thérapies géniques sont encore controversées et l'approche pharmacologique semble la plus appropriée dans le cas des contrôles hormonaux. Ainsi, l'infusion d'Anaritide, une version synthétique de l'ANP, provoque une baisse de la TA combinée aux augmentations de la diurèse et de la natriurèse chez des patients hypertendus ou souffrant d'insuffisance cardiaque (259-262). L'administration d'un BNP recombinant (le Nesiritide) induit une vasorelaxation, abaisse le taux d'aldostérone et favorise l'excrétion de sel et d'eau chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque (263-265). Le Nesiritide est efficace et relativement bien toléré lorsqu'il est administré conjointement aux β -bloquants dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (266). Selon les auteurs, la combinaison des deux thérapies est un moyen convenable pour lutter contre cette maladie. Cependant, deux études méta-analytiques récentes ont montré que le traitement avec Nesiritide augmente la mortalité et les risques de dysfonctions rénales (267;268). Une méthode alternative consiste à contrôler la dégradation des NP par les endopeptidases neutres (NEP), une ectoenzyme non-circulante présente à la surface des cellules épithéliales des tubules proximaux du rein, des cellules endothéliales vasculaires et pulmonaires ainsi que des VSMC. Le blocage des NEP provoque une augmentation des NP circulants tout en stimulant leur effet hypotenseur, surtout lorsque combiné à un inhibiteur de l'ACE (269-271). Par contre, l'Omapatrilat, un inhibiteur combiné des NEP et de l'ACE, est associé à une augmentation du risque d'œdème généralisé, particulièrement chez les individus de race noire (271). Des études complémentaires sont requises afin

d'évaluer l'efficacité et la sécurité des traitements impliquant des modifications du système des NP.

1.7 Facteurs de transcription, éléments cis-régulateurs et nucléotides cycliques

La modulation de gènes spécifiques est sous le contrôle des facteurs de transcription qui agissent dans les voies de signalisation. Certains facteurs de transcription sont appelés « généraux » car ils ne lient pas l'ADN, mais sont indispensables à la synthèse d'ARNm tel que les facteurs IIB, IIE et IIF. D'autres facteurs de transcription lient l'ADN ont une fonction très spécifique en ciblant une région promotrice d'un gène bien précis (272). Ces facteurs, classés selon leur structure, exercent un contrôle sur l'expression du gène et modulent les taux de protéines. Différentes classes de facteurs de transcription, leur élément de reconnaissance et leur mode de liaison sont indiqués dans le tableau I.

Les différences entre certains facteurs de transcription spécifiques

Facteur de transcription	Structure	Élément de reconnaissance cis (5'-3')	Arrangement du complexe
SP1	doigt de zinc	GGGCGG	monomère
AP-1	glissière à leucine	TGA(G/C)TCA	dimère
C/EBP	glissière à leucine	ATTGCGCAAT	dimère
CREB	glissière à leucine	TGACGTCA	dimère
c-Myc	hélice-boucle-hélice	CACGTG	dimère
Oct-1	hélice-tour-hélice	ATGCAAAT	monomère

Tableau I. Les différents facteurs de transcription spécifiques en fonction de leurs structures, les éléments ciblés dans le génome et l'arrangement des complexes protéiques. Tableau tiré et adapté de Purves *et al.* (2008) *Neuroscience* 4, 170-176

L'activation des facteurs de transcription dépend des différents signaux extra- ou intracellulaires tels que les seconds messagers nucléotidiques. Parmi ceux très étudiés, le cAMP agit en activant la PKA qui phosphoryle CREB. CREB est un facteur de transcription liant l'élément de réponse au cAMP (cAMP-RE) et est notamment impliqué dans la plasticité neuronale et la mémoire à long terme (273;274). Les deux autres nucléotides cycliques agissant à titre de second messager sont le cGMP et le cCMP. Le cGMP active la PKG et induit la phosphorylation de protéines contrôlant la transcription. Ces phosphorylations permettent à la PKG de moduler l'expression génique. La régulation induite par le cGMP et PKG implique directement plusieurs facteurs de transcription dont les facteurs TFII, ATF-1 et -2, c-Jun et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B), et indirectement la voie des MAPK (275-280). En plus du cGMP, le cCMP peut également activer la PKG et entraîner les

mêmes effets que le cGMP (281). Cependant, les rôles du cCMP et de l'enzyme responsable de la conversion du CTP en cCMP sont très peu étudiés et font l'objet de controverses (282;283). Bien que la voie de signalisation du cGMP soit largement étudiée, nous en ignorons encore plusieurs acteurs moléculaires majeurs.

1.8 Objectifs du travail

L'importance physiologique du système des NP, plus précisément la voie ANP-NPR1/GCA, est telle que son dérèglement peut mener à des pathologies importantes comme l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et le développement du MetS. Des modèles murins ont démontré que la perte de cette voie hormonale peut causer des troubles graves et que les effets sont directement liés aux taux de cGMP intracellulaire. Les récentes recherches menées par notre groupe ont permis d'identifier la boucle de rétro-inhibition de la voie ANP-NPR1/GCA-cGMP dans le contrôle transcriptionnel du récepteur NPR1/GCA. Le cœur de cette boucle se trouve au niveau d'un élément de réponse présent dans le promoteur du gène *npr1/gca*. La perte de cet élément-*cis*, le cGMP-RE, rend le promoteur insensible aux variations de cGMP causant l'arrêt de l'inhibition transcriptionnelle ANP- et cGMP-dépendant. La recherche des facteurs-*trans* agissant sur cet élément est essentielle afin de comprendre le mécanisme contrôlant l'expression du récepteur. Notre hypothèse de recherche est que la boucle de rétro-inhibition est contrôlée par un facteur de répression répondant à la stimulation par l'ANP et agissant directement sur le cGMP-RE. Notre objectif pour ce projet est donc d'identifier et de caractériser la (ou les) protéine(s) qui lie(nt) le cGMP-RE humain.

Chapitre 2

**Clonage d'une protéine liant
l'élément de réponse au cGMP présent
dans le promoteur de *npr1/gca***

2.1 Introduction au chapitre

Ce chapitre détaille les étapes menant à la découverte de la protéine GREBP (*cGMP-response element binding protein*) et qui lie le cGMP-RE présent dans le promoteur de *npr1/gca*. Les techniques ont été minutieusement sélectionnées afin d'atteindre efficacement les objectifs de recherche fixés. En effet, parmi les méthodes permettant d'identifier une interaction protéine-ADN, seule la technique du simple hybride chez la levure permet d'identifier rapidement de nouvelles protéines liant l'ADN. Cependant, certaines techniques s'avèrent plus efficaces pour identifier des protéines modifiées post-traductionnellement afin de lier l'ADN. L'une de ces techniques consiste à coupler une séquence d'ADN à des billes et de les incuber en présence d'extraits cellulaires pour capter les protéines liant l'élément *cis*. Les complexes sont ensuite isolés par centrifugation ou magnétisme selon le type de billes utilisées. Les protéines ainsi obtenues sont analysées par immuno-buvardage, électrophorèse bidimensionnelle ou par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse permet aussi d'identifier de nouvelles protéines. Nous n'avons pas eu recours à ces techniques complexes puisque le criblage par simple hybride chez la levure a généré des résultats plus que satisfaisants. Nous rapportons ici l'existence d'un nouveau gène demeuré inconnu jusqu'à ce jour.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Criblage par simple hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de rein humain

Une banque d'ADN complémentaires (ADNc) de rein humain insérée dans le plasmide pACT2, et déjà transformée dans la souche de bactérie BNN132, provient de la compagnie Clontech (Mountain View, Californie, USA). La banque a été titrée et amplifiée dans 30 pétris de 150 mm d'agar LB (Lennox Base) contenant 50 µg/mL d'ampicilline afin de générer suffisamment de plasmides pour le criblage. L'isolation des plasmides a été faite avec la trousse d'extraction d'ADN plasmidique Gigaprep de Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada). Le criblage par simple hybride chez la levure a été réalisé à l'aide du Matchmaker One-hybrid System de Clontech. La séquence humaine du cGMP-RE (5'-AGGAAATGTACTTCAACATTCTGC-3') a été utilisée comme appât. Cette séquence a été synthétisée en trois copies et clonée en amont du promoteur PCYC1 aux sites EcoRI/MluI du plasmide pHisi et aux sites EcoRI/SalI du plasmide pLACZi (Figure 2.1). Ces nouvelles constructions, pHISi-hcGMP-RE et pLACZi-hcGMP-RE, ont par la suite été introduites dans la souche de levure YM4271 par recombinaison homologe. Les colonies ayant intégré les deux plasmides ont été sélectionnées pour leurs capacités à croître sur un milieu synthétique dépourvu d'histidine et d'uracile. La nouvelle souche de levure, YM4271pHISipLACZi-hcGMP-RE a été subséquemment transformée avec les plasmides pACT2 contenant l'ADNc afin de produire le clone fusionné au domaine d'activation GAL4 (GAL4AD). Les colonies positives poussant sur un milieu dépourvu d'histidine, d'uracile et de leucine, et auquel on a ajouté 55 mM de 3-amiotriazole, ont été testées pour leur expression de β-galactosidase par l'essai d'étalement d'agarose sur plaque (*agarose overlay*) (284). Les colonies bleues ont été récoltées et transférées dans un milieu de croissance liquide dépourvu d'histidine, d'uracile et de leucine et incubées afin d'obtenir une culture de levure de

concentration élevée de densité optique d'environ 2. Les cultures liquides sont alors de nouveau pour leur expression du rapporteur β -galactosidase avec l'orthonitrophenyl- β -galactoside (ONPG), un essai beaucoup plus sensible et quantitatif que le test d'agarose. Ce test, décrit par le fabricant, a l'avantage de pouvoir faire un classement précis des clones positifs selon leur intensité d'expression du gène *β -galactosidase*. Ce tri a permis de détecter les plus fortes interactions entre le promoteur synthétique du rapporteur, l'appât, et les protéines de fusion produites par les plasmides pACT2-ADNc. Ces plasmides ont ensuite été extraits des levures puis transformés dans des bactéries compétentes DH5 α selon les procédures habituelles. Les plasmides pACT2 ont été extraits des bactéries à l'aide de la trousse d'extraction d'ADN plasmidique Qiagen Maxiprep et séquencés avec les amorces sens 5'-TACCCATACGATGTTCCAGA-3' et antisens 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3'.

2.2.2 Extension d'amorce et détermination de la taille de l'ARNm

L'extension d'amorce (*primer extension*) a été réalisée sur de l'ARN de cellules rénales HEK293 (*human embryonic kidney*). 5 μ g d'ARN total ont été rétro-transcrits avec l'enzyme *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV-RT, Invitrogen) en utilisant 45 fmoles d'une amorce antisens (5'-GGAGAGATTTGGTATATG-3') radioactive spécifique à la région du gène de *grebp*. La taille de l'extension a été comparée au séquençage du plasmide original pACT2 contenant le clone *grebp* afin de calculer le nombre total de nucléotides de l'ARNm de GREBP. Le plasmide pACT2 a été séquencé avec la trousse Thermo sequenase (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ USA) en utilisant la même

amorce antisens radioactive. La longueur totale de l'ARNm de GREBP a été confirmée par PCR en utilisant l'amorce antisens 5'-GGTAGGAGTAGCGTGGTAAG-3' et deux amorces sens correspondant aux positions théoriques -5/-25 (5'-GGTTATATCCTTCCCGTACT-3') et +1/+25 (5'-ATCCCCTGGCCCAACCCGTC-3') de l'ADNc rétro-transcrit de *grebp*.

2.3 Résultats

2.3.1 Criblage d'une banque d'ADNc de rein humain

La figure 2.1 schématise la méthode de criblage effectuée par la technique du simple hybride chez la levure. 60 clones ont crû sur un milieu agar minimal contenant 55 mM de 3-amino-1,2,4-triazole et ont été testés pour leur expression de β -galactosidase. Un seul de ces clones était réellement positif et avait une expression élevée du gène rapporteur. Son pointage β -gal de 8.19 ± 1.6 unités était de loin supérieur à la moyenne de 0.60 unité des autres clones.

La technique du simple hybride chez la levure

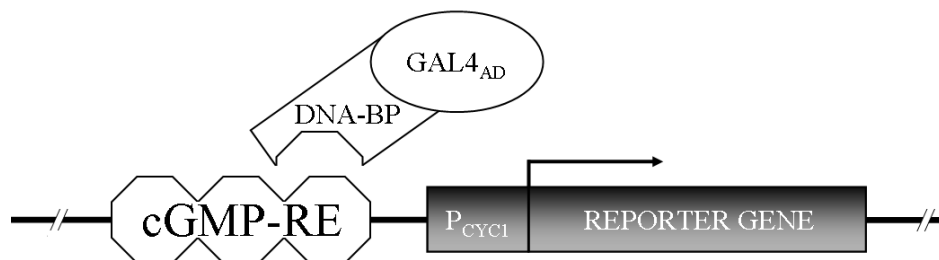


Figure 2.1 Le criblage d'une banque d'ADNc de rein humain s'est effectué avec le système de simple hybride chez la levure en utilisant 3 copies sérielles du cGMP-RE comme appât. La protéine de fusion produite par l'ADNc se lie de façon plus ou moins intense au promoteur contenant le cGMP-RE et active la transcription du gène rapporteur. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

2.3.2 Le gène, l'ARNm et la protéine

Le plasmide du clone positif a été extrait et la composition de l'insert a été définie par le service de séquençage du centre de recherche du CHUM. Le séquençage a révélé un ADNc de 1060-bp contenant une queue polyadénylée de 48-bp, confirmant ainsi qu'il s'agissait effectivement d'un gène exprimé. En utilisant le programme BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) fourni par le NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), nous avons situé ce nouveau transcrit sur le chromosome 1 à la position 1p36.33 dans le contig NT_004350.18 près du gène de l'*anp* (1p36.21). Comme cet ADNc ne semblait appartenir à aucune famille de gènes connus et que cette région chromosomique ne contenait aucun gène déjà répertorié,

nous avons conclu à la découverte d'un nouveau gène que nous avons nommé *grebp* en relation avec sa fonction, soit la *cGMP Response Element Binding Protein*.

Nous avons réalisé un essai d'extension d'amorce afin de s'assurer de compléter la séquence nucléotidique de l'ADNc contenu dans le plasmide pACT2-GREBP qui était possiblement partielle dans la banque commerciale. Cette expérience a permis d'ajouter 23-bp à notre séquence originale (figure 2.2 A). Le contenu entier de la séquence du transcrit de GREBP a été confirmé par PCR en utilisant une seule amorce antisens et deux amorces sens, dont l'une est située en amont du site d'initiation de la transcription (-5/-25) et l'autre, ciblant précisément le site d'initiation (+1/+25). Aucun transcrit n'a été détecté dans la réaction -5/-25 utilisant de l'ARNm de cellules HEK293 rétro-transcrit, même si cette région a été amplifiée en utilisant de l'ADN de cellules HEK293 comme contrôle positif d'amplification (figure 2.2 B). La région +1/+25 a été efficacement amplifiée, aussi bien dans la réaction ayant comme cible l'ADN que dans celle contenant l'ADNc (figure 2.2 B). Ces résultats confirment que la taille totale de l'ARNm de GREBP, incluant la queue de poly(A) est de 1083-bp et que le gène est transcrit en un seul exon.

Détermination de la taille du transcrit de GREBP

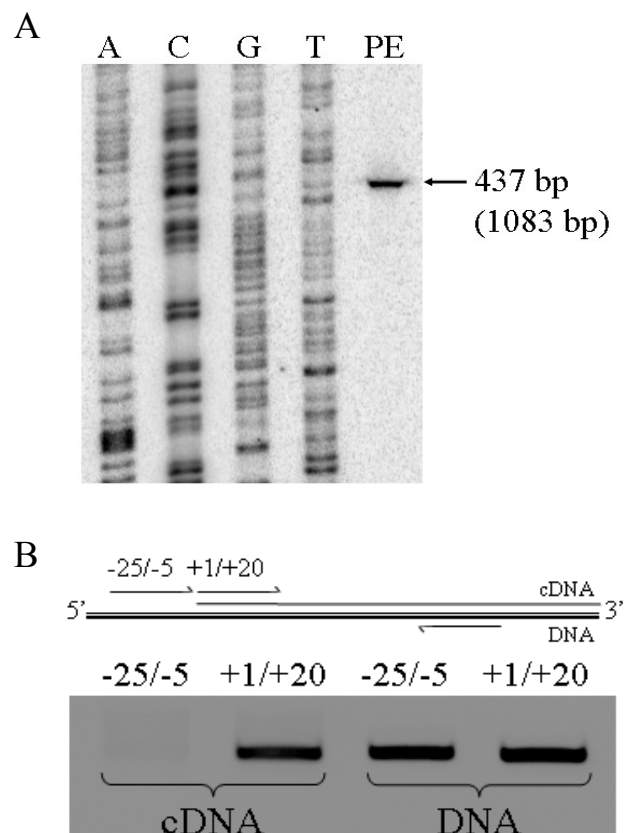


Figure 2.2 A) La détermination de la taille totale de l'ARNm de GREBP a été réalisée par extension d'amorce. L'ARN total de cellules HEK293 a été rétro-transcrit en utilisant une amorce radioactive située dans une région connue de l'ARNm de GREBP puis analysé par électrophorèse parallèlement à une réaction de séquençage complétée à partir de la même amorce radioactive et du plasmide pACT2-GREBP. B) La taille totale du transcrit de GREBP a été confirmée par RT-PCR en utilisant des amorces sens ciblant l'amont (-25/-5) ou l'aval (+1/+20) du site potentiel d'initiation de la transcription et de l'ARN de cellules HEK293. De l'ADN de ces mêmes cellules a été utilisé comme contrôle positif d'amplification par PCR. Bien que l'amorce -25/-5 hybride et initialise l'amplification de l'ADN, elle y échoue avec de l'ADNc produit. Figures tirées de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

L'analyse de la séquence de *grebp* nous indique que le gène possède un cadre de lecture de 348-bp codant pour une protéine de 115 acides aminés, d'une masse de 13.2 kiloDaltons (kDa) et d'un point isoélectrique de 11.3. La région non traduite 3' (3'UTR) contient 2 éléments riche en AU (AREs) connus pour être impliqués dans la dégradation rapide des ARNm (figure 2.3, séquences soulignées) (285). La traduction virtuelle de GREBP et l'analyse de son contenu en acides aminés par les programmes d'ExpPASy ont révélé une haute proportion de résidus basiques (23/115), caractéristique des protéines liant l'ADN (Figure 2.3, résidus encadrés). La séquence de la protéine contient également 6 sérines ayant des chances élevées d'être phosphorylées (probabilité: >0.800/1) et 1 thréonine pouvant être hautement phosphorylée (probabilité: >0.900/1) par les protéines kinases, incluant PKG (286), renforçant l'hypothèse que GREBP pourrait être impliqué dans une voie de signalisation du cGMP (Figure 2.3, résidus en gras). Les tableaux II et III présentent, de façons générales, les probabilités de phosphorylation des sérines et thréonines.

Les séquences nucléotidique et protéique de GREBP

```

AATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTCTAC 32
CATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAA 103
ACATGCTAGCTTTTATTCCAGTTCTAACCAAAAAATAAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTAT 174
TTCCTCACGAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGTATCCTCTTCAACAATATACTCTCCGGACA 245

ATG AAC CAT AAC CAA TAC TAC CAA TCA ATA CTC ATC ATT AAT AAT CAT AAT GGC 299
MET ASN HIS ASN GLN TYR TYR GLN SER ILE LEU ILE ILE ASN ASN HIS ASN GLY

TAT AGC AAT AAA ACT AGG AAT AGC CCC CTT TCA CTT CTG AGT CCC AGA GGT TAC 353
TYR SER ASN LYS THR ARG ASN SER PRO LEU SER LEU LEU SER PRO ARG GLY TYR

CCA AGG CAC CCC TCT GAC ATC CGG CCT GCT TCT TCT CAC ATG ACA AAA ACT AGC 407
PRO ARGHIS PRO SER ASP ILE ARG PRO ALA SER SER HIS MET THR LYS THR SER

CCC CAT CTC AAT CAT ATA CCA AAT CTC TCC CTC ACT AAA CGT AAG CCT TCT CCT 461
PRO HIS LEU ASN HIS ILE PRO ASN LEU SER LEU THR LYSARGLYS PRO SER PRO

CAC TCT CTC AAT CTT ATC CAT CAT AGC AGG CAG TTG AGG TGG ATT AAA CCA AAC 515
HIS SER LEU ASN LEU ILE HISHIS SER ARG GLN LEU ARG TRP ILE LYS PRO ASN

CCA GCT ACG CAA AAT CTT AGC ATA CTC CTC AAT TAC CCA CAT AGG ATG AAT AAT 569
PRO ALA THR GLN ASN LEU SER ILE LEU LEU ASN TYR PRO HISARG MET ASN ASN

AGC AGT TCT ACC GTA CAA CCC TAA CATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTATCCTAAC 632
SER SER SER THR VAL GLN PRO TERM

TACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAAACTCCAGCACCAGACCCTACTACTATCTCGCACCGAAACAG 703
CTACATGACTAACACCCTTAATTCCATCCACCCTCTCTCCCTAGGAGGCTGCCCCCGCTAACCGGCTTT 774
TTGCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATCATAGCCAC 845
CATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTACCTAGCCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCATAT 916
CTAACACGTAATAATAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCATTCTCCCCACTCATCGCC 987
CTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATACTAATAATCTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1058
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1083

```

Figure 2.3 Les motifs de déstabilisation de l'ARNm sont soulignés en double. Les résidus basiques encadrés, représentent 20 % (23/115) de GREBP et sont distribués tout au long de la protéine. Les résidus en gras sont ceux ayant davantage de chance d'être phosphorylés par une kinase sérine/thréonine, incluant PGK (sérine: >0800/1, thréonine: >0.900/1). Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Les prévisions de la phosphorylation des sérines de GREBP

Position (A.A)	Séquence (A.A.)	Probabilité de phosphorylation	
9	QYYQ S ILII	0,002	-
20	HNGY S NKTR	0,005	-
26	KTRN S PLSL	0,970	+++
29	NSPL S LLSP	0,974	+++
32	LSLL S PRGY	0,983	+++
41	PRHP S DIRP	0,830	++
47	IRPA S SHMT	0,994	+++
48	RPAS S HMTK	0,526	+
54	MTKT S PHLN	0,177	-
64	IPNL S LTKR	0,014	-
71	KRK P S S PHSL	0,996	+++
74	PSPH S LNLI	0,165	-
81	LIHH S RQLR	0,002	-
97	TQNL S ILLN	0,007	-
109	RMNN S SSTV	0,002	-
110	MNNS S SSTVQ	0,474	+
111	NNSS S TVQP	0,561	+

Tableau II. Les probabilités de phosphorylation des résidus sérine ont été déterminées par les algorithmes développés par Blom *et al.* (286). Un pointage de 1 représente une phosphorylation assurée. Les résidus 26, 29, 32, 46, et 71 ont de très fortes chances (+++) d'être phosphorylés. La probabilité de phosphorylation du résidu 41 est forte (++) tandis que celle des sérines 48, 110 et 111 est faible (+). Les autres résidus ont peu de chance d'être phosphorylés (-).

Les prévisions de la phosphorylation des thréonines de GREBP

Position (A.A.)	Séquence (A.A.)	Probabilité de phosphorylation	
23	YSNKTRNSP	0,042	-
51	SSHMTKTSP	0,353	+/-
53	HMTKTSPHL	0,367	+/-
66	NLSLTKRKP	0,903	+++
93	PNPATQNLS	0,038	-
112	NSSSTVQP	0,046	-

Tableau III. Les probabilités de phosphorylation des résidus thréonine ont été déterminées par les algorithmes développés par Blom *et al.* (286). Un pointage de 1 représente une phosphorylation assurée. Seul le résidu 66 a une forte chance d'être phosphorylé. Les thréonines 51 et 53 ont des probabilités de phosphorylation moyenne (+/-). Les autres résidus ont peu de chance d'être phosphorylés (-).

Chapitre 3

Interaction de GREBP avec l'ADN

3.1 Introduction au chapitre

Le criblage de la banque d'ADNc de rein humain par simple hybride chez la levure nous a permis d'isoler un clone liant le cGMP-RE, mais nous devons confirmer la liaison de ce clone à l'élément dans des conditions différentes de celles de la levure. Ainsi, nous avons utilisé la méthode du retard sur gel (EMSA), une technique classique qui consiste à provoquer une interaction *in vitro* protéine-ADN et à analyser la vitesse de migration des fragments d'ADN. Outre les EMSA, nous avons également testé l'existence d'interactions GREBP-ADN dans des conditions physiologiques en utilisant la méthode d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP). Cette méthode confirme la présence d'interactions protéine-ADN au niveau cellulaire (*in vivo*). Nous avons aussi développé une technique ingénieuse permettant de re-confirmer rapidement la capacité d'une protéine à lier un fragment d'ADN. Cette méthode peut être décrite comme un essai de liaison *in vitro* sur colonne d'affinité mais, contrairement aux essais de *pull-down* typiques, c'est la protéine qui est liée à la colonne et non le fragment d'ADN. L'analyse vise à observer la capacité de la protéine à retenir et à relâcher une sonde d'ADN double brin. En plus de confirmer de diverses manières les interactions GREBP-cGMP-RE, nous avons par ailleurs étudié la localisation cellulaire de GREBP, une étape primordiale à la compréhension de la fonction de la protéine et de sa dynamique.

3.2 Méthodologie

3.2.1 Les constructions plasmidiques

Les plasmides utilisés dans cette section ont été générés à l'aide de techniques habituelles de PCR, de sous-clonage et de transformation dans les bactéries DH5 α . Les constructions codant pour *grebp* ne contiennent qu'une seule copie du gène. L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée avec les trousse Maxiprep de Qiagen. Ainsi, le plasmide pGEX-3X-GREBP a été produit en utilisant les amorces sens 5'-TTGGATCCTTATGAACCATAACCAATAC-3' et antisens 5'-TTGAATTCTGTTAGGGTTGTACGGT-3'. L'amplicon a ensuite été sous-cloné en aval du gène du *gluthation-s-transférase* (GST) dans le plasmide pGEX-3X (GE Healthcare Bio-Sciences) aux sites BamHI/EcoRI. Le plasmide peGFP (enhanced green fluorescent protein, version C1, Clontech) a été utilisé comme vecteur source dans la production du plasmide peGFP-GREBP en introduisant aux sites KpnI/BamHI la région codante de *grebp* produite par les amorces sens 5'-TTGTCGACGGTACCATGAACCATAACCAATCTACC-3' et 5'-GTTCTACCGTACAACCCTAAGGATCC-3' antisens. Le plasmide pCDNA1-Neo-GREBP a été produit en clonant la région codante de *grebp* aux sites BamHI/NotI de pCDNA1-Neo (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). La séquence codante a été amplifiée avec l'amorce sens 5'-CGCCGGATCCGCCACCATGAACCATAACCAATACTACCA-3' et antisens 5'-TTGCGGCCGCTTAGCGTTGTACGGTAGAAC-3'. L'amorce sens a servi à introduire la séquence kozak (GCCACC) afin d'optimiser la traduction telle que définie par Marilyn Kozak (287). Nous avons aussi produit deux versions de GREBP étiquetées avec un épitope en c-terminal, soit un StrepTagII (WSHPQFEK) ou un HisTag (10 histidines), tous deux séparés de la protéine par un bras de trois acides aminés et clonés aux sites BamHI/XbaI. La version GREBP-StrepTagII a été produite

en utilisant l'amorce antisens 5'-
AATCTAGATTACTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGCGCCGGCGGGTTG
TACGGTAGAACTGCT-3' alors que la version GREBP-HisTag a été créée avec
l'amorce antisens 5'-
AATCTAGATTAGTGGTGGTGATGGTGATGGTGATGGTGGTGATGGGCGCCGGC
GGGTTGTACGGTAGAACTGCT-3'.

3.2.2 L'interaction GREBP-cGMP-RE : l'essai *in vitro* sur colonne d'affinité

Les plasmides pGEX-3X et pGEX-3X-GREBP ont été parallèlement transformés dans la souche bactérienne BL21 Rosetta (Novagen, Mississauga, ON, Canada) et incubée dans du milieu Terrific Broth (TB) (12 g/L tryptone, 24 g/L extrait de levure, 0.4% glycérol, 2.31 g/L KH_2PO_4 , 12.54 g/L K_2HPO_4) jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0.5 d'absorbance à la longueur d'onde de 600 nm. L'induction des protéines GST et GST-GREBP a été réalisée par l'addition de 1 mM d'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pour 2 heures. Les extraits de protéines bactériennes ont été préparés tel que décrit par Schimtzner *et al.* (288). Des colonnes contenant 1 mL de résine Gluthatione Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences) ont été montées et traitées selon les directives du fabricant. Les extraits bactériens ont alors été appliqués sur la matrice puis lavés avec 5 volumes de 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) afin d'éliminer les protéines non liées. Pour les expériences d'immunobuvardage (*western blot*), les protéines GST ou GST-GREBP ont été séparées par électrophorèse à partir d'un aliquot de 30 μL de résine GST ou GST-GREBP et transférées sur une membrane de nitrocellulose selon les techniques habituelles. La membrane a été bloquée 16 heures

dans du 1X PBS, 5% lait. Le premier anticorps (anti-GST, dilution 1/8000, SC-459, Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA) a été ajouté et incubé à température pièce pour une heure dans un tampon 1X PBS, 5% lait, 0.05% Tween-20, suivi de 3 lavages de 10 minutes avec du 1X PBS, 0.05% Tween-20. L'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre le lapin (dilution 1/15000, SC-2004) a été incubé à température pièce pour une heure dans du 1X PBS, 5% lait, 0.05% Tween-20, suivi de 3 lavages de 10 minutes avec du 1X PBS, 0.05% Tween-20. La concentration des protéines liées aux résines GST et GST-GREBP a été déterminée sur un aliquot de résine par dosage colorimétrique Bradford. Pour les essais d'interactions entre GREBP et le cGMP-RE, 5 mL de tampon de liaison (20 mM HEPES pH7.9, 35 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT) contenant 10 ng de sonde radioactive marquée au ³²P avec l'enzyme *Klenow* (Invitrogen) et correspondant à la séquence double brin consensus de rat du cGMP-RE (5'-AAAATAGATTTCAACAG-3') ont été ajoutés aux résines GST ou GST-GREBP et incubé 1 heure à température pièce. Suite à cette incubation, les colonnes ont été lavées 2 fois avec 5 mL de tampon de liaison afin d'enlever tout excédant de sonde radioactive. Les sondes radioactives liées aux protéines et/ou à la résine, ont été déplacées à l'aide d'un excès de sonde non radioactive (250X) dans du tampon de liaison pour 1 heure à température pièce. Les colonnes ont été drainées et la radioactivité a été comptée à chaque étape. La figure 3.1 décrit et schématise toutes les étapes de la liaison décrite ci-haut.

Le protocole de liaison à l'ADN *in vitro*

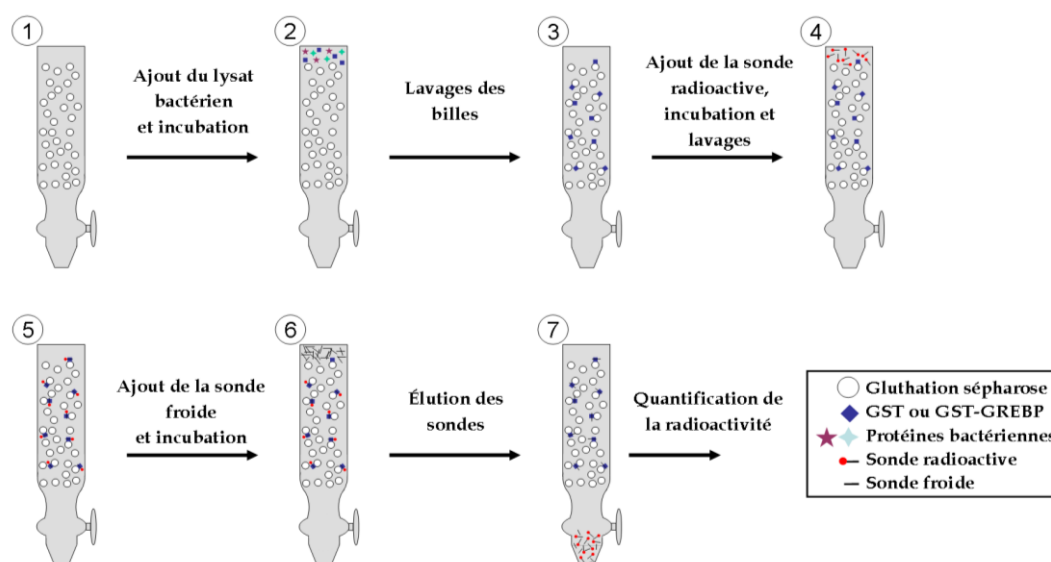


Figure 3.1 Une matrice de Glutathion-Sépharose est équilibrée selon les recommandations du fabricant (1) et l'on y applique un lysat bactérien ayant exprimé les protéines GST ou GST-GREBP (2). Une série de lavages permet de conserver par affinité les protéines ayant un domaine GST (3). Le cGMP-RE marqué radioactivement au phosphore-32 est ajouté (4). Après incubation et lavages, la sonde est spécifiquement liée à la protéine GST-GREBP (5). L'ajout d'un excès de sonde non radioactive (6) permet alors de déplacer la sonde radioactive (7). La mesure de la radioactivité des éluats de la colonne GST-GREBP est comparée à celle de la colonne GST pour démontrer la spécificité de la liaison du cGMP-RE à GREBP.

3.2.3 L'interaction GREBP-cGMP-RE : les essais de retard sur gel

Afin de procéder aux EMSA, nous avons utilisé les cellules HEK293 (ATCC, Rockville, MD, USA) maintenues dans du milieu DMEM+ (Dulbecco's modified Eagle's haut en glucose, 10% de sérum bovin foetal, 2% penicillin/streptomycin, 2

g/L de HEPES, 2.5 g/L de bicarbonate de sodium). Les transfections de ces cellules ont été faites avec le réactif Fugene 6 (Roche, Basel, Switzerland) selon les recommandations du fabricant. La production de protéine recombinante a été effectuée par la transfection des cellules HEK293 avec les plasmides pCDNA1-Neo-GREBP, GREBP-StrepTagII, GREBP-HisTag et le plasmide contrôle négatif vide (Neo). Après 36 heures d'incubation post-transfection, les cellules ont été récoltées par grattage dans 5-10 mL de 1X PBS froid et culottées par centrifugation 5 minutes à 600g. L'extraction de protéine est proportionnelle à l'aire des pétris traités. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tampon Tris (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM orthovanadate de sodium, 1X de l'inhibiteur de protéase Complete mini) et reculottés 5 minutes à 600g. Les culots ont été resuspendus dans 1 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tampon de lyse (20 mM Hepes pH 7.9, 350 mM NaCl, 20% glycérol, 1 mM MgCl_2 , 500 μM EDTA pH 6.5, 100 μM EGTA pH6.5, 1% Igepal CA-630, 1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate de sodium, 1X Complete mini) pour 30 minutes sur glace et centrifugés pendant 10 minutes à 12000g. Le surnageant contenant les protéines nucléaires a été mesuré par dosage colorimétrique Bradford et entreposé à -80°C pour usages futurs. Les EMSA ont été réalisés en combinant 5 μg de protéine dans un total de 18 μL de tampon de liaison (20 mM HEPES pH7.9, 35 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM DTT, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 12.5% glycérol), 500 ng de poly dI-dC, 35000 CMP de sonde radioactive d'ADN double brin, ainsi qu'une quantité variable de sonde froide, le tout incubé 30 minutes à température pièce. Les expériences de *supershift* ont été exécutées à l'aide des extraits de GREBP couplé aux épitopes et détectés à l'aide de leurs anticorps respectifs. 5 μg d'extrait de protéine GREBP-StrepTagII ont été incubés avec 1 μg d'anticorps (resuspendu dans 1X PBS) de souris anti-StreptagII

(Novagen) ou avec 1 μg d'albumine sérique de bovin (BSA) dans du 1X PBS comme contrôle. De la même manière, les extraits GREBP-Histag ont été incubés avec 500 ng d'anticorps His-probe (SC-803, Santa Cruz Biotechnology) ou avec 500 ng d'IgG de lapins normaux (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology) comme contrôle. Les anticorps ou les contrôles ont été ajoutés 10 minutes avant ou 20 minutes après l'addition de sondes radioactives et de 100 ng de poly dI-dC. Les échantillons ont été incubés pour un total de 30 minutes à température pièce dans 18 μL de tampon de liaison supershift (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 0.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 4% glycérol). Les réactions de liaison ont ensuite été déposées sur un gel de polyacrylamide (PAGE) 4.5% non-dénaturant auquel on a appliqué une tension de 15 volts/cm pour 2 heures. Les gels ont été séchés et exposés pour révélation à l'aide du Typhoon PhosphoImager (GE Healthcare Bio-sciences). Les séquences des différents cGMP-RE testés ayant servi à produire les EMSA sont répertoriées au tableau IV.

Sondes utilisées pour les EMSA

Nom	Séquence
Humain	5'-AAATGTACTTCAACATTC-3'
Rat	5'-AAATAGATTTCAACAGTT-3'
Souris	5'-AAATAGACTTCAACAGTT-3'
H24	5'-AGGAAATGTACTTCAACATTCTGC-3'
R24	5'-AGAAAATAGATTTCAACAGTTTGC-3'
M24	5'-AGAAAATAGACTTCAACAGTTTGC-3'
P1	5'-AGAAAATAGAATTCAACAGTTTGC-3'
P2	5'-AGAAAATAGAGTTCAACAGTTTGC-3'

Tableau IV. Séquences des sondes utilisées correspondant aux cGMP-RE dans les expériences de retard sur gel (EMSA).

3.2.4 Localisation cellulaire de GREBP par microscopie en fluorescence

Des cellules HEK293 ont étéensemencées sur des lamelles de verre puis transfectées avec le plasmide peGFP ou peGFP-GREBP. Après une incubation de 12 heures, les cellules ont été lavées au 1X PBS et fixées pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4%. Les lamelles ont été lavées et traitées avec une solution de blocage (0.075% saponine, 2% BSA, 0.2% gélatine, 1X PBS) pour 20 minutes à température pièce et colorées à la phalloïdine-texas red (0.2 μ M) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) et au DAPI (0.5 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) pour 40 minutes. Par la suite, les lamelles ont été lavées, fixées sur une lame et observées sous un microscope inversé Olympus IX71 à un grossissement de 40X.

3.2.5 Immuno-précipitation de la chromatine suite à son interaction avec GREBP

Des cellules HEK293 ont été ensemencées à haute densité dans des pétris de 75 cm² (T-75) et transfectées avec les plasmides peGFP ou peGFP-GREBP. Après 12 heures de croissance, les interactions ADN-protéine ont été fixées (*cross-linked*) par addition de formaldéhyde 1% pour 10 minutes à température pièce. La fixation a été arrêtée avec l'ajout de 125 mM final de glycine pour 5 minutes à température pièce. Après un lavage avec du 1X PBS froid, les noyaux ont été isolés par éclatement des cellules dans un tampon de lyse (5 mM PIPES pH8.0, 85 mM KCl, 0.5% Igepal CA-630, 1 mM PMSF, 1X Complete Mini) pour 10 minutes à 4°C, suivi d'une centrifugation à 2200g pour 5 minutes à 4°C. Les noyaux ont été resuspendus dans un tampon de lyse nucléaire (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1X Complete Mini), soniqués (4x15sec, puissance 90W) afin de fragmenter la chromatine et centrifugés à 16000g pour 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été traités avec des billes de protéine A Sepharose 6MB (GE Healthcare Bio-Sciences) pour 1 heure à 4°C. Les billes ont été centrifugées, entraînant par la même occasion les protéines ayant des interactions non spécifiques avec la protéine A. Aux surnageants GFP et GFP-GREBP, 1 µg d'IgG de lapins normaux (SC-2027) représente la fraction contrôle sans anticorps spécifique (no antibody), ou 1 µg d'anticorps anti-GFP (SC-8334, Santa Cruz Biotechnologie) a été ajouté et incubé pendant 16 heures avec agitation à 4°C dans un tampon d'immuno-liaison (16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1X Complete Mini). Avant la précipitation, 1/10 de ce mélange protéine-anticorps a été conservé comme échantillon pour la procédure de PCR sur fraction totale (*input*

fraction). La précipitation des complexes ADN-protéine-anticorps a été réalisée par l'ajout de protéine A sepharose 6MB pour 1 heure à 4°C puis centrifugée 10 minutes à 500g. Les culots ont été lavés deux fois avec le tampon de lavage numéro 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.2% N-lauryl sarcosyl, 1 mM PMSF) et 4 fois avec le tampon numéro 2 (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM LiCl, 1% deoxycholate, 1 mM PMSF). La récupération des échantillons a été faite en renversant la fixation de la chromatine avec la RNase A à 37°C pendant 1 heure, suivi d'une digestion à la protéinase K pendant 16 heures à 67°C, le tout dans un tampon d'éluion contenant 50 mM NaHCO₃ et 1% SDS. Après incubation, les échantillons ont été purifiés en utilisant les colonnes Illustra GFX (GE Healthcare Bio-Sciences) et élués avec 50 µL de tampon Tris-HCl pH 8.0. Les PCR ont été effectués avec 1 µL d'ADN purifié en utilisant les amorces sens 5'-GGCCTATCGACCACAATT-3' et antisens 5'-TCATTCTGCTTGGATTGGG-3' respectivement situés à -40bp et +78bp du cGMP-RE. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium.

3.3 Résultats

3.3.1 Interaction entre le cGMP-RE et GREBP

Nous avons confirmé la capacité de GREBP à lier le cGMP-RE en immobilisant la protéine GST et GST-GREBP sur une matrice de glutathion sépharose 4B. Les colonnes ont été drainées et une sonde radioactive, correspondant à la séquence du cGMP-RE, a été appliquée sur ces colonnes. Après des lavages successifs, les sondes liées ont été éluées par un excès de sondes non radioactives (250X). La résine

contenant GST-GREBP retient plus de sonde que la résine GST, alors que l'élu­tion avec la sonde non marquée a démontré que GST-GREBP possède une affinité beaucoup plus élevée pour le cGMP-RE que pour GST (figure 3.2).

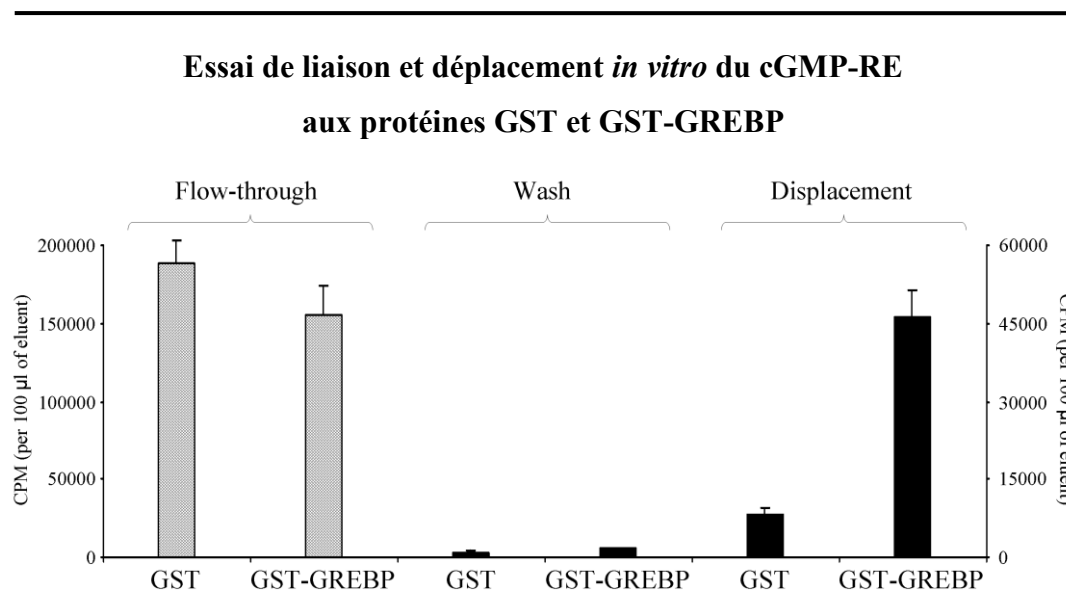


Figure 3.2 Données brutes provenant des mesures de la radioactivité des éluats aux étapes de liaison initiale de la sonde (*flow-through*), le lavage des matrices (*wash*) et le déplacement (*displacement*) des sondes radioactives à l'aide de sondes non radioactives. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Cette expérience a été répétée 3 fois et, en moyenne, nous avons observé une affinité de liaison 5 fois plus forte de GST-GREBP pour le cGMP-RE que le contrôle GST. Par immuno-buvardage, nous avons détecté 3.5 fois plus de protéines GST liées à la résine que de protéines GST-GREBP et, par conséquent, après correction pour la quantité de protéines présentes dans les colonnes, nous avons obtenu une affinité de

liaison 18 fois plus élevée de GST-GREBP que de GST pour le cGMP-RE (figure 3.3).

Affinité des protéines GST et GST-GREBP pour le cGMP-RE

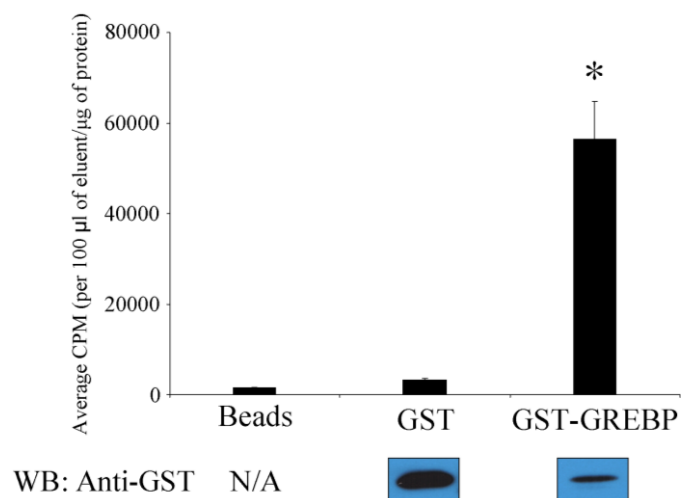


Figure 3.3 Compilation de 3 différentes expériences. La radioactivité provenant de l'élué des colonnes GST-GREBP, GST et des billes (*beads*), représentant les interactions avec la matrice, a été corrigée pour la quantité de protéines liées et comparée. La présence des protéines GST et GST-GREBP sur la résine a été confirmée par immuno-buvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre GST. *, $p=0.012$. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Nous avons poursuivi l'étude de l'interaction cGMP-RE/GREBP en réalisant des EMSA à l'aide de protéines exprimées dans les cellules humaines HEK293. Ces cellules ont été transfectées avec le plasmide pCDNA1-Neo-GREBP exprimant la région codante de *grebp* ou le plasmide contrôle vide pCDNA1-Neo. Les protéines nucléaires ont été extraites et les EMSA ont été faits selon les protocoles décrits

précédemment. Nous avons synthétisé des amorces double brin de 18- et 24-bp correspondant aux cGMP-RE de l'humain, du rat et de la souris puis testé la capacité de GREBP à lier ces amorces. Les extraits de cellules HEK293 ont lié les versions de 18-bp de l'humain et du rat, mais non celles de la souris (figure 3.4). La flèche de la figure 3.4 indique les interactions spécifiques entre le cGMP-RE et les protéines GREBP surexprimées. Les protéines des cellules transfectées avec le plasmide contrôle (Neo) ne lient que faiblement la sonde humaine radioactive (puits 2, Figure 3.4), mais la surexpression de *grebp* entraîne une augmentation de cette capacité de liaison (puits 3, Figure 3.4). Cette augmentation est spécifique puisqu'elle peut être déplacée par l'ajout de sondes non radioactives. L'addition de 50 fois (50X) de cGMP-RE non radioactif diminue l'interaction alors que l'excès de 100X inhibe les interactions au point de retourner aux valeurs du contrôle Neo (puits 4-5, Figure 3.4). Nous avons observé un profil de résultats sensiblement similaire avec le cGMP-RE de rat (puits 6-10, Figure 3.4). La surexpression de *grebp* dans les cellules HEK293 augmente l'interaction avec le cGMP-RE et l'ajout d'un excès (50X et 100X) de sondes de rat non radioactives inhibe la liaison à la sonde marquée. Malgré les essais répétés, nous n'avons jamais observé de bandes correspondant à une interaction entre GREBP et le cGMP-RE de la souris (puits 11-15, Figure 3.4).

Interaction de GREBP avec le cGMP-RE par EMSA

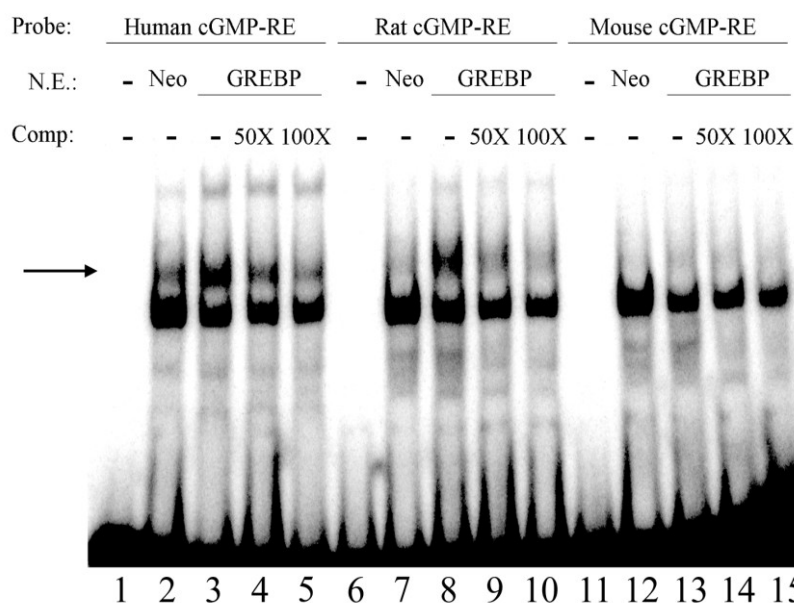


Figure 3.4 Des extraits cellulaires de cellules HEK293 surexprimant ou non *grebp* ont été incubés avec des sondes d'ADN double brin radioactives correspondant aux séquences du cGMP-RE de l'humain, du rat et de la souris, puis séparés sur un PAGE non dénaturant. La figure montre que les extraits lient les trois sondes (tous les puits). La flèche indique la présence d'une bande faiblement visible seulement dans les contrôles Neo de l'humain et du rat (puits 2 et 7) et où l'intensité augmente avec la transfection de *grebp* (puits 3 et 8). Cette interaction est spécifique puisqu'elle peut être déplacée par un excès de 50X et de 100X de sondes non marquées (puits 4, 5, 9 et 10). N. E.: extrait nucléaire, Comp.: compétiteur non radioactif. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

La différence entre l'interaction du cGMP-RE du rat versus la souris est très intrigante puisque les séquences sont très homologues. En effet, les sondes de rat et de souris ne sont différentes que d'un seul nucléotide. Afin d'expliquer ce

phénomène, nous avons synthétisé des sondes plus longues (24-bp) correspondant aux séquences de l'humain, du rat et de la souris ainsi que 2 autres sondes (P1 et P2) similaires aux sondes de rat/souris sauf pour une variation en position 11. Nous avons observé que, même si GREBP lie la sonde humaine de 24-bp (H24, puits 3, figure 3.5), la protéine n'a pas été en mesure de lier les équivalents du rat (R24, puits 4, figure 3.5) et de la souris (M24, puits 5, figure 3.5). La modification du nucléotide en position 11 en A ou G, respectivement P1 ou P2, n'a pas été suffisante pour rétablir la liaison entre GREBP et ces sondes. Il existe donc de grandes différences dans l'interaction entre les sondes et la protéine, mais aucune n'affecte la liaison au cGMP-RE humain.

Effet de la taille du cGMP-RE sur l'affinité avec GREBP

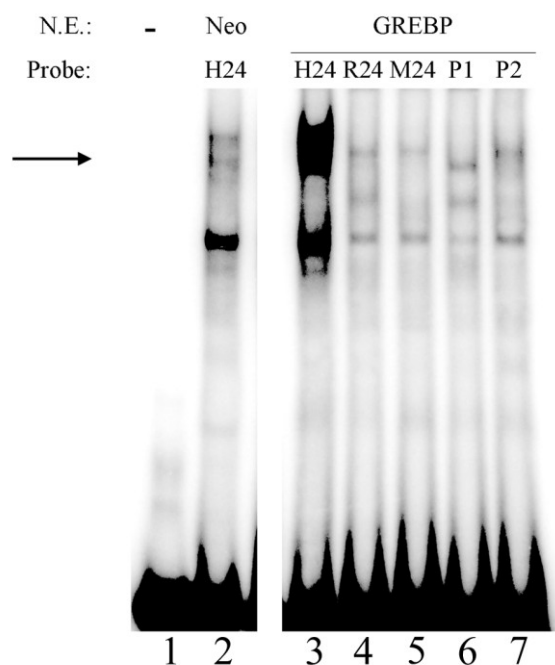


Figure 3.5 Des extraits de cellules transfectées avec Neo ou *grebp* ont été utilisés pour déterminer l'affinité de liaison de la protéine aux sondes du cGMP-RE de 24-bp. L'interaction GREBP-ADN n'est possible qu'avec de la sonde radioactive humaine (H24) avec l'extrait du contrôle Neo (puits 2) et, plus intensément, avec celui de GREBP surexprimé (puits 3). Les autres sondes de 24-bp (rat: R24, souris: M24, rat/souris avec le nucléotide A en position 11: P1, rat/souris avec le nucléotide G en position 11: P2) n'ont pas lier GREBP, ne produisant que des interactions non spécifiques. N. E.: extrait nucléaire. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Afin de confirmer que GREBP était véritablement la protéine responsable des interactions ADN-protéines observées avec les extraits cellulaires, nous avons effectué des EMSA en incluant des essais de super-déplacement (*supershift*). Pour ces expériences, nous avons généré 2 versions de GREBP étiquetées avec un épitope

comprenant un bras de 3 acides aminés séparant les 2 domaines. La surexpression de ces deux protéines, GREBP-StrepTagII et GREBP-HisTag, dans les cellules HEK293 a mené aux mêmes résultats quant aux interactions ADN-protéines et ADN-protéines-anticorps tel qu'observé aux figures 3.6 et 3.7. L'ajout d'un anticorps spécifique dirigé contre l'étiquette StrepTagII ou polyhistidine n'a pas causé de retard de migration additionnel (*supershift*), mais a inhibé la formation des complexes cGMP-RE/GREBP lorsque ceux-ci ont été ajoutés avant l'amorce radioactive (puits 4 des figures 3.6 et 3.7). Nous avons aussi remarqué que la formation des complexes cGMP-RE/GREBP est faiblement inhibée lorsque les anticorps sont ajoutés après le cGMP-RE radioactif (puits 6 des figures 3.6 et 3.7). En démontrant que les deux anticorps dirigés contre leur version respective étiquetée de GREBP ont inhibé les interactions ADN-protéines, nous avons ainsi confirmé que GREBP est spécifiquement impliqué dans la formation, *in vitro*, des complexes avec le cGMP-RE.

**Inhibition de l'interaction entre les protéines GREBP-StrepTagII et le
cGMP-RE par l'anticorps dirigé contre l'étiquette StrepTagII**

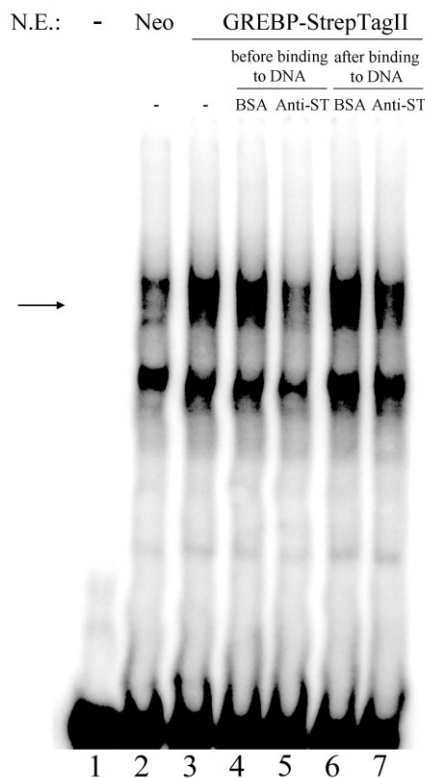


Figure 3.6 Expérience de retard sur gel utilisant des extraits cellulaires de cellules HEK293 surexprimant GREBP-StrepTagII et la sonde humaine. La surexpression de GREBP-StrepTagII (puits 3) a conduit à une augmentation de la liaison protéine-ADN en comparaison avec le contrôle Neo (puits 2). L'ajout de 1 μg d'anticorps StrepTagII avant la sonde radioactive a inhibé la liaison (puits 5) alors que la même quantité d'anticorps ajoutée après la sonde n'a pratiquement pas eu d'effet sur la liaison (puits 7). Le BSA a été utilisé comme contrôle et a été ajouté avant (puits 4) ou après (puits 6) la sonde radioactive sans avoir aucun effet sur la capacité de GREBP-StrepTagII à lier le cGMP-RE seul (puits 3). N. E.: extrait nucléaire, Anti-ST: anticorps StrepTagII. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

**Inhibition de l'interaction entre les protéines GREBP-HisTag et le
cGMP-RE par l'anticorps dirigé contre l'étiquette HisTag**

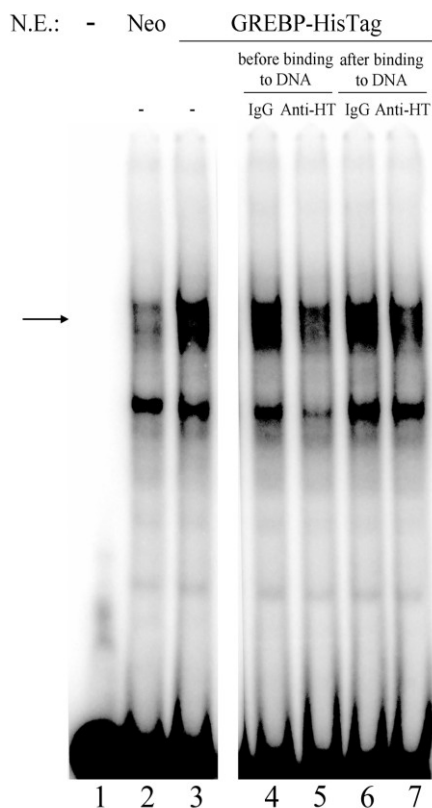


Figure 3.7 Expérience de retard sur gel utilisant des extraits cellulaires de cellules HEK239 surexprimant GREBP-HisTag et la sonde humaine. La surexpression de GREBP-HisTag (puits 3) a conduit à une augmentation de la liaison protéine-ADN en comparaison avec le contrôle Neo (puits 2). L'ajout de 0.5 μ g d'anticorps HisTag avant la sonde radioactive a inhibé la liaison (puits 5) alors que la même quantité d'anticorps ajoutée après la sonde n'a pratiquement pas eu d'effet sur la liaison (puits 7). 0.5 μ g de IgG de lapins normaux a été utilisé comme contrôle et a été ajouté avant (puits 4) ou après (puits 6) la sonde radioactive sans avoir aucun effet sur la capacité de GREBP-HisTag à lier le cGMP-RE seul (puits 3). N. E.: extrait nucléaire, Anti-HT: anticorps HisTag. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

3.3.2 L'immuno-précipitation de la chromatine

Finalement, nous avons examiné la capacité de GREBP à lier le cGMP-RE sous des conditions physiologiques en réalisant un essai de ChIP. Nous avons transfecté des cellules HEK293 avec le plasmide peGFP ou peGFP-GREBP, fixé les interactions ADN-protéines avec de la formaldéhyde et isolé la fraction nucléaire. Après immuno-précipitation (IP) avec IgG ou un anticorps anti-GFP, nous avons effectué sur ces fractions une amplification par PCR de la région génomique entourant le cGMP-RE dans le promoteur de *npr1/gca*. La Figure 3.8 montre une bande de 178-bp correspondant la région amplifiée du promoteur *npr1/gca* (-1611 à 1433-bp) dans la fraction *input* (avant le IP), ainsi que sa présence dans la fraction immuno-précipitée par l'anticorps anti-GFP des cellules transfectées GFP-GREBP. Aucune amplification n'a été possible dans les fractions contrôles obtenues en immuno-précipitant des protéines GFP-GREBP à l'aide IgG de lapin (représentant la condition *no antibody*). Nous confirmons l'absence d'interaction entre GFP seul et l'ADN en immuno-précipitant avec l'anticorps anti-GFP. Ces résultats démontrent ainsi que GREBP se lie spécifiquement à la région couverte par le cGMP-RE, et ce, dans des conditions physiologiques.

**Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) du
complexe GREBP/cGMP-RE**

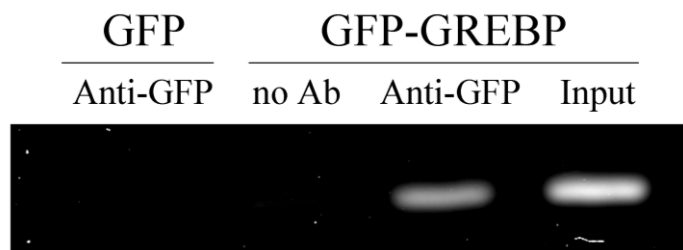


Figure 3.8 Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide peGFP ou peGFP-GREBP pour 12 heures et fixées avec la formaldéhyde. Les cellules surexprimant GFP ont été utilisées comme contrôle négatif. Les complexes protéine-ADN ont été immuno-précipités avec un anticorps contre GFP et des IgG de lapins normaux comme contrôle négatif (*no ab*). Le puits *Input* représente une fraction de 1/10 du surnageant avant immuno-précipitation. Les PCR ont été réalisés en ciblant l'amont et l'aval du cGMP-RE présents dans le promoteur de NPR1/GCA. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

3.3.3 Localisation cellulaire de GREBP

Nous avons transfecté de façon transitoire des cellules HEK293 avec le plasmide peGFP-GREBP afin de localiser la protéine GREBP par microscopie à fluorescence. L'expérience contrôle avec le plasmide peGFP a démontré que la protéine GFP diffuse dans toute la cellule (Figure 3.9, cadres du haut). Tel que prévu, les cellules transfectées avec peGFP-GREBP présentent une accumulation nucléaire de GFP-GREBP qui chevauche parfaitement la coloration du noyau au DAPI (Figure 3.9, cadres du bas).

Localisation cellulaire de GREBP

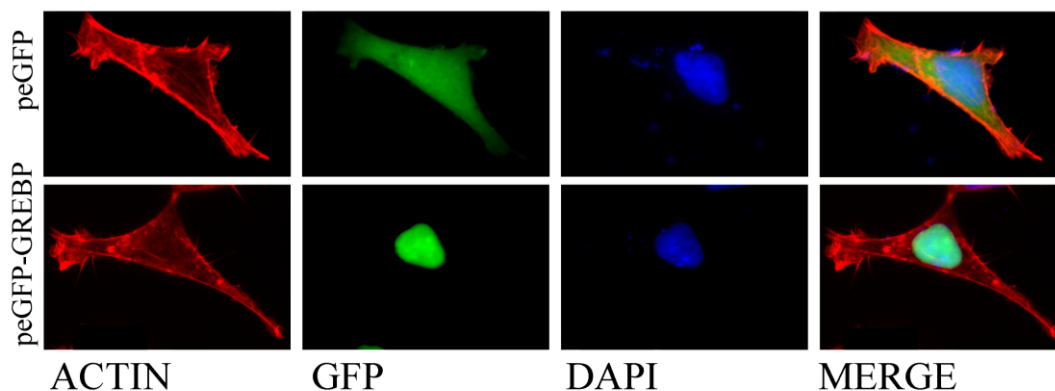


Figure 3.9 Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide peGFP ou peGFP-GREBP et incubées pendant 12 heures. Elles ont ensuite été fixées avec de la paraformaldéhyde et les structures cellulaires ont été révélées avec la phalloïdine pour l'actine et le DAPI pour le noyau. Les photos du haut montrent une distribution diffuse et généralisée du contrôle GFP dans la cellule transfectée avec peGFP. Les photos du bas montrent une concentration nucléaire de la protéine de fusion GFP-GREBP dans les cellules transfectées avec le plasmide peGFP-GREBP. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Chapitre 4

Contrôle de l'expression de *npr1/gca* par GREBP et l'ANP

4.1 Introduction au chapitre

Au chapitre 2, nous avons décrit les étapes menant à la découverte d'une nouvelle protéine à partir de l'utilisation du cGMP-RE comme appât jusqu'à l'analyse de l'ARNm, que nous avons nommé GREBP. L'interaction suspectée entre GREBP et le cGMP-RE a été confirmée au chapitre 3, tant *in vitro* que *in vivo*, en utilisant diverses techniques. La localisation nucléaire de GREBP a été prouvée par microscopie. Même si GREBP lie le cGMP-RE et se retrouve au noyau, nous ne pouvons évaluer l'importance de cette protéine sans poursuivre l'investigation. Le chapitre 4 met en évidence l'implication de GREBP dans la boucle de rétro-inhibition ANP-NPR1/GCA. Afin d'y parvenir, nous avons évalué le comportement du promoteur de *npr1/gca* en inhibant ou en surexprimant *grebp*. De plus, nous avons aussi étudié la dynamique de la co-expression des gènes *npr1/gca* et *grebp* lors de stimulation de cellules avec de l'ANP afin de déterminer l'importance de GREBP dans cette voie de signalisation.

4.2 Méthodologie

4.2.1 Les constructions plasmidiques

Dans les expériences d'essai à la luciférase, le plasmide hGCAP-pGL3b a été produit par l'amplification d'une portion du promoteur *npr1/gca* à l'aide de la trousse Genome Walker de Clontech. Le fragment de -2055 à +338-bp du promoteur a été cloné par digestion enzymatique aux sites KpnI/NcoI afin de contrôler l'expression du gène-rapporteur de la luciférase du plasmide pGL3b (Promega, Madison, WI, USA). Une version de ce plasmide sans l'élément de réponse (cGMP-RE), le

plasmide hGCA(Δ cGMP-RE)-pGL3b, a été générée par « jumping PCR » en utilisant le plasmide hGCAP-pGL3b et les amorces sens 5'-AGTCTCCTAAAATTCCATATATGTAGTCTGTCTACACAGAATACCT-3' et antisens 5'-GTATTCTGTGTAGACAGACTACATATATGGAATTTTAGGAGACTTG-3'. La méthode du « jumping PCR » a permis de supprimer le cGMP-RE en coupant exactement deux tours d'hélice au plasmide. Les plasmides nécessaires pour effectuer les expériences d'interférences aux shRNA (*small hairpin RNA*) ont été produits à partir du plasmide pSilencer 2.0-U6 (Ambion, Austin, TX, USA) en clonant un insert aux sites BamHI/HindIII. Le plasmide contrôle pSilencer 2.0-U6-NT (Non-Target) contient comme brin supérieur 5'-GATCC CAGTGCTGGTACTTGTACTTCTCTTGAAAGTACAAGTACCAGCACTGTTTT TTTGGAAA -3' et comme brin inférieur 5'-AGC TTTTCCAAAAAACAGTGCTGGTACTTGTACTTTCAAGAGAAGTACAAGT ACCAGCACTGG-3'. Le shRNA dit *non-target* a été dessiné en fonction de sa capacité à activer exclusivement les voies de signalisation de l'ARN d'interférence sans cibler d'autres messagers. Il s'agit une méthode qui a été utilisée par plusieurs groupes (289-291) et qui permet un criblage plus rapide des ARN interférents (ARNi) spécifiques. Le plasmide produisant le shRNA spécifiquement dirigé contre GREBP, pSilencer 2.0-U6-GREBP, a été généré en utilisant les amorces 5'-GATCCATGGGCCATTATCGAAGAATTCAAGAGATTCTTCGATAATGGCCC ATTTTTTTGGAAA-3' et 5'-AGC TTTTCCAAAAAATGGGCCATTATCGAAGAATCTCTTGAATTCTTCGATAA TGGCCCATG-3' comme brin supérieur et inférieur respectivement.

4.2.2 Études fonctionnelles de GREBP

Des essais de tri-transfections ont été effectués afin d'étudier les modulations de l'activité promotrice de *npr1/gca* sous le contrôle de GREBP. Le jour précédant les transfections, des cellules HEK293 ont étéensemencées dans une plaque de 12 puits (7×10^4 cellules/puits). Les plasmides hGCAP-pGL3b, hGCA(Δ cGMP-RE)p-pGL3b, pCDNA1-Neo, pCDNA1-Neo-GREBP (pour la surexpression), pSilencer 2.0-U6-NT ou pSilencer 2.0-U6-GREBP (pour les ARNi), ainsi que le contrôle interne pCMV- β gal (Clontech) ont été transfectés avec le réactif Fugene 6 et les cellules ont été incubées 24 heures avant d'effectuer différents traitements. Pour les essais luciférase, les cellules ont été lysées avec le *Promega Reporter Buffer* (Promega). L'activité luciférase a été quantifiée avec l'appareil *20/20n Luminometer* (TurnerBiosystem, Sunnyvale, CA, USA) et le taux de β -galactosidase a été mesuré en utilisant l'ONPG comme substrat (292). Dans les études impliquant des mesures directes des transcrits, l'ARN total des cellules a été extrait avec le *Trizol Reagent* (Invitrogen), traité à la DNaseI (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 U/mL RNaseOUT, 0.2 U μ /L DNaseI), puis suivi d'une ré-extraction au *Trizol Reagent*. Les PCR semi-quantitatifs (sqRT-PCR) ont été réalisés avec la M-MLV-RT et le *Quantum RNA 18S internal standard kit* de Ambion (Austin, TX, USA). La surexpression de *grebp* a été confirmée par sqRT-PCR en ciblant la région 5'UTR du messenger produit par le plasmide pCDNA1-Neo-GREBP amplifiée à l'aide des amorces sens 5'-CTTGGTACCGAGCTCGGATC-3' et antisens 5'-TTGCGGCCGCTTAGCGTTGTACGGTAGAAC-3'. Les expériences d'interférences d'ARN dirigé contre GREBP ont été réalisées avec le plasmide

pSilencer 2.0-U6-GREBP ou le plasmide contrôle pSilencer 2.0-U6-NT. Des cellules HEK293 (1.7×10^5 cellules/puits) ont été transfectées dans une plaque de 6 puits avec 1 μ g des plasmides pSilencer appropriés et incubées 24 heures avant la lyse. L'effet de GREBP sur les taux endogènes d'ARNm de NPR1/GCA a été étudié dans des cellules NCI-H295R (human adrenocortical carcinoma, ATCC). Ces dernières ont été maintenues dans du milieu HamF12 (10% de sérum bovin fœtal, 2% penicillin/streptomycin, 2 g/L de HEPES et 2.5 g/L de bicarbonate de sodium) et transfectées avec le plasmide pCDNA1-Neo ou pCDNA1-Neo-GREBP. 24 heures après la transfection, les cellules ont été trypsinisées et ensemencées dans du milieu HamF12 contenant 500 μ g/mL de G418 (Invitrogen) afin de sélectionner les cellules ayant intégré les plasmides pCDNA1. Après trois passages, l'ARNm des cellules polyclonales résistantes au G418 a été extrait afin de quantifier l'expression de *grebp* et de *npr1/gca*. Les sqRT-PCR ont été réalisés en utilisant les amorces sens 5'-TTGGATCCTTATGAACCATAACCAATAC-3' et antisens 5'-TTGAATTCTGTTAGGGTTGTACGGT-3' pour *grebp* alors que *npr1/gca* a été mesuré à l'aide des amorces sens 5'-ATCCAAGTGCCTGGTGGTGGG-3' et antisens 5'-ATTTCGGAAGGAGCGCACAGCAT-3'.

4.2.3 Profil d'expression des gènes *grebp* et *npr1/gca*

Les cellules Hela (*human cervical carcinoma*, ATCC) ont été maintenues dans le milieu DMEM+, tandis que les cellules NCI-H295R ont été maintenues dans le milieu HamF12. Les cellules Hela (1.0×10^6 cellules) et NCI-H295R (1.5×10^6 cellules) ont été ensemencées dans des pétris de 25 cm² (T-25) et incubées jusqu'à une confluence quasi-complète. Elles ont ensuite été privées de sérum pendant 24 heures

avec du milieu à 0.2% de FBS et incubées en présence d'acide acétique 1×10^{-4} N (le véhicule) ou 100 nM d'ANP pendant 1 à 14 heures. L'expression de *grebp* et *npr1/gca* a été mesuré par sqRT-PCR avec les amorces mentionnées précédemment. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'expression des gènes et relativement aux cellules traitées avec le véhicule.

4.3 Résultats

4.3.1 GREBP régule l'activité du promoteur de *npr1/gca*

Nous avons émis l'hypothèse que GREBP est impliqué dans la régulation du gène *npr1/gca*. La possibilité que GREBP inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur de *npr1/gca* a été évaluée par la co-transfection de la construction hGCAP-pGL3b, contenant le fragment -2055 à +338-bp du promoteur de *npr1/gca* (le cGMP-RE étant à -1546-bp) et le plasmide pCDNA1-Neo ou pCDNA1-Neo-GREBP codant pour le gène *grebp*. Le plasmide pCMV β -gal a été utilisé comme marqueur d'efficacité des transfections. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec 10 ng de plasmide pCMV β -gal, 200 ng de hGCAP-pGL3b et un total de 500 ng de pCDNA1. Puisque la quantité de plasmide utilisée affecte l'efficacité des transfections, nous avons réduit les variations inter-essais en maintenant constante la quantité totale des plasmides transfectés et en ne faisant varier que le ratio pCDNA1-Neo:pCDNA1-Neo-GREBP. L'augmentation du ratio du plasmide pCDNA1-Neo-GREBP sur le contrôle pCDNA1-Neo a entraîné une augmentation dose-dépendante de l'expression de *grebp*, ainsi qu'une diminution concomitante de l'activité luciférase sous contrôle du promoteur *npr1/gca* (Figure 4.1).

**L'activité du promoteur de *npr1/gca* est inhibée de façon
dose-dépendante par la surexpression de *grebp***

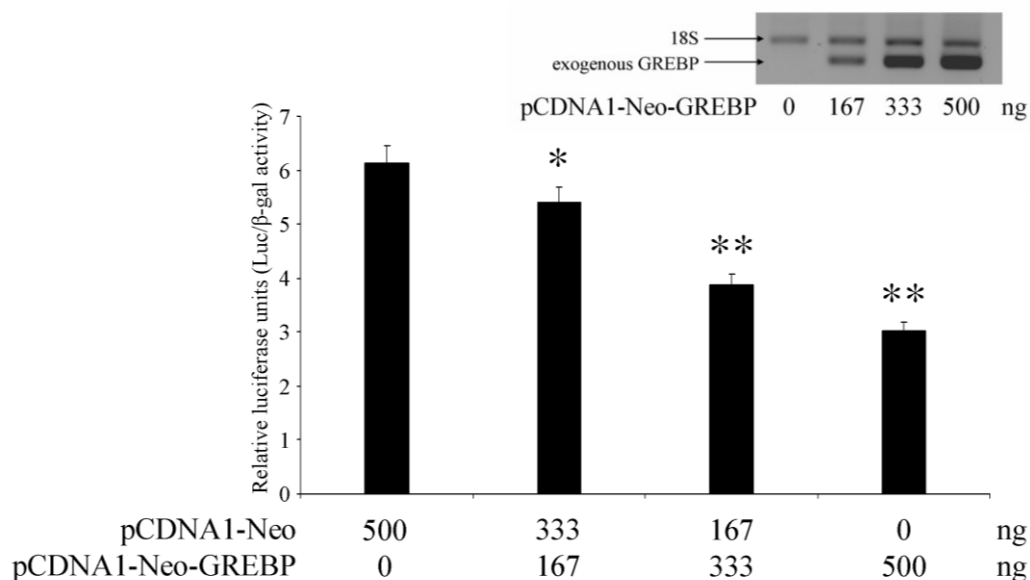


Figure 4.1 Des cellules HEK293 ont été co-transfectées avec 10 ng de pCMV β-gal, 200 ng de hGCAP-pGL3b et 500 ng d'une combinaison variable de pCDNA1-Neo et pCDNA1-Neo-GREBP par essai. La surexpression de *grebp* a été confirmée par sqRT-PCR en utilisant des amorces spécifiques ciblant le *grebp* exprimé par le plasmide pCDNA1-Neo-GREBP. Les valeurs représentent la moyenne±SEM de l'activité luciférase relative provenant d'une compilation de 4 expériences effectuées en triplicata (n=12). * p<0.05, ** p<0.001 versus Neo seul. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Nous avons ainsi évalué l'effet spécifique de GREBP en supprimant le cGMP-RE du promoteur de *npr1/gca*. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec 10 ng de plasmide pCMV β-gal, 500 ng des plasmides pCDNA1 et 200 ng de plasmide

hGCAP-pGL3b ou hGCA(Δ cGMP-RE)p-pGL3b (soit le plasmide sans le cGMP-RE). La surexpression de GREBP a inhibé l'activité du promoteur intégral de *npr1/gca* de façon très significative à plus de 30% ($p < 0.0001$), alors qu'elle n'a eu aucun effet sur la version privée de son cGMP-RE (Figure 4.2). De plus, la délétion du cGMP-RE, un élément de régulation négatif, a causé une augmentation significative ($p < 0.0001$) de l'activité du promoteur du gène *npr1/gca* à hauteur de 175% (Figure 4.2, Neo vs Neo respectivement avec et sans le cGMP-RE). Ces expériences démontrent sans équivoque que la surexpression de *grebp* conduit à une inhibition dose-dépendante de l'activité promotrice de *npr1/gca* et que cette inhibition est médiée exclusivement par la présence du cGMP-RE dans ce promoteur.

L'inhibition du promoteur de *npr1/gca* est dépendante du cGMP-RE

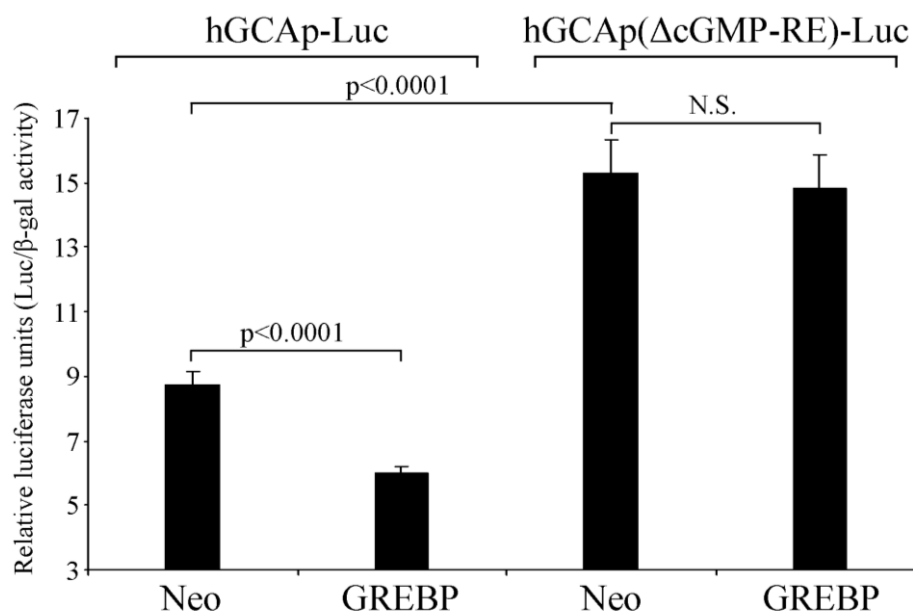


Figure 4.2 Des cellules HEK293 ont été co-transfectées avec 10 ng de pCMV β-gal, 400 ng pCDNA1-Neo ou pCDNA1-Neo-GREBP, 200 ng de hGCAP-pGL3b ou de hGCA(ΔcGMP-RE)p-pGL3b. Les moyennes ± SEM de l'activité luciférase relative proviennent de 4 expériences effectuées en triplicate (n=12). Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Nous avons également confirmé que GREBP contrôle les taux endogènes d'expression de *npr1/gca*. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules NCI-H295R avec le plasmide pCDNA1-Neo ou pCDNA1-Neo-GREBP. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été trypsinisées etensemencées dans le DMEM+ contenant 500 μg/mL de G418, un antibiotique sélectionnant les cellules eucaryotes. Les cellules ayant intégré un plasmide produisent le gène de résistance Neo, une enzyme aminoglycoside phosphotransférase, et survivent dans ce milieu contenant du

G418. Après trois passages en présence de l'antibiotique sélectif, les cellules qui se propagent normalement ont été utilisées pour mesurer l'expression des gènes. L'ARN de ces cellules Neo et GREBP a été extrait et le taux des messagers a été mesuré par sqRT-PCR. Les cellules transfectées avec pCDNA1-Neo-GREBP montrent une expression de *grebp* 125% plus élevée que le contrôle pCDNA1-Neo (Figure 4.3 A). Dans ces mêmes cellules, l'augmentation de *grebp* entraîne une baisse de 36% de l'expression du gène *npr1/gca* (Figure 4.3 B). Donc, dans des conditions normales, l'intégration et la surexpression du gène *grebp*, même faible, se traduit par une baisse significative de l'ARNm de NPR1/GCA.

La surexpression de *grebp* influence l'expression endogène de *npr1/gca*

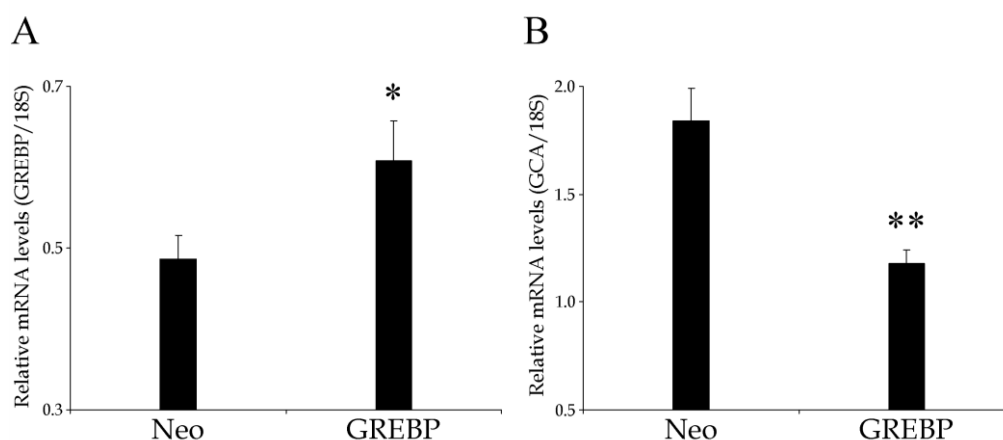


Figure 4.3 Des cellules NCI-H295R ont été transfectées avec pCDNA1-Neo ou pcDNA1-Neo-GREBP et stabilisées pendant trois passages avec du G418 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A) L'expression de *grebp* est 125% fois plus importante dans ces cellules positives que celles transfectées avec le plasmide pCDNA1-Neo. B) Cette surexpression entraîne simultanément une baisse de 36% du transcrite de NPR1/GCA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM relatif au contrôle pCDNA1-Neo (n=4). * p<0.05, ** p<0.003

Nous avons vérifié l'effet de l'inhibition de GREBP sur les taux d'expression de NRP1/GCA. L'inhibition de GREBP a été provoquée par un ARN interférent (shRNA). Nous avons transfecté des cellules HEK293 (1.7×10^5 cellules/puits sur une plaque de 6 puits) avec 1 μg de plasmide pSilencer 2.0-U6-GREBP ou le plasmide contrôle pSilencer 2.0-U6-NT et incubé les cellules 24 heures avant l'extraction de l'ARN et le sqRT-PCR. En comparaison avec le contrôle, le shRNA spécifiquement dirigé contre la position 781-bp de l'ARNm de GREBP inhibe 35% du messenger (figure 4.4 A). Cette diminution de la quantité du transcrite de *grebp* est directement

associée à une augmentation statistiquement significative de 15% des taux endogènes de l'ARNm de NPR1/GCA (figure 4.4 B). De plus, dans les expériences utilisant la luciférase comme gène rapporteur, la co-transfection de 10 ng de pCMV β -gal, 200 ng de hGCAP-pGL3b, 300 ng de pSilencer 2.0-U6-GREBP ou de plasmide contrôle pSilencer 2.0-U6-NT, a conduit à une augmentation de 30% de l'activité promotrice de *npr1/gca* dans les cellules traitées avec l'ARNi contre GREBP (figure 4.4 C). Ces expériences démontrent que même une inhibition partielle de l'ARNm de GREBP provoque une hausse de l'activité transcriptionnelle du promoteur de *npr1/gca*.

La régulation transcriptionnelle de *npr1/gca* nécessite l'expression de *grebp*

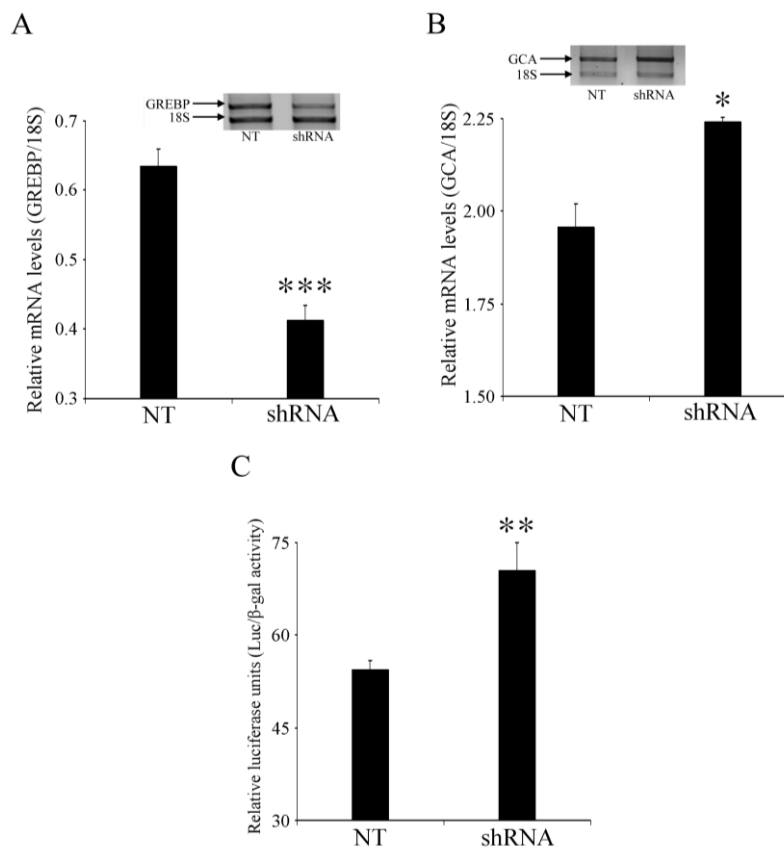


Figure 4.4 Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide pSilencer produisant un ARNi non spécifique (pSilencer 2.0-U6-NT) ou dirigé contre GREBP (pSilencer 2.0-U6-GREBP) et incubées pendant 24 heures. Les expressions de *grebp* (A) et NPR1/GCA (B) ont été mesurées par sqRT-PCR. C) L'inhibition de GREBP stimule le gène rapporteur luciférase couplé au promoteur de NPR1/GCA. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec 10 ng de pCMV β-gal, 200 ng de hGCAP-pGL3b et 300 ng de pSilencer 2.0-U6-NT ou pSilencer 2.0-U6-GREBP et incubées pendant 24 heures. Les moyennes±SEM représentent les taux relatifs d'ARNm ou l'activité relative luciférase (n=3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 *versus* NT. Figures tirées de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

4.3.2 Les effets de l'ANP sur l'expression des gènes *grebp* et *npr1/gca*

Puisque l'ANP auto-régule l'expression de son récepteur, nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle GREBP serait également influencé par cette hormone, étant un intermédiaire possible de cette boucle de rétro-inhibition. L'exposition de cellules Hela à 100 nM d'ANP pendant 3 heures double l'expression basale de l'ARNm de GREBP (Figure 4.5).

L'expression de *grebp* est stimulée par l'ANP

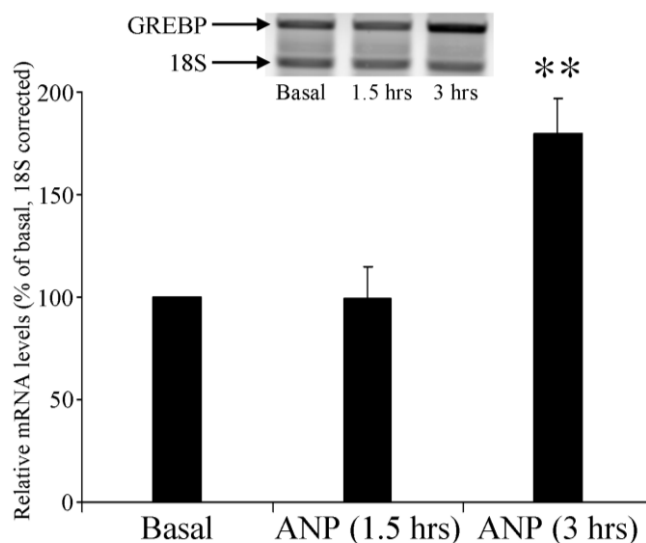


Figure 4.5 Des cellules Hela ont été stimulées avec 100 M d'ANP ou le véhicule pendant 1.5 et 3 heures. L'expression de *grebp* a été mesurée par sqRT-PCR. Les moyenne±SEM sont relatives à l'état basal après la stimulation avec de l'ANP (n=4). ** p<0.01. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Nous avons confirmé cet effet à l'aide d'une autre lignée cellulaire sensible à l'ANP, les cellules surrénaliennes (NCI-H295R). Elles ont été stimulées avec l'ANP (100

nM) durant la période de temps indiquée et l'expression des gènes *grebp* et *npr1/gca* a été mesurée par sqRT-PCR tel que résumé à la figure 4.6 A. Nous avons observé une baisse du transcrit de NPR1/GCA de 32% en réponse à 3 heures de stimulation avec l'ANP, atteignant une baisse maximale de 44% après 14 heures (Figure 4.6 B, cercle). Parallèlement, une stimulation de 3 heures à l'ANP provoque une hausse de 162% de l'ARNm de GREBP (Figure 4.6 B, diamant). Cette hausse de l'expression de *grebp* est suivie d'un retour au taux basal après 6 heures de stimulation ainsi qu'une légère baisse après 14 heures d'incubation en comparaison aux cellules non traitées (Figure 4.6 B, diamant). Ces résultats montrent que dans ces cellules, la stimulation par l'ANP provoque une hausse transitoire de *grebp* tout en déclanchant l'inhibition de la transcription du gène *npr1/gca*.

La stimulation à l'ANP module l'expression de *grebp* et de *npr1/gca*

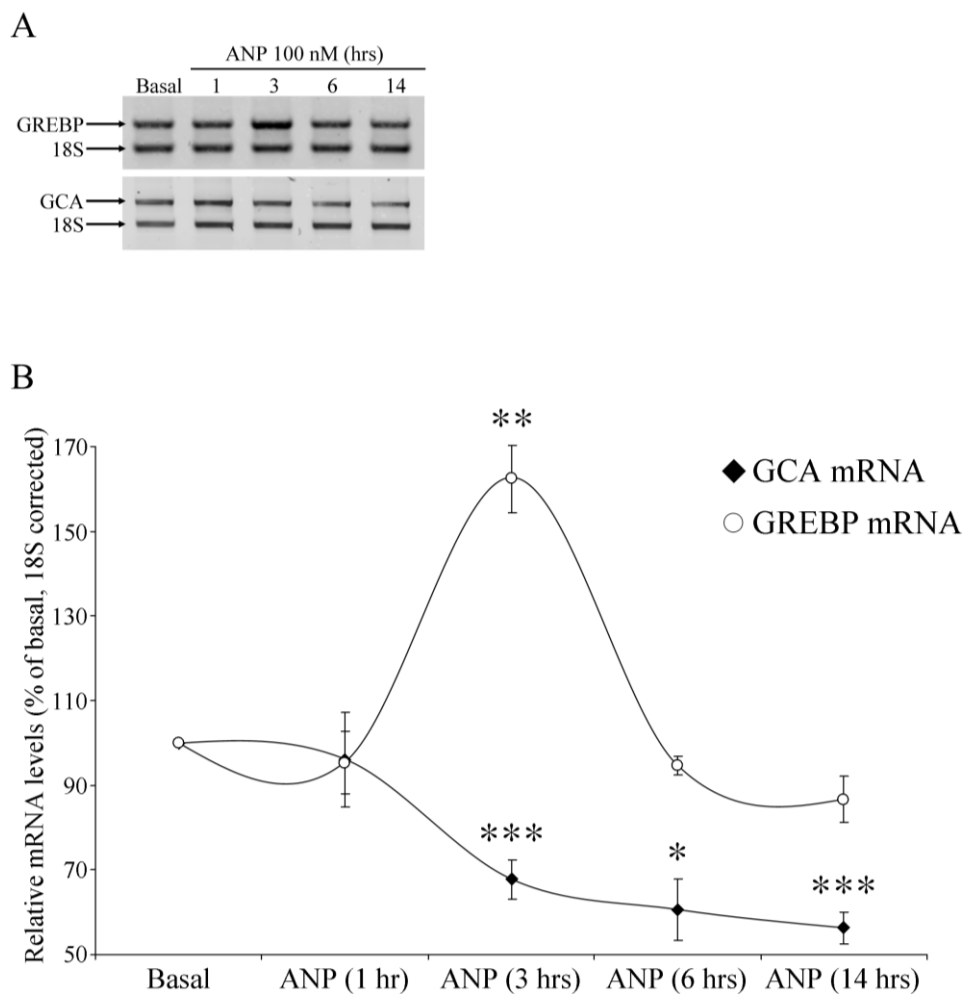


Figure 4.6 Des cellules NCI-H295R ont été stimulées avec 100 nM d'ANP ou le véhicule pour 1, 3, 6, et 14 heures (en A, résumé des résultats de sqRT-PCR et représentation graphique en B). Une stimulation de 3 heures à l'ANP provoque une hausse importante de l'expression de *grebp* tout en inhibant celle de *npr1/gca*. Les moyennes \pm SEM sont représentées relativement à l'état basal après stimulation à l'ANP (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Figures tirées de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Chapitre 5

Les polymorphismes, les partenaires et la distribution tissulaire de GREBP

5.1 Introduction au chapitre

Les chapitres précédents ont décrit les étapes menant à la découverte d'une protéine liant le cGMP-RE présent dans le promoteur du gène *npr1/gca*. Il a été démontré que GREBP est une protéine nucléaire qui peut contrôler négativement l'activité transcriptionnelle du promoteur de *npr1/gca* et qui est largement impliquée dans la voie de signalisation de l'ANP. Ce chapitre approfondi l'étude de GREBP en analysant sa distribution et les conséquences potentielles des variations de certaines composantes de GREBP chez l'humain. L'investigation au niveau tissulaire d'individus pourrait clarifier le rôle de GREBP. Nous avons cherché à connaître les protéines partenaires de GREBP par criblage d'une banque d'ADNc de cœur humain. Le séquençage de GREBP a permis d'étudier les disparités dans 3 groupes ciblés, soit les normotendus, les hypertendus et les hypertendus avec MetS. Le processus de séquençage est la seule méthode permettant de déceler des variations génomiques de GREBP puisque son gène ne figure sur aucune biopuce d'ADN.

5.2 Méthodologie

5.2.1 Analyse de l'expression de *grebp* chez l'humain

Une membrane d'expression regroupant une variété de tissus humains (Multiple Tissue Expression array, MTE) a été achetée de la compagnie Clontech. La membrane a été produite à partir d'échantillon d'ARNm provenant d'un nombre inconnu de fœtus (18 à 30 semaines) et de sujets normaux (15 à 66 ans). Un fragment de 350-bp correspondant à la séquence codante de *grebp* a été généré par PCR en utilisant les amorces sens 5'-CGCCGGATCCATGAACCATAACCAATACTA-3' et

antisens 5'-TTGCGGCCGCTTAGCGTTGTACGGTAGAAC-3'. Ce fragment a été marqué au ^{32}P avec l'enzyme *Klenow* et hybridé sur la membrane, selon le protocole fourni par le fabricant, puis exposée 16 heures afin de distinguer les taux de GREBP à l'aide du Typhoon PhosphoImager.

5.2.2 Criblage par double hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de cœur humain

Une banque d'ADNc de cœur humain a été clonée et transformée en utilisant le plasmide pACT2, conférant à la souche de levure Y187 la capacité de croître dans un milieu dépourvu de leucine. Le criblage de cette banque a été réalisé en utilisant le *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech) avec la protéine GREBP comme appât. Brièvement, la séquence codante de *grebp* a été amplifiée par PCR et clonée aux sites BamHI/PstI dans le plasmide pGBKT-7 en utilisant les amorces sens 5'-TTGGATCCTTATGAACCATAACCAATAC-3' et antisens 5'-TTCTGCAGTTAGGGTTGTACGGTC-3' afin de produire le plasmide pGBKT7-GREBP. Ce plasmide a été introduit par transformation dans la souche de levure AH109 pour générer la souche AH109-pGBKT7-GREBP en mesure de croître dans un milieu dépourvu de tryptophane. Le criblage s'est réalisé par la fusion (*mating*) des deux souches de levure en les incubant 20 heures à 30°C avec légère agitation dans un milieu riche en nutriments. Les levures fusionnées ont été sélectionnées pour leur capacité à croître dans un milieu très sélectif dépourvu en leucine, d'histidine, d'adénine et de tryptophane. Les levures ont été étalées sur 60 plaques de 150 mm et incubées pendant 5 jours à 30°C. Les colonies ont alors été récoltées et classées selon leur rang d'expression du β -gal. Il s'agit de la même technique utilisée au point 2.2.1,

quantifiant la force d'interaction entre l'appât et le clone codé par la banque. Après le classement, les plasmides ont été extraits des levures et transformés dans des bactéries compétentes DH5 α . Les bactéries ayant incorporé le plasmide pACT2 de la banque d'ADNc ont été sélectionnées avec un milieu contenant de l'ampicilline (50 μ g/mL). Les plasmides pACT2 ont été purifiés et séquencés avec les amorces sens 5'-TACCCATACGATGTTCCAGA-3' et antisens 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3'.

5.2.3 Co-immunoprécipitation du partenaire de GREBP

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide pCDNA1-Neo ou pCDNA1-Neo-GREBP-HisTag et incubées pendant 24 heures. Les cellules ont été lavées et récoltées avec du 1X PBS froid. Les extraits cellulaires ont été préparés par incubation 30 minutes à 4°C dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5 deoxycholate de sodium, 1X Complete mini) puis centrifugés 10 minutes à 12000g. Les surnageants ont été incubés avec 1 μ g d'anticorps anti-His (SC-803) durant 2 heures à 4°C avec une légère agitation. Les complexes anticorps-protéines ont été récupérés par l'ajout de 60 μ L de protéine A sépharose 6MB (GE Healthcare) durant 1 heure à 4°C avec une légère agitation, centrifugés 10 minutes à 500 g puis lavés 4 fois avec un tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1X Complete mini). Les protéines obtenues ont été séparées par électrophorèse et révélées par immuno-buvardage en utilisant 20 μ L de résine diluée. Le protocole général d'immuno-buvardage est identique à celui de la section 3.2.2, sauf pour les anticorps utilisés. Contre GREBP-HisTag, l'anticorps primaire utilisé est le Hisprobe (SC-803, 1/1500) et l'anticorps secondaire anti-lapin

provient de la chèvre (SC-2004, 1/5000). Pour la sous-unité F du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique (eIF3F), l'anticorps primaire est l'anti-eIF3F (SC-30247, 1/2000) et l'anticorps secondaire asinien est produit contre la chèvre. (SC-2020, 1/5000).

5.2.4 Séquençage du gène *grebp*

Le gène *grebp* a été séquençé à partir d'ADN génomique de patients provenant d'une cohorte ciblée par notre laboratoire. Les échantillons d'ADN ont été recueillis selon le phénotypage des individus. Trois groupes d'âge moyen ont été formés, soit des sujets normotendus, des sujets hypertendus et des sujets hypertendus avec MetS. L'ADN a été amplifié par PCR en utilisant 100 ng d'ADN génomique avec les amorces sens 5'-ATCCCCTGGCCCAACCCGTC-3' et antisens 5'-GGTAGGAGTAGCGTGGTAAG-3'. La polymérase *DeepVent DNA Polymerase* (New England Biolab, Pickering, Ont, Canada) a été utilisée selon les recommandations du fabricant. Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et purifiés à l'aide de colonnes *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Les amplicons ont été séquençés par le Centre d'Innovation Génome Québec avec les amorces utilisées pour l'amplification.

5.3 Résultats

5.3.1 Profil d'expression de *grebp* chez l'humain

L'ANP engendre une multitude d'effets biologiques en se liant à son récepteur. Nous avons étudié la distribution de l'expression de *grebp* chez l'humain afin de relier son expression aux profils connus de l'expression de l'*anp* et de *npr1/gca*. Nous avons donc utilisé une membrane commerciale MTE contenant 75 échantillons d'ARN provenant de tissus normaux d'adultes et de fœtus. L'analyse a montré que l'expression de *grebp* est plus élevée chez l'adulte que chez le fœtus et que, parallèlement à l'*anp*, *grebp* est principalement exprimé dans les oreillettes, les ventricules, le septum intraventriculaire et l'apex du cœur (Figure 5.1).

Le profil de l'expression de *grebp* chez l'humain

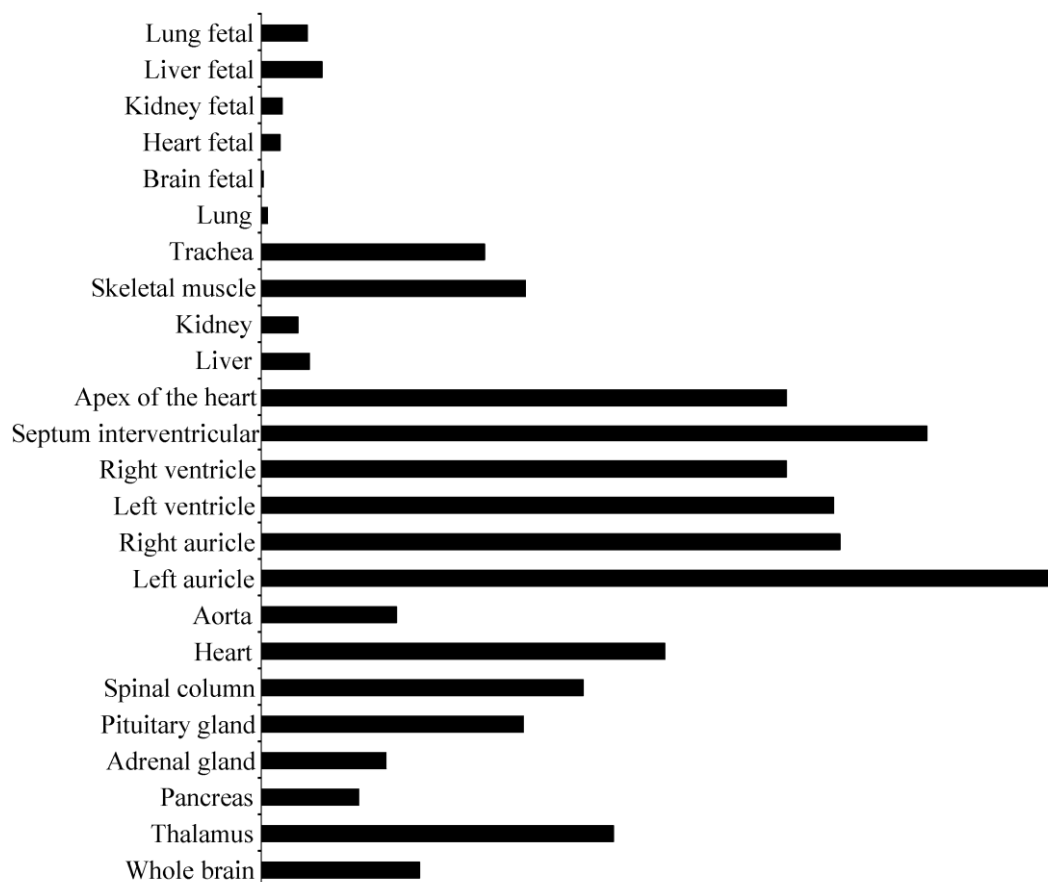


Figure 5.1 La membrane commerciale d'expression de tissus humains (MTE; Clontech) est composée d'échantillons provenant de sujets normaux (hommes/femmes) de 15 à 66 ans, décédés de façon soudaine ou accidentelle, et les tissus fœtaux proviennent de fœtus âgés de 18 à 30 semaines. GREBP est omniprésent et surtout fortement exprimé dans les structures du cœur de l'adulte. Figure tirée de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

5.3.2 Recherche des partenaires de GREBP

Le criblage par double hybride chez la levure de la banque de cœur humain a fourni très peu de données. Parmi les 5 clones obtenus, 1 seul s'est avéré être un réel transcrit. Les 4 autres clones se sont avérés être des faux positifs car l'analyse des séquences a démontré que les protéines produites ne respectaient pas le cadre de lecture correspondant à leur région codante. Ainsi, l'unique clone a aussi été celui en mesure d'activer le gène rapporteur de façon plus importante avec un pointage β -gal de 5.1 unités (versus 4.6, 2.4, 1.6 et 0.11 unités pour les 4 autres clones). Cette protéine qui interagit avec GREBP chez la levure a été isolée, son insert séquencé et identifié comme étant la sous-unité F du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique (EIF3F, *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F*). Il s'agit d'un gène (id: 8665) situé sur le chromosome 11 et codant pour une protéine de 47 kDa.

Bien que la méthode du double hybride chez la levure soit une technique fiable, la nécessité de confirmer les résultats des interactions protéine-protéine est essentielle. Afin de valider l'interaction GREBP-eIF3F, nous avons effectué des expériences de co-IP en utilisant la version étiquetée GREBP-HisTag. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide pcDNA1-Neo-GREBP-HisTag ou pcDNA1-Neo comme contrôle. 24 heures après la transfection, les extraits cellulaires ont été préparés et la co-IP a été réalisée tel que décrit à la section 5.2.3. En utilisant l'anticorps contre l'étiquette His, nous avons non seulement été en mesure d'isoler GREBP-HisTag, mais aussi de confirmer son interaction avec la protéine eIF3F

(Figure 5.2). L'absence de eIF3F dans les extraits des cellules transfectées avec le plasmide contrôle pCDNA1-Neo nous assure que l'interaction est spécifique.

Co-immunoprécipitation de eIF3F et GREBP dans des cellules HEK293

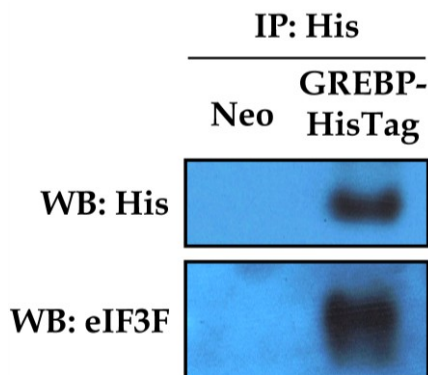


Figure 5.2 Des cellules HEK293 ont été transfectées avec pcDNA1-Neo ou pcDNA1-Neo-GREBP-HisTag. La co-IP a été faite en utilisant des extraits cellulaires totaux et les protéines ont été immunoprécipitées en utilisant l'anticorps contre l'étiquette His. L'immuno-buvardage a révélé la protéine GREBP-HisTag et la protéine eIF3F uniquement dans la fraction GREBP-HisTag.

5.3.3 Variations de la séquence *grebp*

L'analyse des variations du transcrit de GREBP à l'aide de la base de données des SNP de NCBI a révélé la présence de 24 SNP potentiels dans le gène *grebp* (Tableau V). Même si la distribution des SNP dans la population est inconnue, nous pouvons assurément prétendre qu'un SNP situé dans la région codante du gène aurait un impact significatif sur la structure et la fonction de la protéine alors qu'un SNP situé dans une région non traduite pourrait affecter la stabilité de l'ARNm. Cependant, ces

hypothèses restent à confirmer puisque les phénotypes des individus composant la banque de données de NCBI ne sont pas connus. Nous ne pouvons donc pas associer directement un polymorphisme à un phénotype donné.

Polymorphismes de la séquence de *grebp*: la base de données de NCBI

Polymorphism	SNP Ref. Number	Gene position (bp)	Gene region	A.A. variation
A/G	rs41485244	321	Coding	Ser /Gly
A/G	rs9701779	352	Coding	Tyr /Cys
C/T	rs8179414	378	Coding	Pro /Ser
C/T	rs6594029	384	Coding	Pro/ Ser
C/G	rs55668158	397	Coding	Thr /Arg
C/T	rs9701055	411	Coding	His /Tyr
C/T	rs7349151	432	Coding	Leu /Phe
C/T	rs6594030	442	Coding	Thr /Ile
C/T	rs7349153	468	Coding	Leu /Phe
A/G	rs9283150	486	Coding	Ser /Gly
A/G	rs6594031	519	Coding	Thr/ Ala
C/T	rs7416152	569	Coding	Silent
A/G	rs9782892	574	Coding	Asn/ Ser
C/G	rs55982362	577	Coding	Ser /Cys
C/T	rs56211662	594	3'UTR	N/A
C/T	rs9326619	845	3'UTR	N/A
A/G	rs7411575	876	3'UTR	N/A
C/T	rs55973403	910	3'UTR	N/A
C/T	rs7417504	912	3'UTR	N/A
C/T	rs9283151	951	3'UTR	N/A
A/G	rs6421778	996	3'UTR	N/A
A/G	rs6421779	999	3'UTR	N/A
C/T	rs7340021	1016	3'UTR	N/A
A/G	rs6421780	1023	3'UTR	N/A

Tableau V. Compilation des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) retrouvés dans le gène *grebp*. L'analyse des SNP du transcrit de GREBP a été effectuée à l'aide de la base de données *NCBI SNP database*. Les résultats montrent le polymorphisme, le numéro de SNP, la position sur le gène, la région du gène, ainsi que la variation des acides aminés (A.A.). Les nucléotides et acides aminés en gras représentent les

résultats provenant de notre séquence originale. Tableau tiré de Martel G., Hamet P., Tremblay J. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 20926-20939.

Nous avons consécutivement cherché des variations dans la séquence de *grebp* chez des individus dont nous connaissions les phénotypes. Ainsi, le séquençage de l'ADN génomique des patients de la cohorte formée d'individus du Saguenay Lac-Saint-Jean a permis de déceler des variations intéressantes. Aux fins de comparaison, nous considérons que la séquence de référence de *grebp* est la nôtre, et identique à celle disponible dans la banque génomique de NCBI. En comparant manuellement cette séquence avec les résultats des séquençages, nous pouvons détecter les variations en nucléotides et, s'il y a lieu, en acides aminés. Le groupe normotendu possède peu de variations du gène de *grebp*, soit seulement 6 SNP. Uniquement deux personnes (30612, 30525) possèdent un SNP pouvant causer un changement dans la séquence de la protéine et le patient 30525 possède en plus une hétérozygotie A/T en position nucléotidique 330 causant le changement de la sérine 29 en thréonine. La modification détruit un site de phosphorylation sérine qui n'est pas remplacé par la thréonine. Théoriquement, la sérine 29 a une probabilité de phosphorylation de 0.974/1 (section 2.3.3, tableau II) alors que la valeur passe à 0.097/1 pour la thréonine en position 29. Le patient 30279 possède lui aussi une hétérozygotie A/T transformant le tryptophane 86 en arginine. Le tableau VI résume les phénotypes et les SNP retrouvés dans le groupe d'individus normotendus.

Polymorphismes de la séquence de *grebp*: les normotendus du SLSJ

Patient # sexe H/F	Age (ans)	Pression systolique (mmHg)	Pression diastolique (mmHg)	IMC (kg/m ²)	Variation (nucléotide; acide aminé)
30612-F	48	126	72	24.4	A273G; Ile10Val
30498-F	37	100	62	21.1	
30618-H	29	114	80	21.1	
30595-F	33	101	63	21.2	
30605-H	56	103	68	23.5	
30607-F	55	105	66	22.9	
30524-F	48	108	70	19.7	T967C
30525-H	43	129	74	23.7	C276A; 330 A/T; Leu11Ile Ser29Thr
30279-H	51	113	83	23.3	501 A/T; Trp86Arg
31047-H	44	110	64	19.2	
moy ± SEM	44.4 ± 2.9	110.9 ± 3.1	70.2 ± 2.3	22.0 ± 0.6	

Tableau VI. Le groupe des personnes normotendus a une pression systolique et diastolique normale, ainsi qu'un indice de masse corporelle reflétant un poids santé. Les variations de *grebp* par rapport à la séquence de référence sont peu fréquentes, avec 6 SNP dont 2 homozygoties et 2 hétérozygoties affectant les acides aminés, ainsi que 2 SNP situés dans la région 3'UTR. La moitié des SNP répertoriés se retrouvent chez le sujet 30525 et le changement Ser29Thr affecte un site possiblement phosphorylable.

Le groupe des sujets hypertendus possède énormément de variations dans le gène de *grebp*, soit un total de 18 SNP. Seulement deux individus, 30333 et 30122, ne possèdent aucun SNP dans leur séquence. Les autres individus ont de 1 à 3 SNP en commun. Il est intéressant de constater que nous avons détecté la présence, chez 5 personnes, de la variation A445G qui transforme la lysine 67 en arginine. La transformation de cette lysine en arginine affecte l'environnement entourant la thréonine 66. Ainsi, la probabilité de phosphorylation de la thréonine 66 passe de 0,903/1 à 0,512/1 selon les algorithmes disponibles (286). La baisse de probabilité de phosphorylation est théorique et devra être prouvée en laboratoire. Cependant, nous pouvons anticiper un effet direct sur la phosphorylation de GREBP. Une autre variation pouvant aussi affecter le taux de phosphorylation de la protéine est l'hétérozygotie du nucléotide 330 (A/T) qui cause le changement de la sérine 29 en thréonine. Pareillement au patient normotendu 30525, le changement Ser29Thr perturbe le site de phosphorylation. La variation du nucléotide 276 (A/C) provoque le changement Leu11Ile. Un fait très intéressant dans le groupe des sujets hypertendus est la fréquence élevée de la combinaison des SNP 445, 675 et 694. En effet, les individus 30370, 30337 et 30385 possèdent les SNP 445, 675 et 694, tandis que le sujet 30454 possède les SNP 445 et 675. Le tableau VII résume les phénotypes et les SNP pour les individus du groupe des personnes hypertendus.

Polymorphismes de la séquence de *grebp*: les hypertendus du SLSJ

Patient # sexe H/F	Age (ans)	Pression systolique (mmHg)	Pression diastolique (mmHg)	IMC (kg/m ²)	Variation (nucléotide; acide aminé)
30370-H	40	142	97	28.5	A445G; Lys67Arg
30469-F	53	130	70	17.6	G574A; Ser110Asn
30138-F	42	146	98	20.7	A445G; Lys67Arg
30333-H	38	133	84	25.4	G675A
30545-H	56	143	82	24.7	330 A/T; Ser29Thr
30337-F	34	147	90	22.8	A445G; Lys67Arg
30385-H	54	176	111	26.6	A445G; Lys67Arg
30122-F	51	165	90	23.7	A694G
30430-H	48	155	89	21.7	A445G; Lys67Arg
30250-F	50	152	93	23.2	A694G
					G786A
					G786A
moy ± SEM					
	46.6 ± 2.4	148.9 ± 4.4	90.4 ± 3.4	23.5 ± 1.0	

Tableau VII. Le groupe des sujets hypertendus possède des pressions systolique et diastolique élevées, mais un indice de masse corporelle reflétant un poids santé. Les variations de *grebp* par rapport à la séquence de référence sont élevées avec 18 SNP, dont 6 homozygoties et 2 hétérozygoties affectant les acides aminés, ainsi que 10 SNP situés dans la région 3'UTR. Notez la combinaison des SNP 445 et 675 qui se retrouve chez 4 individus. De plus, les variations 330 et 445 affectent des sites potentiellement phosphorylables.

Le groupe des sujets hypertendus avec MetS possède quelques variations dans le gène de *grebp*, mais peu de changements dans la composition de la protéine. En effet, 3 SNP affectant 4 individus entraînent une variation protéique. Le SNP A352G change la tyrosine en cystéine chez les individus 30604 et 30237 alors que le sujet 30090 possède une hétérozygotie A/T en position nucléotidique 501 causant un changement tryptophane 86 en arginine. Le seul polymorphisme en mesure d'avoir un impact sur le taux de phosphorylation de GREBP est la variation A445G de l'individu 30196 qui change la lysine 67 en arginine. Les autres SNP se retrouvent dans la région 3'UTR et n'affectent pas la composition en acides aminés de la protéine. Le tableau VIII résume les phénotypes et les SNP pour les individus du groupe hypertendu avec MetS.

Polymorphismes de la séquence de *grebp*: les hypertendus avec MetS du SLSJ

Patient # sexe H/F	Age (ans)	Pression systolique (mmHg)	Pression diastolique (mmHg)	IMC (kg/m ²)	Variation (nucléotide; acide aminé)
30604-H	21	154	100	39.8	A352G; Tyr36Cys C693T
30578-F	38	134	97	47.9	G985A
30484-H	57	159	90	34.4	G985A
30347-F	64	155	101	35.4	G985A
30447-H	61	160	90	38.5	
30237-F	69	155	90	36.9	A352G; Tyr36Cys C693T
30286-F	47	160	100	33.0	
31078-H	44	138	77	37.8	
30090-H	44	154	87	34.0	501 A/T; Trp86Arg
30198-F	61	160	90	35.0	A445G; Lys67Arg
moy ± SEM	50.6 ± 4.6	152.9 ± 2.9	92.2 ± 2.4	37.2 ± 1.4	

Tableau VIII. Le groupe des sujets hypertendus avec syndrome métabolique (MetS) a des pressions systolique et diastolique élevées, ainsi qu'un niveau d'obésité de classe II. Les variations de *grebp* par rapport à la séquence de référence sont de fréquences modérées avec 9 SNP, dont 3 homozygoties et 1 hétérozygotie affectant les acides aminés, ainsi que 5 SNP situés dans la région 3'UTR. La variation 445 affecte un site potentiellement phosphorylable.

Chapitre 6

Discussion

Puisque le récepteur NPR1/GCA joue un rôle primordial dans la transduction des effets biologiques de l'ANP en contrôlant la natriurèse, la diurèse, la vasodilatation et la lipolyse, une meilleure compréhension de ses mécanismes de régulation est essentielle afin de décrypter les pathologies associées à ce système. Les taux d'ARNm et de protéines du récepteur NPR1/GCA sont principalement contrôlés par deux voies. La désensibilisation implique la perte de la fonction cyclase du récepteur après la stimulation par son ligand, l'ANP. Ce mécanisme a été décrit dans divers modèles et est le thème principal de plusieurs groupes de recherche. Suite à cette désensibilisation, efficace à court terme seulement, suit l'inhibition transcriptionnelle, une voie s'établissant à plus long terme et affectant les taux d'ARNm du gène. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois dans les années 90 et implique des contrôles au niveau du promoteur du gène *npr1/gca*.

Notre groupe a démontré l'existence d'un cGMP-RE situé dans la région -1500-bp du promoteur du gène *npr1/gca* de l'humain, du rat et de la souris (127). Ce court élément médie l'inhibition transcriptionnelle du récepteur NPR1/GCA après la stimulation des cellules avec de l'ANP ou un analogue du cGMP. Nous avons donc entrepris de trouver la, ou les protéines liant le cGMP-RE. Nous avons ainsi identifié une protéine liant le cGMP-RE et contrôlant l'expression du *npr1/gca*. Cette découverte a d'ailleurs fait l'objet d'une publication récente qui se retrouve en annexe II (293).

C'est à l'aide du système du simple hybride chez la levure, et en utilisant le cGMP-RE comme appât, que nous avons pu cribler une banque de ADNc de rein humain et

obtenir un clone produisant une protéine liant fortement le cGMP-RE. Ce clone code pour une petite protéine dont la fonction était inconnue et que nous avons nommé GREBP pour *cGMP-Response-Element-Binding-Protein*. Son gène est localisé sur le chromosome 1 humain (1p36.33) près du locus du gène de l'*anp* (1p36.21). Il est aussi intéressant de noter que plusieurs gènes ayant des interactions croisées se retrouvent à proximité des mêmes régions chromosomiques. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que, au cours de l'évolution, les gènes *grebp* et *anp* ont migré ensemble étant donné leur forte interrelation, comme le cas des gènes des *paraoxonases 1* et *2* (294). L'ARNm de GREBP est transcrit et polyadénylé en un seul exon de 1083-bp qui ne subit aucun épissage. Des concentrations élevées de cGMP inhibent la maturation et l'épissage des ARNm. Une phosphorylation du facteur d'épissage SF1 par PKG empêche l'assemblage des complexes de pré-épissages (*pre-spliceosomes*) (295). Ainsi, l'inhibition des mécanismes responsables de l'épissage n'aurait aucun effet sur l'ARNm de GREBP et la protéine pourrait aisément atteindre ses cibles. L'absence de cette modification post-transcriptionnelle renforce l'hypothèse selon laquelle GREBP est impliqué dans la voie du cGMP. Un fait intéressant à propos de cet ARNm est la présence à l'extrémité 3'UTR de 2 séquences ARE contribuant à la dégradation des ARNm. Ces éléments sont des déterminants de l'instabilité de l'ARNm de plusieurs gènes à réponse rapide (*early-response-gene*) (296). Un contrôle efficace des gènes est essentiel lorsque les conditions intra-cellulaires changent rapidement. Comme les concentrations de cGMP varient constamment sous l'influence des enzymes de synthèse et de dégradation, les boucles de rétro-inhibition doivent compter sur des voies de signalisation rapides et efficaces. Une autre découverte au sujet de la séquence de *grebp* est sa forte

concentration en SNP potentiels. En effet, le transcrit de GREBP, long de 1083-bp, contient 24 SNP selon la banque de données de NCBI. Cependant, la distribution allélique n'est pas encore disponible pour ces variations. La région 5'UTR ne contient aucun SNP, probablement due à une importante interaction de cette région avec des protéines régulatrices. La présence de SNP peut provoquer un changement de conformation de la structure secondaire de l'ARNm et ainsi inhiber la liaison des facteurs de traduction sur le transcrit. La région codante contient 14 SNP perturbant la structure de la protéine. Ainsi, certaines de ces variations peuvent affecter le volume de l'acide amine (Leu↔Phe), sa charge (His↔Tyr), la structure secondaire de la protéine (Pro↔Ser) et le contenu en phosphates en détruisant ou en créant un site de phosphorylation. Les SNP situés en 3'UTR pourraient avoir un impact sur la stabilité de l'ARNm et sa demi-vie. Ces polymorphismes devront faire l'objet d'études ultérieures. Néanmoins, le séquençage de l'ADN des sujets provenant de la cohorte du SLSJ établie par notre groupe a montré des différences intéressantes. En effet, lorsqu'on sépare les individus selon leurs phénotypes, le groupe de patients hypertendus possède beaucoup plus de variations dans la séquence de *grebp* que le groupe normotendu ou hypertendu avec MetS. 60% des sujets hypertendus possèdent au moins un SNP important et 5 d'entre eux partagent la même variation A445G qui affecte un site de phosphorylation potentiel. De plus, 3 de ces sujets possèdent aussi les variations G675A et A694G suggérant l'existence d'un QTL associé à l'hypertension. Un séquençage génomique à grande échelle serait à envisager pour confirmer ces résultats et s'assurer qu'ils n'ont pas été obtenus par le fruit du hasard. Le groupe des sujets hypertendus avec MetS ne possède pas les variations identifiées dans le groupe des sujets hypertendus et a des caractéristiques différentes, ce qui en

fait un groupe bien distinct. L'hypertension du groupe des sujets avec MetS n'est donc pas causée par des mutations du gène de *grebp*. Ces patients sont obèses et la conséquence majeure de l'obésité sur le système des NP est le faible ratio NPRA/NPRC, entraînant une clairance accrue des NP (219). C'est plutôt la clairance défaillante des NP qui serait la cause de l'hypertension dans ce groupe. Cette situation confirme que l'hypertension est une maladie complexe qui se manifeste par l'effet combiné de plusieurs gènes, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement. Ainsi, le trait n'est ni purement génétique ni purement environnemental et ce phénomène doit être pris en compte dans les analyses futures.

L'étude de la séquence en acides aminés obtenus par la traduction théorique du transcrit de GREBP nous laisse entrevoir de nouvelles fonctions possibles. En effet, la forte proportion d'acides aminés basiques est représentative d'une protéine liant l'ADN (297;298). La voie ANP-NPR1/GCA mène à l'activation de la PKG par le cGMP et à la phosphorylation de protéines en aval. La PKG est une kinase de sérine et thréonine. L'analyse de la séquence protéique de GREBP a permis de déceler des sites potentiels de phosphorylation sérine/thréonine (section 2.3.2, tableau II). La reconnaissance par la PKG est spécifique et la séquence consensus est une suite composée d'arginines, de lysines et d'un acide aminé autre précédent le site de phosphorylation ((R-K)_n-X-S/T-X) (286). La sérine 71 est l'unique résidu possédant l'environnement minimal requis à la reconnaissance par la PKG (KRK-P-S-P). Les algorithmes ont aussi identifiés la PKG comme étant responsable de la phosphorylation de Ser71, mais ces prédictions devront être prouvées en laboratoire. Plusieurs voies de signalisation sont contrôlées par la phosphorylation de protéines

sur un seul résidu. Il serait donc probable que le cGMP puisse activer/inhiber GREBP par phosphorylations causées par la PKG.

Les essais de CHIP ont montré que GREBP lie le cGMP-RE présent dans le génome humain et, qu'en plus, cette interaction ADN-protéine pouvait se faire dans des conditions physiologiques. Nous avons aussi démontré que GREBP est la protéine clé d'un complexe de liaisons probablement beaucoup plus grand. En effet, dans nos expériences de EMSA, l'ajout d'anticorps dirigé contre une version étiquetée de GREBP inhibe sa capacité de lier le cGMP-RE seulement lorsque cet anticorps est ajouté avant la sonde radioactive. Ce phénomène a été observé et validé par plusieurs groupes pour des protéines liant l'ADN (299;300). Autre point intéressant, l'ajout de l'anticorps après le cGMP-RE radioactif a eu peu d'effet sur la formation du complexe ADN-GREBP. Une telle dynamique peut s'expliquer par le fait que GREBP pourrait soit changer de conformation après sa liaison avec l'ADN, agir en tant que complexe multi-protéique ou même homo-multimériser autour du cGMP-RE. Des études supplémentaires sont nécessaires avant de confirmer le mécanisme d'interaction entre GREBP et l'ADN.

Nos expériences *in vitro* de liaison à l'ADN et de EMSA ont montré que GREBP lie spécifiquement le cGMP-RE de l'humain. Nous avons initialement observé que GREBP lie les cGMP-RE de 18-bp de l'humain et du rat, mais non de la souris. Malgré l'homologie très forte entre les sondes de rat et de souris, les expériences de EMSA utilisant ces sondes ont donné des résultats surprenants. De fait, un seul nucléotide diffère entre le cGMP-RE du rat et de la souris alors qu'il existe 5 de ces

disparités entre le rat et l'humain. Aussi, le nucléotide murin se retrouve aussi chez l'humain. Nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'interaction entre GREBP et le cGMP-RE de la souris n'est pas due à la différence d'un seul nucléotide, mais provient de la conformation tridimensionnelle de la sonde. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons synthétisé des cGMP-RE plus longs (24-bp) correspondant aux séquences de l'humain, du rat et de la souris telles que définies par Hum D *et al.* (127). Nous avons observé que GREBP se lie au cGMP-RE de 24-bp de l'humain. Des sondes plus longues peuvent prendre des conformations différentes (conformation A, B et Z, enroulée ou linéaire) à mesure que le nombre de bp augmente. Par conséquent, la différence de liaison entre les deux sondes de rat de 18- et de 24-bp peut facilement être expliquée par les différentes conformations adoptées par ces sondes. Des mutations n'ont pas permis de rétablir les liaisons des sondes de rat/souris de 24-bp (P1 et P2).

Nous n'avons pas trouvé de protéine homologue à GREBP dans le génome de la souris et du rat. Plusieurs faits peuvent expliquer l'absence de *grebp* dans le génome de ces modèles biologiques et génétiques. Le contrôle transcriptionnel est différent entre les rongeurs et les humains. Ils sont souvent bien plus évolués et complexes chez l'humain. Dans le cas de NPR1/GCA, le 5'UTR est plus court et le promoteur ne contient pas d'élément Inr (116). En se basant sur le fait que les cellules de rat et de souris peuvent aussi inhiber la transcription de *npr1/gca*, nous pouvons affirmer qu'une protéine ayant un rôle similaire existe très certainement chez ces rongeurs. En fait, *grebp* semble présent chez une seule autre espèce au génome connu soit, le chimpanzé. L'humain et le chimpanzé partagent une proportion très élevée de leur

génomique. En effet, l'ARNm humain de l'ANP (NM_006172) est long de 845-bp et est homologue à 98% des 844-bp de l'ARNm de l'ANP du chimpanzé (NM_006468). Même si le gène de *npr1/gca* n'a pas encore été défini chez le chimpanzé, une région (NW_001229599.1) de ce génome est homologue à 99% pour 4062-bp des 4246-bp de l'ARNm humain de NPR1/GCA (NM_000906). Ces 2 gènes, *anp* et *npr1/gca*, sont co-localisés sur le chromosome 1 de l'humain et du chimpanzé. Par comparaison génomique, nous avons identifié un équivalent du gène de *grebp* chez ce primate. Ce gène possible est aussi localisé sur le chromosome 1 (NW_001229478.1) et possède 89% d'homologie de séquence avec *grebp* humain. La séquence protéique de GREBP du chimpanzé semble posséder les mêmes caractéristiques que son pendant humain. Le gène hypothétique de *grebp* du chimpanzé code une protéine de 113 acides aminés, homologue à celle de l'humain à 82%, de poids moléculaire de 13.2 kDa et ayant un point isoélectrique de 11.1. L'analyse de la séquence peptidique indique que la protéine contient 5 sérines (>0.750/1) et une thréonine (>0.603/1) qui peuvent être phosphorylées par une kinase sérine/thréonine, comme la PKG. Des études additionnelles sont nécessaires afin de déterminer si cette protéine hypothétique est impliquée dans la voie de signalisation de l'ANP-NPR1/GCA chez le chimpanzé. Actuellement, nous avons proposé que même si *grebp* n'est spécifique qu'à l'humain, il pourrait aussi être présent chez le chimpanzé. Il a été démontré que les facteurs de transcription/répression ont évolué différemment chez l'humain en comparaison aux autres espèces (301). Donc, *grebp* pourrait appartenir à une classe de gènes récemment apparus en rapport à l'évolution (*young genes*). Ces derniers gènes, qui normalement contrôlent l'immunité, la perception et la transduction des signaux, sont reconnus comme étant plus courts, sans intron et évoluent plus rapidement que les

gènes communs et « anciens » qui contrôlent la transcription, la traduction et la réplication de toutes les cellules eucaryotes (302). Une autre évidence que *grebp* fait partie de la classe des jeunes gènes, vient du fait que seul le génome du chimpanzé semble posséder un homologue à *grebp* et que, d'un point de vue évolutif, le chimpanzé est l'espèce se rapprochant le plus de l'humain avec une séparation datant de 4-5 millions d'années. Le fait que *grebp* soit absent du génome des animaux couramment utilisés comme modèles expérimentaux complique grandement les options de manipulations génétiques. Les études futures devront être minutieusement conçues afin de dénicher des alternatives à ce problème.

Les expériences de localisation cellulaire ont montré que GREBP s'accumule dans le noyau des cellules. Une telle compartimentation est commune aux protéines associées aux activités transcriptionnelles et une localisation nucléaire est souvent associée à une fonction de régulation génique (303;304).

Nos expériences montrent que la surexpression de *grebp* inhibe l'activité du promoteur de *npr1/gca* couplé au gène de la luciférase, et ce, de manière dose-dépendante. De plus, des cellules surréaliennes surexprimant de manière stable le gène de *grebp* ont des taux d'ARNm de NPR1/GCA plus bas que les cellules contrôles. D'ailleurs, cette inhibition causée par GREBP est entièrement médiée par le cGMP-RE tel que démontré par la perte de sensibilité du promoteur mutant (sans cGMP-RE). Dans les expériences d'ARN interférant, l'ARNi spécifiquement dirigé contre GREBP a causé une baisse de son ARNm avec des conséquences sur la quantité de transcrits de NPR1/GCA. Ainsi, une baisse de GREBP est directement associée à une

augmentation des transcrits endogènes de NPR1/GCA et une augmentation de l'activité luciférase suite à l'activation du promoteur *npr1/gca*. Nos résultats montrent que l'activité promotrice peut être augmentée par la délétion du cGMP-RE et/ou par la réduction de l'expression de *grebp*. Il existe donc une régulation réciproque et inverse entre les taux de GREBP et de NPR1/GCA.

La relation entre les différents acteurs de la voie de signalisation ANP-NPR1/GCA, et possiblement GREBP, a été complétée par des expériences de stimulation avec de l'ANP. Ainsi, une augmentation des taux endogènes de l'ARNm de GREBP a été directement liée à la stimulation des cellules par l'ANP. Nous avons montré une augmentation significative de GREBP par une stimulation de 3 heures à l'ANP, et ce, dans 2 lignées cellulaires. Cette hausse est aussi associée à une baisse simultanée et importante du transcrit de NPR1/GCA. Le déclin des ARNm de NPR1/GCA persiste après une incubation plus longue avec l'ANP, mais à une vitesse moindre que lors de la stimulation de 3 heures. Les taux de GREBP quant à eux, redescendent rapidement après la pointe atteinte à 3 heures. Une telle diminution de l'ARNm de GREBP est probablement sous le contrôle de plusieurs facteurs tels que la vitesse de dégradation du transcrit (implication des ARE), les concentrations de cGMP, les partenaires de GREBP, la réponse de NPR1/GCA, la caractéristique de gène à réponse rapide de GREBP et autres stimuli qui doivent être étudiés. Quoiqu'il en soit, nous avons démontré l'implication de l'ANP dans la régulation de l'expression des gènes de *grebp* et de *npr1/gca*. Il est important de noter que nous sommes aussi le premier groupe à confirmer l'existence de ce mécanisme de rétro-inhibition chez l'humain.

Grebp est largement exprimé dans les tissus humains tels que le cœur, le thymus, le cerveau et plusieurs glandes endocrines. Un rôle de protection pourrait expliquer sa forte expression dans le cœur. Ainsi, la surexpression cardiaque de *grebp* pourrait protéger cet organe contre une surstimulation de NPR1/GCA par l'ANP, une hormone qui normalement provoque des effets inotropiques négatifs sur le tissu cardiaque sain (305). Un effet cardiopresseur chronique serait dramatique. Par conséquent, le contrôle de l'expression de *grebp* par des mécanismes de réponses rapides et transitoires permet une régulation additionnelle de la stimulation de NPR1/GCA.

Un seul candidat positif a été identifié comme partenaire de GREBP. Ainsi, la protéine eIF3F a interagit avec GREBP dans les essais de double hybride chez la levure de même qu'*in vivo* dans les cellules HEK293. Le eIF3F est une protéine impliquée dans le complexe eIF3 et cette sous-unité agit en tant que régulateur négatif de la traduction (306). La surexpression de eIF3F induit la dégradation des ARN ribosomiaux et provoque l'apoptose (306). La perte de ce gène a aussi été observée dans des cas de mélanomes et de cancer du pancréas (307;308). Nous avons donc identifié une protéine modulatrice d'activités transcriptionnelles, GREBP, et son partenaire, eIF3F, un modulateur d'activités traductionnelles. L'implication de ces deux protéines dans le contrôle des voies de signalisation est sans contredit un sujet qui mérite d'être approfondi.

Chapitre 7

Conclusion et perspectives

En conclusion, GREBP se présente comme un nouveau facteur de répression transcriptionnel agissant sur l'unique cGMP-RE présent dans le promoteur de *npr1/gca* et contrôlant l'expression de ce récepteur majeur de l'ANP. Son gène est transcrit en un seul exon de 1083 paires de bases. Il produit une protéine nucléaire de 115 acides aminés fortement exprimée au niveau du cœur et a comme partenaire le facteur traductionnel eIF3F. Les patients hypertendus ont des séquences nucléotidique et protéique de GREBP différentes des celles des autres groupes étudiés. *Grebp* (1p33.36) est le troisième membre de la boucle de rétro-inhibition co-localisé sur le chromosome 1 avec l'*anp* (1p33.21) et *npr1/gca* (1q21-22). Certaines études pourraient être entreprises pour approfondir nos connaissances sur la fonction de ce gène nouvellement découvert.

Le mécanisme précis par lequel GREBP inhibe la transcription de *npr1/gca* est inconnu. Nous pensons que la liaison de GREBP au cGMP-RE empêche d'autres facteurs de transcription d'interagir avec le promoteur de *npr1/gca*. Des études pourraient être menées afin de déterminer si cette hypothèse est juste. Nous pourrions étudier par EMSA l'assemblage des facteurs de transcription sur une portion plus longue du promoteur de *npr1/gca*. Ainsi, la compétition entre GREBP et les facteurs de transcription généraux produirait des retards de migration différents dans le gel. Nous pourrions aussi utiliser la technique du super-déplacement (*supershift*) pour identifier le facteur de transcription impliqué dans la compétition avec GREBP. Ces expériences nous informeraient un peu plus sur le mécanisme menant à l'inhibition transcriptionnelle du gène *npr1/gca*.

En étudiant strictement GREBP, nous pourrions en analyser sa structure. Ainsi, à l'aide d'une série d'expériences *in vitro*, nous pourrions diviser la protéine en plusieurs fragments pour identifier les domaines fonctionnels. Nous pourrions localiser le domaine de liaison à l'ADN, la région de localisation nucléaire et le domaine sensible à l'ANP. Les nombreux fragments protéiques pourraient aussi être utilisés afin d'étudier une multimérisation probable de GREBP sur le cGMP-RE.

Le gène de grebp contient plusieurs SNP causant des variations en acides aminés dans la protéine. La majorité des polymorphismes associés à grebp se retrouvent dans le groupe des individus hypertendus (chapitre 5, Tableau VI, VII et VIII). Ceci permet de croire que la relation entre la composition, la structure et la fonction de la protéine est très importante dans le développement de l'hypertension. Il serait intéressant d'étudier l'impact de ces polymorphismes dans le contrôle transcriptionnel du gène *npr1/gca*. Ainsi, les variations génomiques décelées chez les individus hypertendus pourraient être recréés par mutagenèse dirigée afin d'identifier le ou les SNP causant un gain et une perte de fonction. Ces variations pourront alors être associées à un des domaines protéiques préalablement identifiés. Ceci permettra d'évaluer la conséquence des variations génomiques de grebp sur sa fonction.

Bien que le criblage par double hybride chez la levure ait donné un résultat intéressant en identifiant le facteur eIF3F comme partenaire de GREBP (section 5.3.2), la voie de signalisation ANP-NPR1/GCA nous permet d'envisager la PKG comme protéine interagissant avec GREBP. Le fait que la PKG n'ait pas été

identifiée dans les essais de double hybride indique, soit que l'interaction directe PKG-GREBP n'est pas possible ou que le tissu utilisé dans la construction de la banque d'ADNc n'offrait pas les conditions d'interaction PKG-GREBP à ce moment. La deuxième option semble être la plus plausible puisque GREBP agit très rapidement après une stimulation à l'ANP. Une méthode simple et directe de confirmer l'interaction entre GREBP et PKG serait d'exprimer ces deux protéines fusionnées à un domaine de fluorescence et d'en étudier leurs interactions par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) lors de stimulation. De plus, afin de favoriser un maximum d'interaction de GREBP avec d'autres protéines, nous devons construire notre propre banque d'ADNc à partir de cellules cardiaques stimulées par l'ANP. L'activation de la voie de signalisation ANP-NPR1/GCA-GREBP favorisera une modification des conditions intracellulaires, augmentant les probabilités que d'autres protéines interagissent avec GREBP. Le criblage par double hybride chez la levure reste la meilleure technique pour déceler les interactions protéiques et permettre de placer GREBP parmi les voies de signalisation connues.

Le rôle de PKG dans la transmission du signal jusqu'à GREBP pourrait être étudié. La surexpression et la suppression de PKG pourraient être un indicateur fiable du rôle de la kinase dans l'inhibition transcriptionnelle de *npr1/gca* par l'ANP. Un rôle de PKG dans ce mécanisme d'inhibition se traduirait par une hausse ou une baisse de la sensibilité des cellules à l'ANP. Certaines études suggèrent que PKG peut transloquer au noyau après une stimulation au cGMP (309) et nous avons montré que GREBP est une protéine nucléaire (section 3.3.3). Donc, il faudrait également approfondir et confirmer l'implication de la translocation de PKG au noyau dans l'activation ou

l'inhibition possible de GREBP. La microscopie à fluorescence permettrait d'étudier précisément la co-localisation de GREBP et PKG dans des cellules traitées avec de l'ANP.

Une autre approche d'examen des mécanismes d'action de GREBP est assurément l'étude de son promoteur et son contrôle transcriptionnel. La caractérisation de son promoteur permettrait d'identifier le ou les facteurs de transcription responsables de sa sensibilité à l'ANP et de son expression rapide et transitoire. La fusion du promoteur de grebp au gène rapporteur de la luciférase permettrait aussi de cribler des agonistes afin de déterminer si l'ANP est la seule molécule activant sa transcription. Nous pensons que le BNP, le CNP et les donneurs de NO pourraient induire la transcription de GREBP par l'augmentation des concentrations de cGMP. Ces hypothèses restent à être vérifiées.

Le génome humain possède un seul cGMP-RE localisé dans le promoteur de *npr1/gca*. L'action répressive de GREBP sur le promoteur se produit exclusivement par cet élément (voir chapitre 4). Nous ne connaissons pas d'autre gène modulé par GREBP. Toutefois, il serait possible que GREBP contrôle directement d'autres gènes. Ainsi, l'immuno-précipitation de la chromatine combinée aux biopuces d'ADN (*chip-on-chip*) permettraient d'identifier les séquences génomiques ciblées par GREBP. Cette technique est légèrement différente de celle utilisée à la section 3.2.5. L'hybridation de l'ADN obtenu par immuno-précipitation sur une biopuce permet d'étudier le génome complet. En identifiant les promoteurs, nous pourrions étudier la modulation de leur gène par GREBP.

Un autre point intéressant à étudier serait le rôle de l'interaction entre GREBP et eIF3F. Il se pourrait que l'interaction des deux protéines inhibe ou active l'une ou l'autre. La surexpression ou la suppression de eIF3F pourrait moduler GREBP se traduisant par une hausse ou une baisse de l'inhibition transcriptionnelle du promoteur *npr1/gca*. De la même manière, les taux de GREBP pourraient activer ou inhiber l'activité de eIF3F. Nous pourrions mesurer l'efficacité de traduction d'un système traductionnel *in vitro* en utilisant le facteur eIF3F et GREBP.

Ces expériences permettront de déterminer plus exactement les domaines structuraux, la voie de signalisation, la caractérisation des protéines partenaires et des mutations pouvant moduler son action répressive. Cependant, plusieurs autres études de protéomiques et de génomiques seront nécessaires afin de définir clairement le rôle de GREBP et de l'ANP dans le développement de l'hypertension et du syndrome métabolique.

Bibliographie

- (1) Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS, III. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol* 2008; 84(1):1-24.
- (2) Goldsmith SR. Baroreceptor-mediated suppression of osmotically stimulated vasopressin in normal humans. *J Appl Physiol* 1988; 65(3):1226-1230.
- (3) Thibonnier M, Berti-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R. Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog Brain Res* 1998; 119:147-161.
- (4) Thibonnier M. Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. *Regul Pept* 1992; 38(1):1-11.
- (5) Thibonnier M, Conarty DM, Plesnicher CL. Mediators of the mitogenic action of human V(1) vascular vasopressin receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(5):H2529-H2539.
- (6) Kockskamper J, Zima AV, Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(2):128-147.
- (7) Birnbaumer M. Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(10):406-410.
- (8) Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 1998; 156(2):223-229.

- (9) Schrier RW, Cadnapaphornchai MA. Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81(2):117-131.
- (10) Goldsmith SR. The effect of moderate hypotension on vasopressin levels in normal humans. *Am J Med Sci* 1989; 298(5):295-298.
- (11) Bishop VS, Hay M. Involvement of the area postrema in the regulation of sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Front Neuroendocrinol* 1993; 14(2):57-75.
- (12) Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98(1):121-128.
- (13) Hall JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 2003; 24(1):27-39.
- (14) Deschepper CF. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int* 1994; 46(6):1561-1563.
- (15) Persson PB, Skalweit A, Thiele BJ. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand* 2004; 181(4):375-381.
- (16) Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 1967; 216(5117):762-766.
- (17) Costerousse O, Allegrini J, Huang W, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme (kininase II) in cardiovascular and renal regulations and diseases. *Biol Res* 1998; 31(3):161-167.

- (18) Soubrier F, Wei L, Hubert C, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J Hypertens* 1993; 11(6):599-604.
- (19) Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(2):155-159.
- (20) Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(11):4095-4098.
- (21) Hamming I, Cooper ME, Haagsmans BL, Hooper NM, Korstanje R, Osterhaus AD, Timens W, Turner AJ, Navis G, van GH. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J Pathol* 2007; 212(1):1-11.
- (22) Koka V, Huang XR, Chung AC, Wang W, Truong LD, Lan HY. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am J Pathol* 2008; 172(5):1174-1183.
- (23) Soler MJ, Barrios C, Oliva R, Batlle D. Pharmacologic modulation of ACE2 expression. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10(5):410-414.
- (24) Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(8 Suppl B):9-20.

- (25) Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24(3):261-271.
- (26) Stanton R. Blood pressure and diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 2003; 3(6):483-484.
- (27) Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264(3):224-236.
- (28) Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, Peach MJ, Carey RM. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 1988; 254(6 Pt 2):F900-F906.
- (29) Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdos EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest* 1988; 59(6):789-797.
- (30) Ganten D, Hayduk K, Brecht HM, Boucher R, Genest J. Evidence of renin release or production in splanchnic territory. *Nature* 1970; 226(5245):551-552.
- (31) Muller DN, Hilgers KF, Bohlender J, Lippoldt A, Wagner J, Fischli W, Ganten D, Mann JF, Luft FC. Effects of human renin in the vasculature of rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension* 1995; 26(2):272-278.
- (32) Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* 2008; 93(5):528-537.

- (33) Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MA. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994; 24(1):37-48.
- (34) Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987; 59(2):59A-65A.
- (35) Lindpaintner K, Jin M, Wilhelm MJ, Suzuki F, Linz W, Schoelkens BA, Ganten D. Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation* 1988; 77(6 Pt 2):I18-I23.
- (36) Peters J, Wanka H, Peters B, Hoffmann S. A renin transcript lacking exon 1 encodes for a non-secretory intracellular renin that increases aldosterone production in transgenic rats. *J Cell Mol Med* 2008; 12(4):1229-1237.
- (37) Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86(3):747-803.
- (38) Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-876.
- (39) Ortmann J, Nett PC, Celeiro J, Traupe T, Tornillo L, Hofmann-Lehmann R, Haas E, Frank B, Terraciano LM, Barton M. Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(2):689-695.

- (40) Gray GA, Webb DJ. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 1996; 72(2):109-148.
- (41) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):730-732.
- (42) Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-735.
- (43) Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287(1-2):23-26.
- (44) Griending KK, Tsuda T, Alexander RW. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264(14):8237-8240.
- (45) Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, Kudo M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; 85(3):653-658.
- (46) Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993; 132(2):524-529.

- (47) Eguchi S, Hirata Y, Marumo F. Endothelin subtype B receptors are coupled to adenylate cyclase via inhibitory G protein in cultured bovine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S161-S163.
- (48) Kawanabe Y, Okamoto Y, Hashimoto N, Masaki T. Molecular mechanisms for activation of voltage-independent Ca²⁺ channels by endothelin-1/endothelin-A receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S219-S223.
- (49) Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992; 267(18):12468-12474.
- (50) Aramori I, Nirei H, Shoubo M, Sogabe K, Nakamura K, Kojo H, Notsu Y, Ono T, Nakanishi S. Subtype selectivity of a novel endothelin antagonist, FR139317, for the two endothelin receptors in transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 1993; 43(2):127-131.
- (51) Kawanabe Y, Okamoto Y, Miwa S, Hashimoto N, Masaki T. Molecular mechanisms for the activation of voltage-independent Ca²⁺ channels by endothelin-1 in chinese hamster ovary cells stably expressing human endothelin(A) receptors. *Mol Pharmacol* 2002; 62(1):75-80.
- (52) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328(24):1732-1739.

- (53) Nootens M, Kaufmann E, Rector T, Toher C, Judd D, Francis GS, Rich S. Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(7):1581-1585.
- (54) Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114(6):464-469.
- (55) Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85(2):504-509.
- (56) Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, Maurer G. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(3):633-641.
- (57) Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238(3):861-865.
- (58) Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 2001; 14(6 Pt 2):83S-89S.

- (59) Zeidel ML. Renal actions of atrial natriuretic peptide: regulation of collecting duct sodium and water transport. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:747-759.
- (60) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3):593-615.
- (61) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298 (Pt 2):249-258.
- (62) Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2002; 4(4):307-311.
- (63) Venema RC, Venema VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimitropoulou C, Maragoudakis ME, Catravas JD. Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2):H669-H678.
- (64) Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Bohme E. Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 1990; 190(2):273-278.
- (65) Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(1):351-357.
- (66) Zabel U, Hausler C, Weeger M, Schmidt HH. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a

- glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem* 1999; 274(26):18149-18152.
- (67) Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 1990; 265(28):16841-16845.
- (68) Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(3):696-701.
- (69) Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 1991; 292(1-2):217-222.
- (70) Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D. Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 2003; 15(2):189-195.
- (71) Behrends S, Vehse K. The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(1):64-69.
- (72) Wolin MS, Wood KS, Ignarro LJ. Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *J Biol Chem* 1982; 257(22):13312-13320.
- (73) Zhou Z, Gross S, Roussos C, Meurer S, Muller-Esterl W, Papapetropoulos A. Structural and functional characterization of the

- dimerization region of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2004; 279(24):24935-24943.
- (74) Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; 270(42):24871-24875.
- (75) Krumenacker JS, Hyder SM, Murad F. Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(2):717-722.
- (76) Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F, Catravas JD. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension* 1995; 26(4):696-704.
- (77) Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997; 100(4):942-948.
- (78) Liu H, Force T, Bloch KD. Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 1997; 272(9):6038-6043.
- (79) Papapetropoulos A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, Catravas JD. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Br J Pharmacol* 1996; 118(6):1359-1366.
- (80) Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006; 45(5):268-276.

- (81) Martel G, Hamet P, Tremblay J. Central role of guanylyl cyclase in natriuretic peptide signaling in hypertension and metabolic syndrome. *Mol Cell Biochem* 2010; 334(1-2):53-65.
- (82) de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28(1):89-94.
- (83) Anand-Srivastava MB, Srivastava AK, Cantin M. Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 1987; 262(11):4931-4934.
- (84) Anand-Srivastava MB, Trachte GJ. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 1993; 45(4):455-497.
- (85) Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(9):710-718.
- (86) Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol RV, Jewett JR, Burnier J, Henzel W, Lowe DG. Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem* 1991; 266(34):23060-23067.
- (87) Chen HH, Burnett JC, Jr. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3:S22-S28.
- (88) Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC, Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling

- the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 1988; 62(2):191-195.
- (89) Garbers DL. Guanylyl cyclase-linked receptors. *Pharmacol Ther* 1991; 50(3):337-345.
- (90) Garbers DL, Lowe DG. Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 1994; 269(49):30741-30744.
- (91) Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994; 14(5):3115-3129.
- (92) Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Cantin M, Genest J. Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(2):515-527.
- (93) Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238(4827):675-678.
- (94) Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171(2):796-803.
- (95) Potter LR, Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem* 2001; 276(9):6057-6060.

- (96) Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332(6159):78-81.
- (97) Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168(2):863-870.
- (98) Takei Y. Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129(2-3):559-573.
- (99) Thuerlauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 1994; 269(27):17772-17775.
- (100) Tremblay J, Gerzer R, Pang SC, Cantin M, Genest J, Hamet P. ANF stimulation of detergent-dispersed particulate guanylate cyclase from bovine adrenal cortex. *FEBS Lett* 1986; 194(2):210-214.
- (101) Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(15):8525-8529.
- (102) Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 1988; 66(17):752-759.
- (103) Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HS, Currie MG, Forte LR. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the

isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):F191-F197.

- (104) Forte LR, London RM, Freeman RH, Krause WJ. Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(2):F180-F191.
- (105) Thomas G, Moffatt P, Salois P, Gaumond MH, Gingras R, Godin E, Miao D, Goltzman D, Lanctot C. Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem* 2003; 278(50):50563-50571.
- (106) Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem* 2004; 279(19):19391-19395.
- (107) Bord S, Ireland DC, Moffatt P, Thomas GP, Compston JE. Characterization of osteocrin expression in human bone. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(10):1181-1187.
- (108) Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Kazda S, Neuser D. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci* 1989; 45(10):869-875.
- (109) Soualmia H, Barthelemy C, Masson F, Maistre G, Eurin J, Carayon A. Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29(5):605-611.
- (110) Itoh H, Nakao K, Yamada T, Morii N, Shiono S, Sugawara A, Saito Y, Mukoyama M, Arai H, Katsuura G, . Modulatory role of

vasopressin in secretion of atrial natriuretic polypeptide in conscious rats. *Endocrinology* 1987; 120(5):2186-2188.

- (111) Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17):7902-7906.
- (112) Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 2002; 230(1-2):31-47.
- (113) Duda T, Yadav P, Sharma RK. Allosteric modification, the primary ATP activation mechanism of atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Biochemistry* 2011; 50(7):1213-1225.
- (114) Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Bohme E. The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 1990; 266(1-2):128-132.
- (115) Kumar P, Arise KK, Pandey KN. Transcriptional regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene. *Peptides* 2006; 27(7):1762-1769.
- (116) Garg R, Pandey KN. Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression. *Peptides* 2005; 26(6):1009-1023.
- (117) Tremblay J, Huot C, Willenbrock RC, Bayard F, Gossard F, Fujio N, Koch C, Kuchel O, Debinski W, Hamet P. Increased cyclic guanosine monophosphate production and overexpression of atrial natriuretic

peptide A-receptor mRNA in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1993; 92(5):2499-2508.

- (118) Tremblay J, Hum DH, Sanchez R, Dumas P, Pravenec M, Krenova D, Kren V, Kunes J, Pausova Z, Gossard F, Hamet P. TA repeat variation, *Npr1* expression, and blood pressure: impact of the *Ace* locus. *Hypertension* 2003; 41(1):16-24.
- (119) Cahill PA, Redmond EM, Keenan AK. Vascular atrial natriuretic factor receptor subtypes are not independently regulated by atrial peptides. *J Biol Chem* 1990; 265(35):21896-21906.
- (120) Hughes RJ, Struthers RS, Fong AM, Insel PA. Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor on a smooth muscle cell. *Am J Physiol* 1987; 253(6 Pt 1):C809-C816.
- (121) Kato J, Lanier-Smith KL, Currie MG. Cyclic GMP down-regulates atrial natriuretic peptide receptors on cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1991; 266(22):14681-14685.
- (122) Kishimoto I, Nakao K, Suga S, Hosoda K, Yoshimasa T, Itoh H, Imura H. Downregulation of C-receptor by natriuretic peptides via ANP-B receptor in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265(4 Pt 2):H1373-H1379.
- (123) Roubert P, Lonchamp MO, Chabrier PE, Plas P, Goulin J, Braquet P. Down-regulation of atrial natriuretic factor receptors and correlation with cGMP stimulation in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148(1):61-67.

- (124) Zhang LM, Tao H, Newman WH. Regulation of atrial natriuretic peptide receptors in vascular smooth muscle cells: role of cGMP. *Am J Physiol* 1993; 264(6 Pt 2):H1753-H1759.
- (125) Cao L, Wu J, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* 1995; 270(42):24891-24897.
- (126) Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem* 1990; 265(15):8566-8572.
- (127) Hum D, Besnard S, Sanchez R, Devost D, Gossard F, Hamet P, Tremblay J. Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension* 2004; 43(6):1270-1278.
- (128) Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269(20):14636-14642.
- (129) Chinkers M. Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(23):11075-11079.
- (130) Kumar R, Grammatikakis N, Chinkers M. Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 2001; 276(14):11371-11375.

- (131) Potter LR, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem* 2000; 275(40):31099-31106.
- (132) Abbey SE, Potter LR. Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *J Biol Chem* 2002; 277(45):42423-42430.
- (133) Pandey KN, Nguyen HT, Sharma GD, Shi SJ, Kriegel AM. Ligand-regulated internalization, trafficking, and down-regulation of guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 2002; 277(7):4618-4627.
- (134) Rathinavelu A, Isom GE. Differential internalization and processing of atrial-natriuretic-factor B and C receptor in PC12 cells. *Biochem J* 1991; 276 (Pt 2):493-497.
- (135) Pandey KN, Nguyen HT, Garg R, Khurana ML, Fink J. Internalization and trafficking of guanylyl (guanylate) cyclase/natriuretic peptide receptor A is regulated by an acidic tyrosine-based cytoplasmic motif GDAY. *Biochem J* 2005; 388(Pt 1):103-113.
- (136) Sun JZ, Oparil S, Lucchesi P, Thompson JA, Chen YF. Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(1):L155-L163.
- (137) Kishimoto I, Yoshimasa T, Suga S, Ogawa Y, Komatsu Y, Nakagawa O, Itoh H, Nakao K. Natriuretic peptide clearance receptor is transcriptionally down-regulated by beta 2-adrenergic stimulation in

vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269(45):28300-28308.

- (138) Sun JZ, Chen SJ, Majid-Hasan E, Oparil S, Chen YF. Dietary salt supplementation selectively downregulates NPR-C receptor expression in kidney independently of ANP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(2):F220-F227.
- (139) Hartmann M, Skryabin BV, Muller T, Gazinski A, Schroter J, Gassner B, Nikolaev VO, Bunemann M, Kuhn M. Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 2008; 283(42):28313-28320.
- (140) Francoeur F, Gossard F, Hamet P, Tremblay J. Alternative splicing of natriuretic peptide A and B receptor transcripts in the rat brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995; 22(1):S172-S174.
- (141) Drewett JG, Fendly BM, Garbers DL, Lowe DG. Natriuretic peptide receptor-B (guanylyl cyclase-B) mediates C-type natriuretic peptide relaxation of precontracted rat aorta. *J Biol Chem* 1995; 270(9):4668-4674.
- (142) Lincoln TM. Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 224(1):100-107.
- (143) Rapoport RM, Waldman SA, Schwartz K, Winkquist RJ, Murad F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1985; 115(2-3):219-229.

- (144) Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:593-620.
- (145) Somlyo AP, Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 1989; 3(11):2266-2276.
- (146) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372(6503):231-236.
- (147) Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(4):1653-1657.
- (148) Hirano K, Phan BC, Hartshorne DJ. Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1997; 272(6):3683-3688.
- (149) Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, . Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1994; 269(48):30407-30411.
- (150) Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998; 17(11):3045-3051.
- (151) Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32950-32956.

- (152) Swayze RD, Braun AP. A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem* 2001; 276(23):19729-19737.
- (153) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):C799-C822.
- (154) Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, Wray D. Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(9):6135-6143.
- (155) Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1991; 40(6):923-931.
- (156) Gonzalez JM, Jost LJ, Rouse D, Suki WN. Plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and smooth muscle. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22(5-6):345-348.
- (157) Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 1996; 271(36):21933-21938.
- (158) Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex

of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 2000; 404(6774):197-201.

- (159) Nakamura M, Ichikawa K, Ito M, Yamamori B, Okinaka T, Isaka N, Yoshida Y, Fujita S, Nakano T. Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* 1999; 11(9):671-676.
- (160) Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science* 1999; 286(5444):1583-1587.
- (161) Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986; 324(6096):473-476.
- (162) Norling LL, von GT, Chevalier RL. Maturation of A71915-dependent inhibition of atrial natriuretic peptide-stimulated cyclic GMP production in isolated rat glomeruli. *Biol Neonate* 1994; 66(5):294-301.
- (163) Sano T, Morishita Y, Matsuda Y, Yamada K. Pharmacological profile of HS-142-1, a novel nonpeptide atrial natriuretic peptide antagonist of microbial origin. I. Selective inhibition of the actions of natriuretic peptides in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260(2):825-831.
- (164) Tremblay J, Gerzer R, Vinay P, Pang SC, Beliveau R, Hamet P. The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase. *FEBS Lett* 1985; 181(1):17-22.

- (165) Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987; 326(6114):697-698.
- (166) Light DB, Corbin JD, Stanton BA. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* 1990; 344(6264):336-339.
- (167) Burnett JC, Jr., Granger JP, Opgenorth TJ. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am J Physiol* 1984; 247(5 Pt 2):F863-F866.
- (168) Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15):9003-9008.
- (169) Kudo T, Baird A. Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* 1984; 312(5996):756-757.
- (170) Chartier L, Schiffrin E, Thibault G, Garcia R. Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II, ACTH and potassium in vitro and angiotensin II-induced steroidogenesis in vivo. *Endocrinology* 1984; 115(5):2026-2028.
- (171) De LéanA, Racz K, Gutkowska J, Nguyen TT, Cantin M, Genest J. Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 1984; 115(4):1636-1638.

- (172) MacFarland RT, Zelus BD, Beavo JA. High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 1991; 266(1):136-142.
- (173) Calle RA, Bollag WB, White S, Betancourt-Calle S, Kent P. ANPs effect on MARCKS and StAR phosphorylation in agonist-stimulated glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177(1-2):71-79.
- (174) Cherradi N, Brandenburger Y, Rossier MF, Vallotton MB, Stocco DM, Capponi AM. Atrial natriuretic peptide inhibits calcium-induced steroidogenic acute regulatory protein gene transcription in adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 1998; 12(7):962-972.
- (175) Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 1997; 15(4):437-442.
- (176) Dulak J, Jozkowicz A, mbinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(3):659-666.
- (177) Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2604-2609.

- (178) Hood J, Granger HJ. Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273(36):23504-23508.
- (179) Cao L, Gardner DG. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1995; 25(2):227-234.
- (180) Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1690-1697.
- (181) Itoh H, Pratt RE, Ohno M, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* 1992; 19(6 Pt 2):758-761.
- (182) Kohno M, Ikeda M, Johchi M, Horio T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 1):E673-E679.
- (183) Pedram A, Razandi M, Kehrl J, Levin ER. Natriuretic peptides inhibit G protein activation. Mediation through cross-talk between cyclic GMP-dependent protein kinase and regulators of G protein-signaling proteins. *J Biol Chem* 2000; 275(10):7365-7372.
- (184) Suhasini M, Li H, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18(12):6983-6994.
- (185) Furuya M, Yoshida M, Hayashi Y, Ohnuma N, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide is a growth

inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177(3):927-931.

- (186) Furuya M, Aisaka K, Miyazaki T, Honbou N, Kawashima K, Ohno T, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193(1):248-253.
- (187) Shinomiya M, Tashiro J, Saito Y, Yoshida S, Furuya M, Oka N, Tanaka S, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205(2):1051-1056.
- (188) Ueno H, Haruno A, Morisaki N, Furuya M, Kangawa K, Takeshita A, Saito Y. Local expression of C-type natriuretic peptide markedly suppresses neointimal formation in rat injured arteries through an autocrine/paracrine loop. *Circulation* 1997; 96(7):2272-2279.
- (189) Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, Kojima M, Kawano Y, Kangawa K. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* 2003; 144(6):2279-2284.
- (190) Kong X, Wang X, Xu W, Behera S, Hellermann G, Kumar A, Lockey RF, Mohapatra S, Mohapatra SS. Natriuretic peptide receptor a as a novel anticancer target. *Cancer Res* 2008; 68(1):249-256.
- (191) Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996; 79(4):748-756.

- (192) Suenobu N, Shichiri M, Iwashina M, Marumo F, Hirata Y. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(1):140-146.
- (193) Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3):588-594.
- (194) Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272(23):14860-14866.
- (195) Li H, Liu L, David ML, Whitehead CM, Chen M, Fetter JR, Sperl GJ, Pamukcu R, Thompson WJ. Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(9):1325-1336.
- (196) Soh JW, Mao Y, Kim MG, Pamukcu R, Li H, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB. Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):4136-4141.
- (197) Soh JW, Mao Y, Liu L, Thompson WJ, Pamukcu R, Weinstein IB. Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *J Biol Chem* 2001; 276(19):16406-16410.
- (198) Ciani E, Guidi S, Bartesaghi R, Contestabile A. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem* 2002; 82(5):1282-1289.

- (199) Zamora R, Alarcon L, Vodovotz Y, Betten B, Kim PK, Gibson KF, Billiar TR. Nitric oxide suppresses the expression of Bcl-2 binding protein BNIP3 in hepatocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(50):46887-46895.
- (200) Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283(1):R257-R265.
- (201) Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(49):48617-48626.
- (202) Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* 1998; 441:157-170.
- (203) Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:481-511.
- (204) Sarzani R, Marcucci P, Salvi F, Bordicchia M, Espinosa E, Mucci L, Lorenzetti B, Minardi D, Muzzonigro G, Ssi-Fulgheri P, Rappelli A. Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(2):259-267.
- (205) Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G, Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* 1994; 135(5):2030-2036.

- (206) Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997; 138(4):1512-1519.
- (207) Shi Y, Burn P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(8):695-710.
- (208) Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):639-672.
- (209) Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J* 2001; 15(13):2527-2529.
- (210) Garg R, Pandey KN. Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription. *Hypertension* 2003; 41(3 Pt 2):730-736.
- (211) Belo NO, Sairam MR, Dos Reis AM. Impairment of the natriuretic peptide system in follitropin receptor knockout mice and reversal by estradiol: implications for obesity-associated hypertension in menopause. *Endocrinology* 2008; 149(3):1399-1406.
- (212) Moro C, Polak J, Hejnova J, Klimcakova E, Crampes F, Stich V, Lafontan M, Berlan M. Atrial natriuretic peptide stimulates lipid mobilization during repeated bouts of endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290(5):E864-E869.
- (213) Birkenfeld AL, Budziarek P, Boschmann M, Moro C, Adams F, Franke G, Berlan M, Marques MA, Sweep FC, Luft FC, Lafontan M,

Jordan J. Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes* 2008; 57(12):3199-3204.

- (214) Perez-Matute P, Neville MJ, Tan GD, Frayn KN, Karpe F. Transcriptional Control of Human Adipose Tissue Blood Flow. *Obesity* (Silver Spring) 2009.
- (215) Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; 299(5608):896-899.
- (216) Olsen MH, Hansen TW, Christensen MK, Gustafsson F, Rasmussen S, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Ibsen H, Jorgensen T, Hildebrandt P. N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome. *Hypertension* 2005; 46(4):660-666.
- (217) Rubattu S, Sciarretta S, Ciavarella GM, Venturelli V, De PP, Tocci G, De BL, Ferrucci A, Volpe M. Reduced levels of N-terminal-proatrial natriuretic peptide in hypertensive patients with metabolic syndrome and their relationship with left ventricular mass. *J Hypertens* 2007; 25(4):833-839.
- (218) Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004; 109(5):594-600.
- (219) Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Tamburrini P, Moraca A, Espinosa E, Cola G, Giantomassi L, Rappelli A. Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of

- normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens* 1997; 15(12 Pt 2):1695-1699.
- (220) Sarzani R, Paci VM, Zingaretti CM, Pierleoni C, Cinti S, Cola G, Rappelli A, Dessi-Fulgheri P. Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens* 1995; 13(11):1241-1246.
- (221) Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Serenelli M, Tamburrini P, Spagnolo D, Giantomassi L, Espinosa E, Rappelli A. Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives. *Hypertension* 1999; 33(2):658-662.
- (222) Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS. Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. *Circulation* 2007; 115(11):1345-1353.
- (223) Verspohl EJ, Bernemann IK. Atrial natriuretic peptide (ANP)-induced inhibition of glucagon secretion: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. *Peptides* 1996; 17(6):1023-1029.
- (224) Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 1990; 16(3):301-307.
- (225) John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 1995; 267(5198):679-681.

- (226) Wang D, Oparil S, Feng JA, Li P, Perry G, Chen LB, Dai M, John SW, Chen YF. Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension* 2003; 42(1):88-95.
- (227) Honrath U, Chong CK, Melo LG, Sonnenberg H. Effect of saline infusion on kidney and collecting duct function in atrial natriuretic peptide (ANP) gene "knockout" mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77(6):454-457.
- (228) Oliver PM, John SW, Purdy KE, Kim R, Maeda N, Goy MF, Smithies O. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(5):2547-2551.
- (229) Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, Baba HA, van EM, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* 2005; 112(15):2307-2317.
- (230) Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 1995; 378(6552):65-68.
- (231) Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(26):14730-14735.

- (232) Holtwick R, van EM, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 2003; 111(9):1399-1407.
- (233) Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, Steinmetz M, Potthast R, Zetsche B, Hammer RE, Herz J, Kuhn M. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(10):7142-7147.
- (234) Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, Zwiener M, Baba HA, Yanagisawa M, Kuhn M. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1666-1674.
- (235) Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2703-2706.
- (236) Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, Matsuda S, Shiono S, Nishimoto H, Nakao K. Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* 1994; 93(5):1911-1921.
- (237) Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y, Shiota K, Nakao K. Skeletal

overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(5):2337-2342.

- (238) Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8):4239-4244.
- (239) Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M, Nakao K. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(7):4016-4021.
- (240) Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 2004; 10(1):80-86.
- (241) Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(49):17300-17305.
- (242) Langenickel TH, Buttgerit J, Pagel-Langenickel I, Lindner M, Monti J, Beuerlein K, Al-Saadi N, Plehm R, Popova E, Tank J, Dietz R, Willenbrock R, Bader M. Cardiac hypertrophy in transgenic rats expressing a dominant-negative mutant of the natriuretic peptide receptor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(12):4735-4740.

- (243) Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(13):7403-7408.
- (244) Dutil J, Deng AY. Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol Genomics* 2001; 6(1):3-9.
- (245) Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Bernard M, Kaldunski ML, Jomphe M, Tremblay J, Hudson TJ, Bouchard G, Kotchen TA, Cowley AW, Hamet P. Genome-wide scan for linkage to obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2005; 46(6):1280-1285.
- (246) MORTON NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; 7(3):277-318.
- (247) Hamet P, Merlo E, Seda O, Broeckel U, Tremblay J, Kaldunski M, Gaudet D, Bouchard G, Deslauriers B, Gagnon F, Antoniol G, Pausova Z, Labuda M, Jomphe M, Gossard F, Tremblay G, Kirova R, Tonellato P, Orlov SN, Pintos J, Platko J, Hudson TJ, Rioux JD, Kotchen TA, Cowley AW, Jr. Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am J Hum Genet* 2005; 76(5):815-832.
- (248) Newton-Cheh C, Larson MG, Vasan RS, Levy D, Bloch KD, Surti A, Guiducci C, Kathiresan S, Benjamin EJ, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Blankenberg S, Kee F, Nilsson P, Yin X, Peltonen L, Vartiainen E, Salomaa V, Hirschhorn JN, Melander O, Wang TJ. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating

- natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet* 2009; 41(3):348-353.
- (249) Burnett JC, Jr., Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986; 231(4742):1145-1147.
- (250) Richards AM, Lainchbury JG, Troughton RW, Espiner EA, Nicholls MG. Clinical applications of B-type natriuretic peptides. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(4):170-174.
- (251) Yandle TG, Richards AM, Gilbert A, Fisher S, Holmes S, Espiner EA. Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(4):832-838.
- (252) Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* 2005; 330(7492):625.
- (253) Makikallio AM, Makikallio TH, Korpelainen JT, Vuolteenaho O, Tapanainen JM, Ylitalo K, Sotaniemi KA, Huikuri HV, Myllyla VV. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke* 2005; 36(5):1016-1020.
- (254) Wazni OM, Martin DO, Marrouche NF, Latif AA, Ziada K, Sharaoui M, Almahameed S, Schweikert RA, Saliba WI, Gillinov AM, Tang WH, Mills RM, Francis GS, Young JB, Natale A. Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* 2004; 110(2):124-127.

- (255) Cusson JR, Thibault G, Cantin M, Laroche P. Prolonged low dose infusion of atrial natriuretic factor in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 1990; 12(1):111-135.
- (256) Hirata Y, Ishii M, Sugimoto T, Matsuoka H, Fukui K, Sugimoto T, Yamakado M, Tagawa H, Miyata A, Kangawa K, . Hormonal and renal effects of atrial natriuretic peptide in patients with secondary hypertension. *Circulation* 1988; 78(6):1401-1410.
- (257) Hamet P, Testaert E, Palmour R, Laroche P, Cantin M, Gutkowska J, Langlois Y, Ervin F, Tremblay J. Effect of prolonged infusion of ANF in normotensive and hypertensive monkeys. *Am J Hypertens* 1989; 2(9):690-695.
- (258) Lin KF, Chao J, Chao L. Human atrial natriuretic peptide gene delivery reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26(6 Pt 1):847-853.
- (259) Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, Shaknovich A, Pondolfino K, Clark M, Camargo MJ, . Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 1986; 78(5):1362-1374.
- (260) Fifer MA, Molina CR, Quiroz AC, Giles TD, Herrmann HC, De S, I, Clement DL, Kubo S, Cody RJ, Cohn JN, . Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1990; 65(3):211-216.
- (261) Kitashiro S, Sugiura T, Takayama Y, Tsuka Y, Izuoka T, Tokunaga S, Iwasaka T. Long-term administration of atrial natriuretic peptide in

- patients with acute heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33(6):948-952.
- (262) Weder AB, Sekkarie MA, Takiyyuddin M, Schork NJ, Julius S. Antihypertensive and hypotensive effects of atrial natriuretic factor in men. *Hypertension* 1987; 10(6):582-589.
- (263) Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, Wagoner LE, Givertz MM, Liang CS, Neibaur M, Haught WH, LeJemtel TH. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343(4):246-253.
- (264) Hobbs RE, Miller LW, Bott-Silverman C, James KB, Rincon G, Grossbard EB. Hemodynamic effects of a single intravenous injection of synthetic human brain natriuretic peptide in patients with heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996; 78(8):896-901.
- (265) Rayburn BK, Bourge RC. Nesiritide: a unique therapeutic cardiac peptide. *Rev Cardiovasc Med* 2001; 2 Suppl 2:S25-S31.
- (266) Keating GM, Goa KL. Nesiritide: a review of its use in acute decompensated heart failure. *Drugs* 2003; 63(1):47-70.
- (267) Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 2005; 111(12):1487-1491.
- (268) Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart

failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; 293(15):1900-1905.

- (269) Campese VM, Lasseter KC, Ferrario CM, Smith WB, Ruddy MC, Grim CE, Smith RD, Vargas R, Habashy MF, Vesterqvist O, Delaney CL, Liao WC. Omapatrilat versus lisinopril: efficacy and neurohormonal profile in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 38(6):1342-1348.
- (270) Corti R, Burnett JC, Jr., Rouleau JL, Ruschitzka F, Luscher TF. Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* 2001; 104(15):1856-1862.
- (271) Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens* 2004; 17(2):103-111.
- (272) Purves D, Augustine J G, Fitzpatrick D, Hall C W, LaMantia A-S, McNamara O J, White E L. *Neuroscience*. Sinauer Associates 2008; 4th ed.:170-6.
- (273) Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987; 328(6126):175-178.
- (274) Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21:127-148.
- (275) Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-

- dependent protein kinase activation. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9472-9480.
- (276) Casteel DE, Zhuang S, Gudi T, Tang J, Vuica M, Desiderio S, Pilz RB. cGMP-dependent protein kinase I beta physically and functionally interacts with the transcriptional regulator TFII-I. *J Biol Chem* 2002; 277(35):32003-32014.
- (277) Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1):30-40.
- (278) He B, Weber GF. Phosphorylation of NF-kappaB proteins by cyclic GMP-dependent kinase. A noncanonical pathway to NF-kappaB activation. *Eur J Biochem* 2003; 270(10):2174-2185.
- (279) Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 1998; 273(7):4220-4226.
- (280) Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, Lamas S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2002; 62(4):927-935.
- (281) Desch M, Schinner E, Kees F, Hofmann F, Seifert R, Schlossmann J. Cyclic cytidine 3',5'-monophosphate (cCMP) signals via cGMP kinase I. *FEBS Lett* 2010.

- (282) Cech SY, Ignarro LJ. Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP) formation in mammalian tissues. *Science* 1977; 198(4321):1063-1065.
- (283) Gaion RM, Krishna G. Cytidylate cyclase: the product isolated by the method of Cech and Ignarro is not cytidine 3',5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 86(1):105-111.
- (284) Duttweiler HM. A highly sensitive and non-lethal beta-galactosidase plate assay for yeast. *Trends Genet* 1996; 12(9):340-341.
- (285) Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986; 46(5):659-667.
- (286) Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294(5):1351-1362.
- (287) Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(20):8125-8148.
- (288) Schmitzer AR, Lepine F, Pelletier JN. Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: creating alternative functional configurations. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17(11):809-819.
- (289) Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le SC, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Pure E, Agami R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2):202-210.

- (290) Lee ES, Yoon CH, Kim YS, Bae YS. The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2007; 581(22):4325-4332.
- (291) Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H, Alt E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(3):674-679.
- (292) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (293) Martel G, Hamet P, Tremblay J. GREBP: A cGMP response element binding protein repressing the transcription of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1/GCA). *J Biol Chem* 2010.
- (294) Saeed M, Perwaiz IM, Yousuf FA, Perveen S, Shafiq M, Sajid J, Frossard PM. Interactions and associations of paraoxonase gene cluster polymorphisms with myocardial infarction in a Pakistani population. *Clin Genet* 2007; 71(3):238-244.
- (295) Wang X, Bruderer S, Rafi Z, Xue J, Milburn PJ, Kramer A, Robinson PJ. Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. *EMBO J* 1999; 18(16):4549-4559.
- (296) Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(11):465-470.
- (297) Isono K, Yamamoto H, Satoh K, Kobayashi H. An Arabidopsis cDNA encoding a DNA-binding protein that is highly similar to the DEAH

- family of RNA/DNA helicase genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(18):3728-3735.
- (298) Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002; 365(Pt 3):561-575.
- (299) Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 1997; 16(8):1865-1875.
- (300) Yu X, Zhu X, Pi W, Ling J, Ko L, Takeda Y, Tuan D. The long terminal repeat (LTR) of ERV-9 human endogenous retrovirus binds to NF-Y in the assembly of an active LTR enhancer complex NF-Y/MZF1/GATA-2. *J Biol Chem* 2005; 280(42):35184-35194.
- (301) Gilad Y, Oshlack A, Smyth GK, Speed TP, White KP. Expression profiling in primates reveals a rapid evolution of human transcription factors. *Nature* 2006; 440(7081):242-245.
- (302) Wolf YI, Novichkov PS, Karev GP, Koonin EV, Lipman DJ. Inaugural Article: The universal distribution of evolutionary rates of genes and distinct characteristics of eukaryotic genes of different apparent ages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(18):7273-7280.
- (303) Kopp K, Huang S. Perinucleolar compartment and transformation. *J Cell Biochem* 2005; 95(2):217-225.
- (304) Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Montecino M, Choi J, Zaidi K, Javed A. Intranuclear trafficking of transcription factors: implications for biological control. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 14):2527-2533.

- (305) Neyses L, Vetter H. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163(3):1435-1443.
- (306) Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, Nelson MA. Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 2006; 25(35):4923-4936.
- (307) Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Leong SP, Nelson MA, Shi J. Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. *Mol Carcinog* 2008; 47(10):806-813.
- (308) Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Cunningham JT, Nelson MA, Shi J. Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 2008; 47(3):235-244.
- (309) Gudi T, Lohmann SM, Pilz RB. Regulation of gene expression by cyclic GMP-dependent protein kinase requires nuclear translocation of the kinase: identification of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 1997; 17(9):5244-5254.

Annexe I

Article publié dans:

Molecular and Cellular Biochemistry, 2010 Jan; 334(1-2):53-65.

**CENTRAL ROLE OF GUANYLYL CYCLASE IN NATRIURETIC PEPTIDE
SIGNALING IN HYPERTENSION AND METABOLIC SYNDROME**

Martel G, Hamet P, Tremblay J

Laboratory of Cellular Biology of Hypertension, and Centre for Ecogenomic Models
of Human Diseases, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de
Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Keywords: natriuretic peptides, cGMP, hypertension, metabolic syndrome, obesity

Abstract

Studied for nearly 30 years for its ability to control many parameters, such as vascular smooth muscle cell relaxation, heart fibrosis and kidney function, the natriuretic peptide (NP) system is now considered to be a key element in several other major metabolic pathways. After stimulation by NPs, natriuretic peptide receptors (NPR) convert GTP to the second messenger cGMP. In addition to its vasodilatory effects and natriuretic and diuretic functions, cGMP has been positively associated with fat cell function, apoptosis and NPR expression/activity modulation. The NP system is also closely linked to metabolic syndrome (MetS) progression and obesity control. A new era is now on its way targeting the NP system to not only treat high blood pressure, but to also assist in the fight against the obesity pandemic. Here, we summarize recent data on the role of NPs in hypertension and metabolic syndrome.

Introduction: Natriuretic peptide receptors/guanylyl cyclase signaling

Since the discovery of atrial natriuretic peptide (ANP) back in 1981 [1] particulate guanylyl cyclase (GC) signalling became a major field of interest for many groups [2-20]. After *i.v.* injection of atrial homogenates into rats, the active compound extracted from the atria was found to be a short peptide able to rapidly lower blood pressure (BP) and promote sodium and water excretion through a cGMP signalling pathway [11]. Since then, the mammalian natriuretic peptide (NP) family has acquired two additional members, B-type natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP), both originally identified in the porcine brain [15,16]. These three NPs share a

similar structure consisting of a 17-amino acid ring joined by a disulfide bridge. In humans, active ANP is a 28-amino-acid long peptide, whereas BNP and CNP are respectively 32 and 22 amino acids long. ANP is mainly produced in the atria and stored in granules as a 126-amino-acid proANP form. ProANP secretion is stimulated by atrial stretching after volume overload, and active ANP is produced under the action of corin, a transmembrane serine protease acting as a converting enzyme [7,20]. Circulating ANP targets several organs, including the heart, kidney, adrenal, lung, vascular smooth muscle and adipose tissue. BNP, which acts on the same organs, is also produced in the heart as a 134-amino-acid long preproBNP. Regulated by the transcription factor GATA-4, BNP is actively produced by the ventricles upon atrial wall stretching [10,18]. In contrast to ANP and BNP, CNP acts in an autocrine/paracrine manner and is secreted by the vascular endothelium to control vascular tonus and endothelium growth [6]. ANP and BNP genes are both located on human chromosome 1 at the 1p36.3 locus, whereas CNP gene is located on chromosome 2 between 2q24 and the 2q terminus. In mice, ANP and BNP genes are both located on chromosome 4 (4E2), while CNP gene is positioned at the chromosome 1D locus. Rat ANP, BNP and CNP genes are found on chromosomes 5q35, 5q36 and 9q35, respectively. The similar structure of the NPs suggests a common ancestor gene, and it has been proposed that CNP gene generates ANP and BNP genes through gene duplication [17].

Receptors for these peptides, called natriuretic peptide receptors (NPR), are composed of 3 members: NPRA, NPRB and NPRC. NPRA and NPRB possess enzymatic activity required for signal transduction. Also known as guanylyl cyclase A and B (GCA and GCB), these two receptors are structurally similar, and each

monomer is composed of a large extracellular ligand-binding domain, a single transmembrane domain followed by a kinase homology domain (KHD), a coiled-coil dimerization domain and a GC catalytic domain at its intracellular C-terminal end [8,9,14,19]. NPRA can bind the 3 NPs but with a marked preference for ANP and BNP over CNP, while NPRB is activated preferentially by CNP [5]. NPRC is a non-GC receptor containing a very small intracellular domain 37 amino acids long [13]. Originally described as the clearance receptor for NPs, NPRC was also found to be coupled to the adenylyl cyclase/cAMP signal transduction system through inhibitory guanine nucleotide regulatory protein [2,3,12].

The activity of NPRA and NPRB is tightly regulated and, in the basal state, the conversion of GTP to cGMP by the GC domain is low. Activation of these receptors is triggered by the binding of NPs to the extracellular domain of a homooligomerized receptor, inducing conformational receptor change allowing ATP to bind to the KHD which relieves repression of the catalytic domain. Active GC is formed from two domains of the homodimer receptor which leads to cGMP production. This second messenger will ultimately transduce the initial NP signal by interacting with several target proteins, including protein kinase G (PKG), ion-gated channels and phosphodiesterases (PDEs) [4]. These cGMP targets will be discussed further in the following sections.

Regulation of NPR expression and activity

NPR expression and activity are regulated by several factors, including growth factors, angiotensin II, endothelin, glucocorticoids and NPs themselves.

Regulation of NPRA transcriptional activity is the most studied among the three NPRs. The human, mouse and rat NPRA gene promoter, controlled by an inverted CCAAT box instead of the typical TATA box, is the basic element for recruiting transcription factors. The NPRA gene promoter contains several elements that up- or down-regulate mRNA expression. Among these are three Sp1-binding sites in the NPRA gene promoter which drive transcriptional activity; mutation of one of the Sp1 sites reduces promoter activity by half whereas complete deletion of the three sites leads to a decrease in promoter activity of more than 90%. NPRA expression is increased by 12-fold when Ets-1 is overexpressed in mouse mesangial cells, while mutation of c-Ets-binding element completely abolishes this Ets-1-dependent induction [21]. One of the main differences in NPRA gene transcription between human, mouse and rat species lies in the location of the transcription start site; indeed, the transcription start site in human NPRA gene is 88 base pairs upstream of the start codon, whereas in mice and rats this 5' untranslated region is respectively at 362 and 370 base pairs [22], suggesting a still unknown, species-specific mechanism of NPRA gene transcription. One of these mechanisms has been elucidated in rats. Indeed, the rat NPRA gene promoter contains a dinucleotide TA repetition, of which the number of TA is inversely proportional to the NPRA expression level. Thus, even if the response to ANP is exaggerated in the rat model of essential hypertension, the spontaneously hypertensive rat (SHR), a longer TA repeat is associated with reduced NPRA mRNA levels compared to the normotensive Brown Norway (BN) strain [23,24]. As anticipated, an intermediate number of TA repeats, between the 10 TA repeat segment of the BN strain and the 40 TA of SHR, results in an intermediate level of NPRA gene expression [23]. NPRA is controlled by a retro-inhibition loop

involving the cGMP molecule as the main sensor. After stimulation by ANP, the NPRA gene promoter can down-regulate its own expression via a cGMP-dependent mechanism [25]. This down-regulation mechanism is under the control of a cis-regulatory element, called the cGMP response element (cGMP-RE), present in the NPRA gene promoter [26]. This DNA element is well-defined in the human, mouse and rat genomes but the *trans*-acting factors involved in sensitivity to cGMP are still unknown.

In addition to down-regulation mechanisms, desensitization, which affects the activity of the receptor rather than its expression level, is another means of tightly controlling NP action at the level of their receptors. The homologous desensitization mechanism has been shown to occur shortly after NP binding independently of cGMP accumulation [27]. Following NP binding and receptor activation, the phosphorylation state of the KHD, located in the intracellular region of NPRA and NPRB, is rapidly reduced by the action of a protein phosphatase causing the dissociation of GC monomers and the diminution of GC activity. This mechanism of homologous desensitization has been documented for NPRA and NPRB. ANP-dependant modulation of NPRA activity and expression is summarized in figure 1. Protein kinase C (PKC) has been implicated in heterologous desensitization caused by factors other than NPs. Angiotensin II, lysophosphatidic acid, sphingosin-1-phosphate, platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor and endothelin are among known factors producing heterologous desensitization of NPRA and NPRB. These agents activate PKC, through diacylglycerol (DAG), resulting in dephosphorylation of specific phosphoserine and phosphothreonine sites on receptors that are different from those dephosphorylated by NP-induced

desensitization [28]. In addition to PKC activation, NPRB desensitization can occur after inositol triphosphate (IP₃)-dependent elevation of intracellular calcium concentration [29]. Although the topology and signalling mechanisms of NPRB are well-studied, its gene regulation is still poorly understood. The NPRB gene promoter is somewhat similar to that of NPRA; both are TATA-less, controlled by an inverted CCAAT-box and contain several Sp1-binding sites. On the other hand, the NPRB promoter lacks the cGMP response element identified in NPRA, suggesting that the retro-inhibition loop for NPRB is different from that of NPRA in that it does not involve the same cis-element or that this type of retro-feedback does not exist for the CNP/NPRB/cGMP pathway.

The third receptor, NPRC, has been shown to be affected by various agents that modulate its expression levels. Indeed, stimulation of pulmonary arterial smooth muscle cells by fibroblast growth factors (FGF-1 and -2) and PDGF-BB has been demonstrated to reduce NPRC mRNA levels [30]. Moreover, treatment of vascular smooth muscle cells (VSMC) with noradrenaline, forskolin, sodium fluoride and 8-bromo-cAMP has been associated with a decrease in the protein and mRNA levels of NPRC without affecting NPRA or NPRB [31]. Salt intake has also been found to lower NPRC mRNA levels in the kidneys independently of ANP and, again, with no effects on NPRA or NPRB content [32]. Although evidence of NPRC downregulation has been well-documented, the exact signalling mechanisms are not fully understood and remain under investigation. A recent study [33], reported that an alternative spliced variant of NPRA, previously shown by us [34], to be ubiquitously expressed but at levels lower than 1%, causes deletion of 16 amino acids between Lys³¹⁴ and Gln³³⁰ in the membrane-distal part of the extracellular domain, inhibiting ligand

binding and receptor stimulation. This variant can form heterologous dimers with the wild type receptor and interfere with its activity. It may represent another mechanism of reduced sensitivity to ANP [33].

Effects of post-GC signalling and cellular events

VSMC relaxation

NP-dependent vasodilatation is probably the most studied field in cGMP signalling. It is well-known that cGMP elevation leads to the relaxation of pre-contracted rat aortic rings [35-37]. VSMC contraction and relaxation are under the control of intracellular calcium spikes; anything affecting calcium concentration will shift the cells from a contractile to a resting state [38-40]. Briefly, calcium induces contractions by activating calcium/calmodulin-dependent myosin light chain kinase which phosphorylates myosin light chain and activates myosin contractile adenosine triphosphatase (ATPase) [40-43]. ANP-dependent VSMC relaxation absolutely requires PKGI as PKGI-deficient mice do not respond to NPs or nitric oxide (NO) donors [44]. cGMP-dependent relaxation is observed after PKGI activation and subsequent effects on intracellular calcium levels. PKGI α can phosphorylate calcium-activated potassium channels and cause membrane hyperpolarization via channel opening and potassium escape [45,46]. The hyperpolarized membranes then inhibit surrounding voltage-gated calcium channels [47]. In addition, PKGI is able, via phosphorylation, to inhibit the same channels and to prevent intracellular calcium entry [48]. Activation of the plasma membrane calcium/ATPase pump and of the sarcoplasmic reticulum calcium/ATPase pump is an additional mechanism by which

PKGI lowers intracellular calcium content and inhibits the contractile machinery [49,50]. The kinase also affects calcium release from the sarcoplasmic reticulum by phosphorylating the IP₃ receptor and its IP₃ receptor-associated PKGI substrate [51,52]. Direct effects on contractile mechanisms come from PKGI-dependent phosphorylation and activation of myosin light chain phosphatase which decrease global myosin light chain phosphate content [38,53,54]. Altogether, these actions, illustrated in figure 2, contribute to smooth muscle cell relaxation

The kidney and renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) antagonism

The kidney is one of the best known targets of ANP, with rising cGMP concentration increasing the glomerular filtration rate (GFR) through coordinated efferent arteriolar vasoconstriction and afferent arteriolar vasodilatation [55]. These events are exclusively mediated by NPRA present in glomeruli as they can be antagonized by HS-142 and A71915 [56-58]. Angiotensin II-dependent reabsorption of sodium and water by proximal tubules is inhibited by peritubular ANP stimulation [59]. cGMP also suppresses sodium transport from the collecting ducts by inhibiting amiloride-sensitive cation channels [60]. Juxtaglomerular cells are also affected as they stop secreting renin after intrarenal ANP injection through a PKGII-dependent mechanism [61,62]. In addition to this effect, the RAAS is antagonized directly at the level of the adrenal glands by ANP. The peptide reduces angiotensin II-stimulated, ACTH-induced and basal aldosterone levels [63-65]. The pathways responsible for the inhibition of aldosterone secretion remain unclear, but a sound hypothesis has been proposed. ANP, through cGMP, could activate cyclic GMP-stimulated PDE2 which degrades cAMP in the aldosterone synthesis signalling pathway [66]. It could

also involve the synthesis and phosphorylation of regulatory protein(s), disturbing the entire steroidogenesis pathway [67,68]. Altogether, these actions help maintain volume homeostasis by increasing fluid and electrolyte excretion.

cGMP and cell proliferation

Although cGMP involvement in cell proliferation is still controversial, NPs are clearly anti-proliferative agents negatively regulating vascular growth. Controversy arose when studies demonstrated the angiogenesis potential of NO donors in several cell lines. Indeed, these compounds were able to increase vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA levels in a cGMP-dependent manner and promote vessel formation through the cGMP pathway [69-72]. However, ANP is a strong inhibitor of cell proliferation for many cell lines including renal mesangial cells, VSMC, endothelial cells and cardiac fibroblasts [73-76]. These anti-proliferative effects are mediated by NPRA through a cGMP-dependent mechanism which inhibits the RAAS and mitogen-activated protein kinase pathways [77,78]. CNP is known to be a strong inhibitor of VSMC proliferation, 10 times stronger than ANP, and may be implicated in vascular remodelling [79]. The peptide has been shown to inhibit thickening of the carotid artery intima after balloon catheter injury [80-82]. The autocrine action of CNP on cardiac fibroblasts may also prevent cell proliferation, thus protecting the heart from fibrosis. This has been hypothesized in view of the fact that the CNP-dependent elevation of cGMP inhibits DNA synthesis and collagen production in cultured cardiac fibroblasts [83]. NPRA may also play a role in cancer progression. Indeed, a recent study showed that NPRA-deficient mice are protected from lung, skin and ovarian cancer [84] via a complex mechanism

implicating its effects on inflammation and autoregulation of the receptor expression. Moreover, NPRA deficiency down-regulates VEGF expression while up-regulating the expression of tumour suppressor retinoblastoma protein and implicating NPRA in tumour angiogenesis [84].

Pro- and anti-apoptotic effects

Apoptosis, which is well-organized cell death, is an essential process for normal development and many pathophysiological conditions. Post-GC signalling, through cGMP, is involved in the regulation of several apoptosis-associated genes which can have either pro-apoptotic or anti-apoptotic effects. Indeed, cGMP elevation can induce apoptosis in VMSC, cardiomyocytes and endothelial cells [85-88]. The pro-apoptotic effects of cGMP are mediated by PKGI [85,88]. The kinase may indirectly increase apoptosis through JNK activation and phosphorylation/degradation of β -catenin which normally drives the expression of several anti-apoptotic genes [89-91]. In addition, in cardiomyocytes, ANP-induced elevation of cGMP concentration inhibits the expression of Mcl-1 mRNA, an anti-apoptotic Bcl-2 homologue, and promotes apoptosis [86]. In some cell lines, cGMP can also have an anti-apoptotic counterpart. In cerebellar neurons, the protective effects of cGMP are correlated with increased CREB phosphorylation and Bcl-2 expression [92]. Down-regulation of the pro-apoptotic Bcl-2 binding protein BNIP3 by cGMP also protects hepatocytes from apoptosis [93]. Since data have proven that cGMP can be both pro- and anti-apoptotic, differences in their mechanisms clearly appear to be cell-specific.

Fat cell function and metabolism

The fairly recent association between GC signalling and fat metabolism has rapidly gained interest due to the large number of obesity-related diseases. This sudden interest is mainly due to the fact that ANP-mediated lipolysis is specific to primates, and rodent adipocytes are inefficient in these studies since they possess a low NPRA/NPRC ratio which promotes NP clearance [94]. Lipolysis is induced by both ANP and BNP, but not by CNP, and relies on the cGMP-dependent pathway as it can be mimicked by a cGMP analogue [95]. PKGI activation by cGMP induces perilipin and hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation which are the initiation step of lipolysis [95]. In addition to cGMP-dependent lipolysis, catecholamines are also able to stimulate lipolysis through cAMP elevation and protein kinase A (PKA) activation [96]. Both pathways, cAMP and cGMP, converge to the same goal, which is the stimulation of lipolysis. However, insulin-dependent activation of PDE3B, the cAMP-hydrolyzing PDE, inhibits lipolytic mechanisms initiated by the β -adrenoreceptor [97]. This cross-talk between the lipogenesis effect of insulin and the lipolytic action of NPs does not exist in human fat cells as PDE5A activity is not regulated by insulin [97]. In addition to lipolysis, ANP is able to inhibit visceral adipocyte growth by a cGMP-dependent mechanism [98]. On the other hand, NP-induced lipolysis can be counteracted by the RAAS. Adipocytes have all the machinery required for angiotensin II signalling, and the peptide has been shown to stimulate lipogenesis and preadipocyte differentiation [99,100]. Indeed, stimulation of adipocytes with angiotensin II through the type 2 angiotensin receptor causes the transcriptional up-regulation of fatty acid synthase (FAS) gene [99]. FAS is one of the first enzymes in the lipogenic pathway, and it converts malonyl-CoA into stearic acid-CoA; the following steps leading to triacylglyceride formation are made up of

several enzymes located on the endoplasmic reticulum membrane [101]. The ability of angiotensin II to inhibit NP-dependent lipolysis relies on phospholipase C (PLC) activation and implies two separate processes. Phosphatidylinositol bisphosphate is digested into DAG and IP₃ under the action of PLC [102]. DAG and IP₃ respectively activate PKC and increase cytoplasmic calcium content [102]. Calcium elevations activate PDE3B, which will hydrolyze the second messenger cGMP into GMP, thus affecting PKG activation sensitivity [103]. In addition, angiotensin II has been shown to directly inhibit the transcription of murine NPRA gene [104]. In this context, angiotensin II and ANP counterbalancing effects may have important roles in visceral adipose tissue development [98]. These processes are briefly summarized in Figure 3. ANP has also been postulated to be a potential regulator of fat gain and BP increase in a post-menopausal mouse model through the reduction of ANP levels [105]. Estradiol treatment improves ANP levels in these mice by both lowering NPRC content and augmenting ANP synthesis, which suggest possible cross-talk between estrogens and the NP system in adipose tissue dynamics [105].

Pathophysiological role in hypertension and metabolic syndrome (MetS): experimental genetics and signalling disorder

Role in metabolic syndrome (MetS) progression

Obesity together with hypertension are the leading risk factors for the development of cardiovascular diseases, and the NP system is able to maintain the tight regulation set between proper body weight and an unhealthy overweight condition. However, this fragile equilibrium can easily be destroyed by anything

which can affect NPs or their receptor levels. The anti-obesity power of NPs relies on several lines of metabolic evidence which all converge to triglyceride lipolysis and β -oxidation. Earlier, we mentioned that ANP promotes lipid mobilization through HSL activation, but this lipolysis is enhanced when endurance exercises are performed [106]. Increases of non-esterified fatty acids (NEFA) by HSL activation will then fuel working muscles during endurance training as they cannot rely on glucose storage for a long period of time. Recent studies have demonstrated a strong link between the ANP/NPRA system and postprandial state. Indeed, both genes are positively associated with lowered BP, elevated venous glycerol and NEFA levels, increased lipid oxidation rates and enhanced adipose tissue blood flow [107,108]. Moreover, cGMP has been shown to trigger mitochondrial biogenesis through the induction of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α [109]. Together, these effects promote adipose tissue turnover by NEFA release, an efficient utilization of this energy source by enhanced β -oxidation due to multiplying mitochondria and globally-improved cardiac and skeletal muscle metabolism. This is, however, an ideal scenario which is different in overweight subjects. Indeed, obese individuals tend to have lower NP levels than so-called lean “normal” subjects, whereas MetS patients also have lower ANP and BNP levels [110-112]. These levels can be explained by downregulated cardiac secretion of NPs because the N-terminal portion of cleaved pro-ANP and pro-BNP, unable to bind any NPR, is present at lower levels in obese subjects [112]. Obesity also influences receptor number in adipocytes, affecting the ratio of expressed NPRA/NPRC. Indeed, in obese, hypertensive patients, the NPRA/NPRC ratio is reduced in subcutaneous adipose tissue, suggesting abnormal clearance activity versus NPRA activation which will greatly reduce NP efficiency

[113]. The combined effects of decreased NP secretion added to increased clearance could have a significant impact on lipid storage, especially when caloric intake is excessive. However, this condition is not permanent and can be reversed by fasting which dramatically downregulates NPRC expression in adipose tissues [114]. In obese, hypertensive patients, ANP infusion after hypocaloric dieting exerts more pronounced effects in terms of BP diminution, natriuresis, diuresis and cGMP elevation than it does before low caloric intake, indicating enhanced NPRA activation after caloric restriction [115]. Another component of MetS which has been linked to NP levels is insulin resistance. In Framingham study participants, an inverse association was found between NP and both plasma glucose and insulin levels, suggesting that lower circulating NP levels could be an additional manifestation of MetS [116]. It has also been reported that ANP can directly inhibit glucagon secretion from pancreatic islets [117]. In a low NP condition, these two separate mechanisms contribute to impaired glycaemia levels, promote insulin resistance and inevitably lead to type 2 diabetes development.

Role of the NP system in BP regulation and diagnostic and therapeutic potential in hypertension

Hypertension alone or associated with MetS is a complex multifactorial disease controlled, in part, by the NP system. The contribution of NPs or their receptors has been studied in different rat and mouse models. The combined effects of NPs on volume regulation (diuresis/natriuresis) and vasorelaxation control overall BP. An eight-fold increase in plasma ANP levels is able to decrease BP by 30 mmHg without inducing urinary volume or salt excretion in transgenic mice [118]. Double

ANP gene knockout mice have 8 to 23 mmHg higher BP on a standard diet with 0.5% NaCl or a 2% NaCl diet [119]. The heterozygous strain has normal BP on a normal diet, but a high-salt diet can propel it 27 mmHg higher than in the controls, indicating that reduced ANP levels can lead to salt-sensitive hypertension [119]. Homozygous ANP knockout mice exhibit left and right ventricular hypertrophy which is accompanied by increased expression of extracellular matrix proteins and metalloproteinases that are probably normally repressed by ANP [120]. Renal function is also disrupted in these mice as they cannot excrete sodium after saline infusion, even if the GFR is similar between ANP-null and control mice [121]. This is caused by high sodium and chloride reabsorption by the collecting ducts, suggesting that ANP is essential for natriuresis in acute intravascular volume expansion [121]. Manipulation of NPRA produces direct and proportional correlation between BP and the number of gene copies present [122]. Thus, homozygous deletion of NPRA elicits salt-resistant hypertension and an increased incidence of sudden death and cardiac hypertrophy caused by overactive Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE-1) [123-125]. Selective deletion of NPRA in the heart results in mild hypertrophy, heightened ANP secretion and reduced BP probably due to the systemic action of ANP [126]. NPRA deletion in smooth muscle cells has no effect on BP under basal conditions, but mice lose their ability to vasorelax under ANP infusion and this leads to rapid BP elevation after acute volume expansion [127]. NPRA deletion in selective vascular endothelial cells evokes significant hypertension, cardiac hypertrophy and prevention of ANP-dependent fluid extravasation into the interstitial compartment [128]. On the other hand, NPRA overexpression decreases BP and protects against salt-sensitive hypertension, while cardiac-specific overexpression of NPRA in NPRA-deficient

mice reduces myocyte size and ANP expression [122,129]. BNP overexpression in transgenic mice culminates in a significant rise of plasma cGMP levels and lowers BP in comparison to wild type animals [130]. Elevated circulating BNP also causes skeletal abnormalities through a high turnover of endochondral ossification and increased height of the cartilaginous primordium [131]. BNP deletion does not produce hypertension or ventricular hypertrophy but results in multifocal fibrotic lesions in ventricles which grow in size and number in response to ventricular pressure overload [132]. Deletion of CNP gene leads to somatic dwarfism, and its overexpression rescues the phenotype in CNP-null mice but does not affect BP [133,134]. Similarly, NPRB gene-deleted mice are not hypertensive but show dysfunctional endochondral ossification and diminished longitudinal growth of limbs and vertebra [135]. In transgenic rats, overexpression of a dominant negative version of NPRB causes BP-independent cardiac hypertrophy and heightened heart rate, suggesting a role for NPRB signalling in cardiac growth [136]. Deletion of NPRC culminates in slightly lower BP, mild diuresis, decreased blood volume and increased bone growth, phenotypes that are all linked to impaired clearance of NPs [137]. The locus on rat chr 2 containing GC-A has been shown to cosegregate positively with BP in 6 different rat crosses with genetically distant hypertensive and normotensive progenitors. Data from congenic strains have confirmed the existence of a BP quantitative trait loci (QTL) at the GC-A locus [138].

In humans, our group performed a whole genome scan initially with microsatellite markers and then with a high density of single nucleotide polymorphism markers (SNPs) in a family cohort with hypertension and dyslipidemia. We identified significant quantitative trait loci (QTL) for blood pressure and other hypertension-

related traits. We found a QTL with significant logarithm of odds (LOD) score for hypertension and obesity-associated hypertension (LOD score ≥ 1.9) at position 1p36 where ANP and BNP genes are located [139]. We also found a chromosomal region at position 1q which was significantly associated with several metabolic phenotypes such as BMI, percentage of body fat, insulin levels in addition to BP [140]. A total of 13 phenotypes mapped between positions 170 to 233 centiMorgan (cM) with LOD scores ranging between 2.1 to 3.9 [140]. The region spanning 63 cM contains several candidate genes including the NPRA gene. A recent study also showed a strong link between three SNPs and the NP circulating levels. Indeed, the presence of the minor allele of the 3 SNPs, rs5068, rs198358 and rs632793 within the ANP and BNP genes were directly related to increased concentrations of these NPs in both normotensive and hypertensive patients [141]. Moreover, the minor alleles of rs5098 and rs198358 were also found to be associated with slightly lower systolic and diastolic pressures and reduced risk of developing hypertension [141]. These human genetic studies demonstrated that variations in NP genes can modify the peptide circulating levels and that ANP/BNP and NPRA genes can be included in a set of positional candidate genes for blood pressure and obesity disorders. More studies are needed as we begin to understand the complexity of gene-gene interaction within the human chromosome 1.

NPs are now useful diagnostic tools for many pathological conditions. Thus, elevation of circulating ANP and BNP levels is strongly associated with congestive heart failure, hypertension and chronic renal failure [142-144]. Plasma BNP level is a marker of left ventricular function, a predictor of post-stroke mortality, post-cardiac surgery atrial fibrillation, and can also serve to assess the prognosis in patients with

congestive heart failure [144-147]. As we mentioned earlier, low levels of NPs are often associated with the pathophysiological condition of MetS and hypertension. Thus, many studies have been conducted to clinically restore normal levels of NPs to manage these conditions. Acute ANP injection, tested in hypertensive patients, decreases BP with increased natriuresis and diuresis [148,149]. Chronic ANP infusion in hypertensive monkeys also leads to a persistent decrease of BP [150]. Even if this approach is positive, long-term treatment of hypertension with these peptides is clearly impossible due to practical aspects of the technique. Gene therapies have also been tested for more long-term control of hypertension. Indeed, intravenous injection of a human ANP DNA construct results in a constant 21 mmHg reduction of BP in young SHRs without any apparent side-effects [151]. However, gene therapies are controversial, and the more classical and accepted methods of manipulating hormone levels are based on a pharmacological approach. Thus, infusion of anaritide, a synthetic version of ANP, decreases BP and increases natriuresis and diuresis in patients with hypertension or heart failure [152-155]. Nesiritide, the recombinant form of human BNP, has been shown to induce vasorelaxation, lower aldosterone levels and promote salt and water excretion in patients with heart failure [156-158]. However, nesiritide was recently found to be associated with an elevated risk of renal dysfunction and mortality [159,160]. Other means include the control of NP degradation by inhibition of neutral endopeptidases (NEP). Thus, blocking NEP causes an elevation of circulating NP and a greater hypotensive effect, especially when combined with angiotensin-converting enzyme inhibition [161-163]. However, the inhibitor omapatrilat has been shown to heighten the risk of angioedema by three-fold, especially in black individuals [163]. Further

investigations are needed to enhance the efficacy and safety of treatments derived from NP system manipulations.

Conclusion

The NP system was a milestone discovery that confirmed the endocrine role of the heart for the first time in the early 1980s. From its vasodilatory, natriuretic and diuretic actions, knowledge about this system has evolved to a degree of complexity unsuspected at that time. Now, through cGMP generation, NPs are involved in several other mechanisms, such as cell proliferation, apoptosis, RAAS inhibition, and fat cell function. The latter point is of growing interest in lipid metabolism and has become an important issue in the fight against obesity. This pandemic condition is one of the risk factors leading to hypertension development and MetS progression. Thus, understanding, at least in part, the lipid mobilization pathways controlled by NPs could have a positive impact in MetS management. As with hypertension, identifying defects in signalling pathways will certainly help to identify mechanisms implicated in lost sensitivity of the NP system. Further studies are needed to investigate problems, such as impaired NPR ratio, lowered NPRA/B content, increased NP clearance levels and even NEP dynamics. Through pharmacogenetic studies and personalized medicine targeting the NP system, we will be able to optimize treatment to every patient. We hope that they will advance the development of activators or inhibitors of the NP system for the clinical benefit of patients suffering from hypertension and/or MetS.

Reference List

1. de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T., and Sonnenberg, H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* **28**:89-94
2. Anand-Srivastava, M. B., Srivastava, A. K., and Cantin, M. (1987) Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* **262**:4931-4934
3. Anand-Srivastava, M. B. and Trachte, G. J. (1993) Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* **45**:455-497
4. Beavo, J. A. and Brunton, L. L. (2002) Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:710-718
5. Bennett, B. D., Bennett, G. L., Vitangcol, R. V., Jewett, J. R., Burnier, J., Henzel, W., and Lowe, D. G. (1991) Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem* **266**:23060-23067
6. Chen, H. H. and Burnett, J. C., Jr. (1998) C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* **32 Suppl 3**:S22-S28
7. Edwards, B. S., Zimmerman, R. S., Schwab, T. R., Heublein, D. M., and Burnett, J. C., Jr. (1988) Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* **62**:191-195

8. Garbers, D. L. (1991) Guanylyl cyclase-linked receptors. *Pharmacol Ther* **50**:337-345
9. Garbers, D. L. and Lowe, D. G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* **269**:30741-30744
10. Grepin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T., and Nemer, M. (1994) A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* **14**:3115-3129
11. Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S. C., Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M., and Genest, J. (1984) Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun* **123**:515-527
12. Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F. A., Nussenzveig, D., Scarborough, R. M., McEnroe, G. A., and Lewicki, J. A. (1987) Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* **238**:675-678
13. Porter, J. G., Arfsten, A., Fuller, F., Miller, J. A., Gregory, L. C., and Lewicki, J. A. (1990) Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **171**:796-803
14. Potter, L. R. and Hunter, T. (2001) Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem* **276**:6057-6060
15. Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., and Matsuo, H. (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**:78-81
16. Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* **168**:863-870

17. Takei, Y. (2001) Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**:559-573
18. Thuerauf, D. J., Hanford, D. S., and Glembotski, C. C. (1994) Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* **269**:17772-17775
19. Tremblay, J., Gerzer, R., Pang, S. C., Cantin, M., Genest, J., and Hamet, P. (1986) ANF stimulation of detergent-dispersed particulate guanylate cyclase from bovine adrenal cortex. *FEBS Lett* **194**:210-214
20. Yan, W., Wu, F., Morser, J., and Wu, Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8525-8529
21. Kumar, P., Arise, K. K., and Pandey, K. N. (2006) Transcriptional regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene. *Peptides* **27**:1762-1769
22. Garg, R. and Pandey, K. N. (2005) Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression. *Peptides* **26**:1009-1023
23. Tremblay, J., Hum, D. H., Sanchez, R., Dumas, P., Pravenec, M., Krenova, D., Kren, V., Kunes, J., Pausova, Z., Gossard, F., and Hamet, P. (2003) TA repeat variation, Npr1 expression, and blood pressure: impact of the Ace locus. *Hypertension* **41**:16-24
24. Tremblay, J., Huot, C., Willenbrock, R. C., Bayard, F., Gossard, F., Fujio, N., Koch, C., Kuchel, O., Debinski, W., and Hamet, P. (1993) Increased cyclic

guanosine monophosphate production and overexpression of atrial natriuretic peptide A-receptor mRNA in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* **92**:2499-2508

25. Cao, L., Wu, J., and Gardner, D. G. (1995) Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* **270**:24891-24897

26. Hum, D., Besnard, S., Sanchez, R., Devost, D., Gossard, F., Hamet, P., and Tremblay, J. (2004) Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension* **43**:1270-1278

27. Potter, L. R. and Garbers, D. L. (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* **269**:14636-14642

28. Potter, L. R. and Hunter, T. (2000) Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem* **275**:31099-31106

29. Abbey, S. E. and Potter, L. R. (2002) Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *J Biol Chem* **277**:42423-42430

30. Sun, J. Z., Oparil, S., Lucchesi, P., Thompson, J. A., and Chen, Y. F. (2001) Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:L155-L163

31. Kishimoto, I., Yoshimasa, T., Suga, S., Ogawa, Y., Komatsu, Y., Nakagawa, O., Itoh, H., and Nakao, K. (1994) Natriuretic peptide clearance receptor

is transcriptionally down-regulated by beta 2-adrenergic stimulation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**:28300-28308

32. Sun, J. Z., Chen, S. J., Majid-Hasan, E., Oparil, S., and Chen, Y. F. (2002) Dietary salt supplementation selectively downregulates NPR-C receptor expression in kidney independently of ANP. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**:F220-F227

33. Hartmann, M., Skryabin, B. V., Muller, T., Gazinski, A., Schroter, J., Gassner, B., Nikolaev, V. O., Bunemann, M., and Kuhn, M. (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* **283**:28313-28320

34. Francoeur, F., Gossard, F., Hamet, P., and Tremblay, J. (1995) Alternative splicing of natriuretic peptide A and B receptor transcripts in the rat brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **22**:S172-S174

35. Drewett, J. G., Fendly, B. M., Garbers, D. L., and Lowe, D. G. (1995) Natriuretic peptide receptor-B (guanylyl cyclase-B) mediates C-type natriuretic peptide relaxation of precontracted rat aorta. *J Biol Chem* **270**:4668-4674

36. Rapoport, R. M., Waldman, S. A., Schwartz, K., Winkquist, R. J., and Murad, F. (1985) Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* **115**:219-229

37. Lincoln, T. M. (1983) Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **224**:100-107

38. Kamm, K. E. and Stull, J. T. (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**:593-620
39. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**:231-236
40. Somlyo, A. P. and Himpens, B. (1989) Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* **3**:2266-2276
41. Hirano, K., Phan, B. C., and Hartshorne, D. J. (1997) Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* **272**:3683-3688
42. Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D. J., and . (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* **269**:30407-30411
43. Hathaway, D. R. and Adelstein, R. S. (1979) Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1653-1657
44. Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* **17**:3045-3051
45. Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., and Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **273**:32950-32956

46. Swayze, R. D. and Braun, A. P. (2001) A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem* **276**:19729-19737
47. Nelson, M. T. and Quayle, J. M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **268**:C799-C822
48. Jiang, L. H., Gawler, D. J., Hodson, N., Milligan, C. J., Pearson, H. A., Porter, V., and Wray, D. (2000) Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**:6135-6143
49. Gonzalez, J. M., Jost, L. J., Rouse, D., and Suki, W. N. (1996) Plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and smooth muscle. *Miner Electrolyte Metab* **22**:345-348
50. Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A., and Lincoln, T. M. (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **40**:923-931
51. Komalavilas, P. and Lincoln, T. M. (1996) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* **271**:21933-21938
52. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and

Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**:197-201

53. Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S., and Nakano, T. (1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* **11**:671-676

54. Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., and Mendelsohn, M. E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science* **286**:1583-1587

55. Marin-Grez, M., Fleming, J. T., and Steinhausen, M. (1986) Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* **324**:473-476

56. Tremblay, J., Gerzer, R., Vinay, P., Pang, S. C., Beliveau, R., and Hamet, P. (1985) The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase. *FEBS Lett* **181**:17-22

57. Sano, T., Morishita, Y., Matsuda, Y., and Yamada, K. (1992) Pharmacological profile of HS-142-1, a novel nonpeptide atrial natriuretic peptide antagonist of microbial origin. I. Selective inhibition of the actions of natriuretic peptides in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* **260**:825-831

58. Norling, L. L., von, G. T., and Chevalier, R. L. (1994) Maturation of A71915-dependent inhibition of atrial natriuretic peptide-stimulated cyclic GMP production in isolated rat glomeruli. *Biol Neonate* **66**:294-301

59. Harris, P. J., Thomas, D., and Morgan, T. O. (1987) Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* **326**:697-698
60. Light, D. B., Corbin, J. D., and Stanton, B. A. (1990) Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* **344**:336-339
61. Burnett, J. C., Jr., Granger, J. P., and Opgenorth, T. J. (1984) Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am J Physiol* **247**:F863-F866
62. Gambaryan, S., Wagner, C., Smolenski, A., Walter, U., Poller, W., Haase, W., Kurtz, A., and Lohmann, S. M. (1998) Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9003-9008
63. De, L. A., Racz, K., Gutkowska, J., Nguyen, T. T., Cantin, M., and Genest, J. (1984) Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* **115**:1636-1638
64. Chartier, L., Schiffrin, E., Thibault, G., and Garcia, R. (1984) Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II, ACTH and potassium in vitro and angiotensin II-induced steroidogenesis in vivo. *Endocrinology* **115**:2026-2028
65. Kudo, T. and Baird, A. (1984) Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* **312**:756-757

66. MacFarland, R. T., Zelus, B. D., and Beavo, J. A. (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* **266**:136-142
67. Cherradi, N., Brandenburger, Y., Rossier, M. F., Vallotton, M. B., Stocco, D. M., and Capponi, A. M. (1998) Atrial natriuretic peptide inhibits calcium-induced steroidogenic acute regulatory protein gene transcription in adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* **12**:962-972
68. Calle, R. A., Bollag, W. B., White, S., Betancourt-Calle, S., and Kent, P. (2001) ANPs effect on MARCKS and StAR phosphorylation in agonist-stimulated glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* **177**:71-79
69. Dulak, J., Jozkowicz, A., mbinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wojtowicz, A., Szuba, A., and Cooke, J. P. (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:659-666
70. Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S., and Esumi, H. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **15**:437-442
71. Hood, J. and Granger, H. J. (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem* **273**:23504-23508
72. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., and Jain, R. K. (2001) Predominant role of

endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2604-2609

73. Kohno, M., Ikeda, M., Johchi, M., Horio, T., Yasunari, K., Kurihara, N., and Takeda, T. (1993) Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. *Am J Physiol* **265**:E673-E679

74. Itoh, H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1990) Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **86**:1690-1697

75. Itoh, H., Pratt, R. E., Ohno, M., and Dzau, V. J. (1992) Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* **19**:758-761

76. Cao, L. and Gardner, D. G. (1995) Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* **25**:227-234

77. Pedram, A., Razandi, M., Kehrl, J., and Levin, E. R. (2000) Natriuretic peptides inhibit G protein activation. Mediation through cross-talk between cyclic GMP-dependent protein kinase and regulators of G protein-signaling proteins. *J Biol Chem* **275**:7365-7372

78. Suhasini, M., Li, H., Lohmann, S. M., Boss, G. R., and Pilz, R. B. (1998) Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **18**:6983-6994

79. Furuya, M., Yoshida, M., Hayashi, Y., Ohnuma, N., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1991) C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **177**:927-931

80. Furuya, M., Aisaka, K., Miyazaki, T., Honbou, N., Kawashima, K., Ohno, T., Tanaka, S., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1993) C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* **193**:248-253
81. Shinomiya, M., Tashiro, J., Saito, Y., Yoshida, S., Furuya, M., Oka, N., Tanaka, S., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1994) C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Biochem Biophys Res Commun* **205**:1051-1056
82. Ueno, H., Haruno, A., Morisaki, N., Furuya, M., Kangawa, K., Takeshita, A., and Saito, Y. (1997) Local expression of C-type natriuretic peptide markedly suppresses neointimal formation in rat injured arteries through an autocrine/paracrine loop. *Circulation* **96**:2272-2279
83. Horio, T., Tokudome, T., Maki, T., Yoshihara, F., Suga, S., Nishikimi, T., Kojima, M., Kawano, Y., and Kangawa, K. (2003) Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* **144**:2279-2284
84. Kong, X., Wang, X., Xu, W., Behera, S., Hellermann, G., Kumar, A., Lockey, R. F., Mohapatra, S., and Mohapatra, S. S. (2008) Natriuretic peptide receptor a as a novel anticancer target. *Cancer Res* **68**:249-256
85. Pollman, M. J., Yamada, T., Horiuchi, M., and Gibbons, G. H. (1996) Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* **79**:748-756

86. Wu, C. F., Bishopric, N. H., and Pratt, R. E. (1997) Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**:14860-14866
87. Taimor, G., Hofstaetter, B., and Piper, H. M. (2000) Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* **45**:588-594
88. Suenobu, N., Shichiri, M., Iwashina, M., Marumo, F., and Hirata, Y. (1999) Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:140-146
89. Soh, J. W., Mao, Y., Liu, L., Thompson, W. J., Pamukcu, R., and Weinstein, I. B. (2001) Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *J Biol Chem* **276**:16406-16410
90. Soh, J. W., Mao, Y., Kim, M. G., Pamukcu, R., Li, H., Piazza, G. A., Thompson, W. J., and Weinstein, I. B. (2000) Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res* **6**:4136-4141
91. Li, H., Liu, L., David, M. L., Whitehead, C. M., Chen, M., Fetter, J. R., Sperl, G. J., Pamukcu, R., and Thompson, W. J. (2002) Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol* **64**:1325-1336
92. Ciani, E., Guidi, S., Bartesaghi, R., and Contestabile, A. (2002) Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem* **82**:1282-1289

93. Zamora, R., Alarcon, L., Vodovotz, Y., Betten, B., Kim, P. K., Gibson, K. F., and Billiar, T. R. (2001) Nitric oxide suppresses the expression of Bcl-2 binding protein BNIP3 in hepatocytes. *J Biol Chem* **276**:46887-46895
94. Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Moulin, A., Berlan, M., Bouloumie, A., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2002) Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**:R257-R265
95. Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003) Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* **278**:48617-48626
96. Carey, G. B. (1998) Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* **441**:157-170
97. Conti, M. and Beavo, J. (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* **76**:481-511
98. Sarzani, R., Marcucci, P., Salvi, F., Bordicchia, M., Espinosa, E., Mucci, L., Lorenzetti, B., Minardi, D., Muzzonigro, G., Ssi-Fulgheri, P., and Rappelli, A. (2008) Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int J Obes (Lond)* **32**:259-267
99. Jones, B. H., Standridge, M. K., and Moustaid, N. (1997) Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* **138**:1512-1519

100. Darimont, C., Vassaux, G., Ailhaud, G., and Negrel, R. (1994) Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* **135**:2030-2036
101. Shi, Y. and Burn, P. (2004) Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* **3**:695-710
102. 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**:639-672
103. Xue, B., Greenberg, A. G., Kraemer, F. B., and Zemel, M. B. (2001) Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J* **15**:2527-2529
104. Garg, R. and Pandey, K. N. (2003) Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription. *Hypertension* **41**:730-736
105. Belo, N. O., Sairam, M. R., and Dos Reis, A. M. (2008) Impairment of the natriuretic peptide system in follitropin receptor knockout mice and reversal by estradiol: implications for obesity-associated hypertension in menopause. *Endocrinology* **149**:1399-1406
106. Moro, C., Polak, J., Hejnova, J., Klimcakova, E., Crampes, F., Stich, V., Lafontan, M., and Berlan, M. (2006) Atrial natriuretic peptide stimulates lipid mobilization during repeated bouts of endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**:E864-E869

107. Perez-Matute, P., Neville, M. J., Tan, G. D., Frayn, K. N., and Karpe, F. (2009) Transcriptional Control of Human Adipose Tissue Blood Flow. *Obesity (Silver Spring)*
108. Birkenfeld, A. L., Budziarek, P., Boschmann, M., Moro, C., Adams, F., Franke, G., Berlan, M., Marques, M. A., Sweep, F. C., Luft, F. C., Lafontan, M., and Jordan, J. (2008) Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes* **57**:3199-3204
109. Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., and Carruba, M. O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**:896-899
110. Wang, T. J., Larson, M. G., Levy, D., Benjamin, E. J., Leip, E. P., Wilson, P. W., and Vasan, R. S. (2004) Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* **109**:594-600
111. Rubattu, S., Sciarretta, S., Ciavarella, G. M., Venturelli, V., De, P. P., Tocci, G., De, B. L., Ferrucci, A., and Volpe, M. (2007) Reduced levels of N-terminal-proatrial natriuretic peptide in hypertensive patients with metabolic syndrome and their relationship with left ventricular mass. *J Hypertens* **25**:833-839
112. Olsen, M. H., Hansen, T. W., Christensen, M. K., Gustafsson, F., Rasmussen, S., Wachtell, K., Borch-Johnsen, K., Ibsen, H., Jorgensen, T., and Hildebrandt, P. (2005) N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome. *Hypertension* **46**:660-666

113. Dessi-Fulgheri, P., Sarzani, R., Tamburrini, P., Moraca, A., Espinosa, E., Cola, G., Giantomassi, L., and Rappelli, A. (1997) Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens* **15**:1695-1699
114. Sarzani, R., Paci, V. M., Zingaretti, C. M., Pierleoni, C., Cinti, S., Cola, G., Rappelli, A., and Dessi-Fulgheri, P. (1995) Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens* **13**:1241-1246
115. Dessi-Fulgheri, P., Sarzani, R., Serenelli, M., Tamburrini, P., Spagnolo, D., Giantomassi, L., Espinosa, E., and Rappelli, A. (1999) Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives. *Hypertension* **33**:658-662
116. Wang, T. J., Larson, M. G., Keyes, M. J., Levy, D., Benjamin, E. J., and Vasan, R. S. (2007) Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. *Circulation* **115**:1345-1353
117. Verspohl, E. J. and Bernemann, I. K. (1996) Atrial natriuretic peptide (ANP)-induced inhibition of glucagon secretion: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. *Peptides* **17**:1023-1029
118. Steinhilber, M. E., Cochrane, K. L., and Field, L. J. (1990) Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* **16**:301-307
119. John, S. W., Kregge, J. H., Oliver, P. M., Hagaman, J. R., Hodgin, J. B., Pang, S. C., Flynn, T. G., and Smithies, O. (1995) Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* **267**:679-681

120. Wang, D., Oparil, S., Feng, J. A., Li, P., Perry, G., Chen, L. B., Dai, M., John, S. W., and Chen, Y. F. (2003) Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension* **42**:88-95
121. Honrath, U., Chong, C. K., Melo, L. G., and Sonnenberg, H. (1999) Effect of saline infusion on kidney and collecting duct function in atrial natriuretic peptide (ANP) gene "knockout" mice. *Can J Physiol Pharmacol* **77**:454-457
122. Oliver, P. M., John, S. W., Purdy, K. E., Kim, R., Maeda, N., Goy, M. F., and Smithies, O. (1998) Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2547-2551
123. Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., Kim, H. S., Reddick, R. L., Pandey, K. N., Milgram, S. L., Smithies, O., and Maeda, N. (1997) Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14730-14735
124. Lopez, M. J., Wong, S. K., Kishimoto, I., Dubois, S., Mach, V., Friesen, J., Garbers, D. L., and Beuve, A. (1995) Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* **378**:65-68
125. Kilic, A., Velic, A., De Windt, L. J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H. A., van, E. M., Schlatter, E., and Kuhn, M. (2005) Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* **112**:2307-2317

126. Holtwick, R., van, E. M., Skryabin, B. V., Baba, H. A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M. D., Garbers, D. L., and Kuhn, M. (2003) Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* **111**:1399-1407
127. Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Potthast, R., Zetsche, B., Hammer, R. E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002) Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7142-7147
128. Sabrane, K., Kruse, M. N., Fabritz, L., Zetsche, B., Mitko, D., Skryabin, B. V., Zwiener, M., Baba, H. A., Yanagisawa, M., and Kuhn, M. (2005) Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest* **115**:1666-1674
129. Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D. L. (2001) A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2703-2706
130. Ogawa, Y., Itoh, H., Tamura, N., Suga, S., Yoshimasa, T., Uehira, M., Matsuda, S., Shiono, S., Nishimoto, H., and Nakao, K. (1994) Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* **93**:1911-1921
131. Suda, M., Ogawa, Y., Tanaka, K., Tamura, N., Yasoda, A., Takigawa, T., Uehira, M., Nishimoto, H., Itoh, H., Saito, Y., Shiota, K., and Nakao, K. (1998)

Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide.

Proc Natl Acad Sci U S A **95**:2337-2342

132. Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H., and Katsuki, M. (2000) Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4239-4244

133. Chusho, H., Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Suda, M., Miyazawa, T., Nakamura, K., Nakao, K., Kurihara, T., Komatsu, Y., Itoh, H., Tanaka, K., Saito, Y., Katsuki, M., and Nakao, K. (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4016-4021

134. Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M., Tamura, N., Ogawa, Y., and Nakao, K. (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* **10**:80-86

135. Tamura, N., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., Shelton, J. M., Richardson, J. A., and Garbers, D. L. (2004) Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17300-17305

136. Langenickel, T. H., Buttgerit, J., Pagel-Langenickel, I., Lindner, M., Monti, J., Beuerlein, K., Al-Saadi, N., Plehm, R., Popova, E., Tank, J., Dietz, R., Willenbrock, R., and Bader, M. (2006) Cardiac hypertrophy in transgenic rats expressing a dominant-negative mutant of the natriuretic peptide receptor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4735-4740

137. Matsukawa, N., Grzesik, W. J., Takahashi, N., Pandey, K. N., Pang, S., Yamauchi, M., and Smithies, O. (1999) The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7403-7408
138. Dutil, J. and Deng, A. Y. (2001) Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol Genomics* **6**:3-9
139. Pausova, Z., Gaudet, D., Gossard, F., Bernard, M., Kaldunski, M. L., Jomphe, M., Tremblay, J., Hudson, T. J., Bouchard, G., Kotchen, T. A., Cowley, A. W., and Hamet, P. (2005) Genome-wide scan for linkage to obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* **46**:1280-1285
140. Hamet, P., Merlo, E., Seda, O., Broeckel, U., Tremblay, J., Kaldunski, M., Gaudet, D., Bouchard, G., Deslauriers, B., Gagnon, F., Antoniol, G., Pausova, Z., Labuda, M., Jomphe, M., Gossard, F., Tremblay, G., Kirova, R., Tonellato, P., Orlov, S. N., Pintos, J., Platko, J., Hudson, T. J., Rioux, J. D., Kotchen, T. A., and Cowley, A. W., Jr. (2005) Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am J Hum Genet* **76**:815-832
141. Newton-Cheh, C., Larson, M. G., Vasan, R. S., Levy, D., Bloch, K. D., Surti, A., Guiducci, C., Kathiresan, S., Benjamin, E. J., Struck, J., Morgenthaler, N. G., Bergmann, A., Blankenberg, S., Kee, F., Nilsson, P., Yin, X., Peltonen, L., Vartiainen, E., Salomaa, V., Hirschhorn, J. N., Melander, O., and Wang, T. J. (2009) Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet* **41**:348-353

142. Burnett, J. C., Jr., Kao, P. C., Hu, D. C., Hesser, D. W., Heublein, D., Granger, J. P., Opgenorth, T. J., and Reeder, G. S. (1986) Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* **231**:1145-1147
143. Yandle, T. G., Richards, A. M., Gilbert, A., Fisher, S., Holmes, S., and Espiner, E. A. (1993) Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* **76**:832-838
144. Richards, A. M., Lainchbury, J. G., Troughton, R. W., Espiner, E. A., and Nicholls, M. G. (2004) Clinical applications of B-type natriuretic peptides. *Trends Endocrinol Metab* **15**:170-174
145. Makikallio, A. M., Makikallio, T. H., Korpelainen, J. T., Vuolteenaho, O., Tapanainen, J. M., Ylitalo, K., Sotaniemi, K. A., Huikuri, H. V., and Myllyla, V. V. (2005) Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke* **36**:1016-1020
146. Wazni, O. M., Martin, D. O., Marrouche, N. F., Latif, A. A., Ziada, K., Shaaraoui, M., Almahameed, S., Schweikert, R. A., Saliba, W. I., Gillinov, A. M., Tang, W. H., Mills, R. M., Francis, G. S., Young, J. B., and Natale, A. (2004) Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* **110**:124-127
147. Doust, J. A., Pietrzak, E., Dobson, A., and Glasziou, P. (2005) How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* **330**:625
148. Cusson, J. R., Thibault, G., Cantin, M., and Larochelle, P. (1990) Prolonged low dose infusion of atrial natriuretic factor in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens A* **12**:111-135

149. Hirata, Y., Ishii, M., Sugimoto, T., Matsuoka, H., Fukui, K., Sugimoto, T., Yamakado, M., Tagawa, H., Miyata, A., Kangawa, K., and . (1988) Hormonal and renal effects of atrial natriuretic peptide in patients with secondary hypertension. *Circulation* **78**:1401-1410
150. Hamet, P., Testaert, E., Palmour, R., Laroche, P., Cantin, M., Gutkowska, J., Langlois, Y., Ervin, F., and Tremblay, J. (1989) Effect of prolonged infusion of ANF in normotensive and hypertensive monkeys. *Am J Hypertens* **2**:690-695
151. Lin, K. F., Chao, J., and Chao, L. (1995) Human atrial natriuretic peptide gene delivery reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* **26**:847-853
152. Cody, R. J., Atlas, S. A., Laragh, J. H., Kubo, S. H., Covit, A. B., Ryman, K. S., Shaknovich, A., Pondolfino, K., Clark, M., Camargo, M. J., and . (1986) Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* **78**:1362-1374
153. Fifer, M. A., Molina, C. R., Quiroz, A. C., Giles, T. D., Herrmann, H. C., De, S., I, Clement, D. L., Kubo, S., Cody, R. J., Cohn, J. N., and . (1990) Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **65**:211-216
154. Weder, A. B., Sekkarie, M. A., Takiyuddin, M., Schork, N. J., and Julius, S. (1987) Antihypertensive and hypotensive effects of atrial natriuretic factor in men. *Hypertension* **10**:582-589

155. Kitashiro, S., Sugiura, T., Takayama, Y., Tsuka, Y., Izuoka, T., Tokunaga, S., and Iwasaka, T. (1999) Long-term administration of atrial natriuretic peptide in patients with acute heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* **33**:948-952
156. Hobbs, R. E., Miller, L. W., Bott-Silverman, C., James, K. B., Rincon, G., and Grossbard, E. B. (1996) Hemodynamic effects of a single intravenous injection of synthetic human brain natriuretic peptide in patients with heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **78**:896-901
157. Colucci, W. S., Elkayam, U., Horton, D. P., Abraham, W. T., Bourge, R. C., Johnson, A. D., Wagoner, L. E., Givertz, M. M., Liang, C. S., Neibaur, M., Hought, W. H., and LeJemtel, T. H. (2000) Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* **343**:246-253
158. Rayburn, B. K. and Bourge, R. C. (2001) Nesiritide: a unique therapeutic cardiac peptide. *Rev Cardiovasc Med* **2 Suppl 2**:S25-S31
159. Sackner-Bernstein, J. D., Kowalski, M., Fox, M., and Aaronson, K. (2005) Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* **293**:1900-1905
160. Sackner-Bernstein, J. D., Skopicki, H. A., and Aaronson, K. D. (2005) Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* **111**:1487-1491
161. Corti, R., Burnett, J. C., Jr., Rouleau, J. L., Ruschitzka, F., and Luscher, T. F. (2001) Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* **104**:1856-1862

162. Campese, V. M., Lasseter, K. C., Ferrario, C. M., Smith, W. B., Ruddy, M. C., Grim, C. E., Smith, R. D., Vargas, R., Habashy, M. F., Vesterqvist, O., Delaney, C. L., and Liao, W. C. (2001) Omapatrilat versus lisinopril: efficacy and neurohormonal profile in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension* **38**:1342-1348
163. Kostis, J. B., Packer, M., Black, H. R., Schmieder, R., Henry, D., and Levy, E. (2004) Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens* **17**:103-111

Figure Legends

Fig. 1 ANP modulates NPRA activity and expression. The receptor exists in a basal state where the two catalytic subunits are separated from each other. After hormone binding, global rearrangement of all domains allows the cyclase to join and convert GTP to cGMP. Modulation of active receptors can occur in two distinct ways. The desensitization mechanism involves rapid dephosphorylation of the kinase domain which stops GTP conversion to cGMP without affecting receptor numbers. Chronic ANP stimulation causes receptor downregulation through the inhibition of gene transcription triggered by cGMP accumulation. Transcriptional inhibition is mediated by cGMP-RE and involves an unknown pathway.

Fig. 2 ANP-dependent VSMC relaxation. ANP is able to relax VSMC through PKG-I activation. The kinase phosphorylates several targets that are linked to cytoplasmic calcium content. Calcium is sequestered by the phosphorylation of plasma membrane calcium-ATPase (Ca^{2+} -ATPase), and the sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase (SERCA) pump lowers cytoplasmic calcium concentration. Blockade of the IP_3 receptor and the voltage-dependent calcium channel (VDCC) prevents calcium entry. Phosphorylation of the calcium-activated potassium channel (BKCa) causes membrane hyperpolarization through increased potassium efflux. Activation of myosin light chain phosphatase (MLCP) by PKG-I releases contraction and lowers calcium sensitivity. MLC (myosin light chain), MLCK (myosin light chain kinase)

Fig. 3 Antagonistic effects of ANP and angiotensin II stimulation in human adipocytes. NPRA stimulation triggers lipolysis through cGMP production and protein kinase G (PKG) activation. Subsequent phosphorylation of hormone-sensitive lipase (HSL) and perilipin by PKG breaks up triacylglycerol into free fatty acids

(FFA) and glycerol. However, this pathway can be inhibited by angiotensin II stimulation through calcium elevation and. Thus, Ca^{2+} activates phosphodiesterase-3B (PDE3B) which hydrolyzes cGMP to release GMP. The antagonistic effects of angiotensin II also derive from its ability to produce triacylglycerol (TAG). Angiotensin II stimulation induces the transcription of fatty acid synthase (FAS), the starting enzyme of the lipogenesis pathway. Lipogenesis pathway abbreviations: SA-CoA (stearic acid-CoA), SCDA1 (stearoyl-CoA desaturase-1), OA-CoA (oleic acid-CoA), ACS (acyl-CoA synthase), GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), LPA (lysophosphatidic acid), AGPAT (acylglycerol-3-phosphate acyltransferase), PA (phosphatidic acid), PAP (phosphatidic-acid phosphohydrolase), DAG (diacylglycerol), MGAT (monoacylglycerol acyltransferase), MAG (monoacylglycerol), DGAT (diacylglycerol acyltransferase)

Figure 1

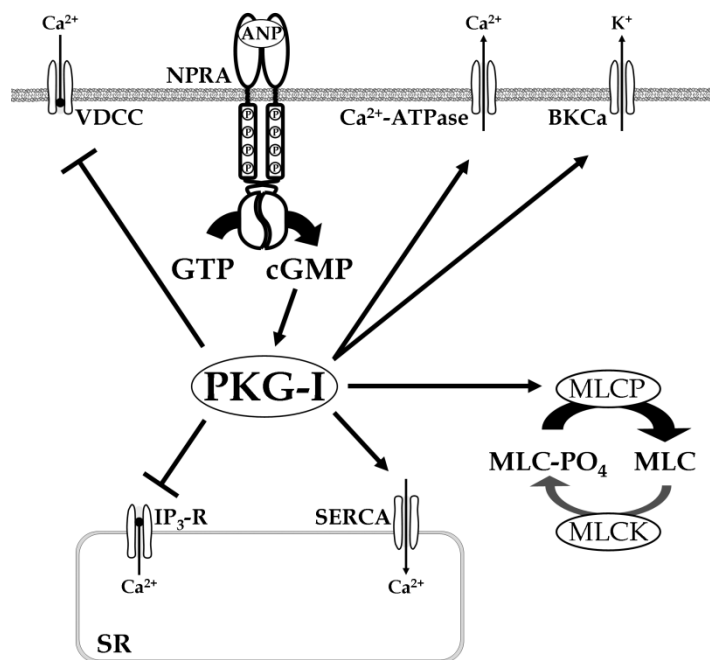


Figure 2

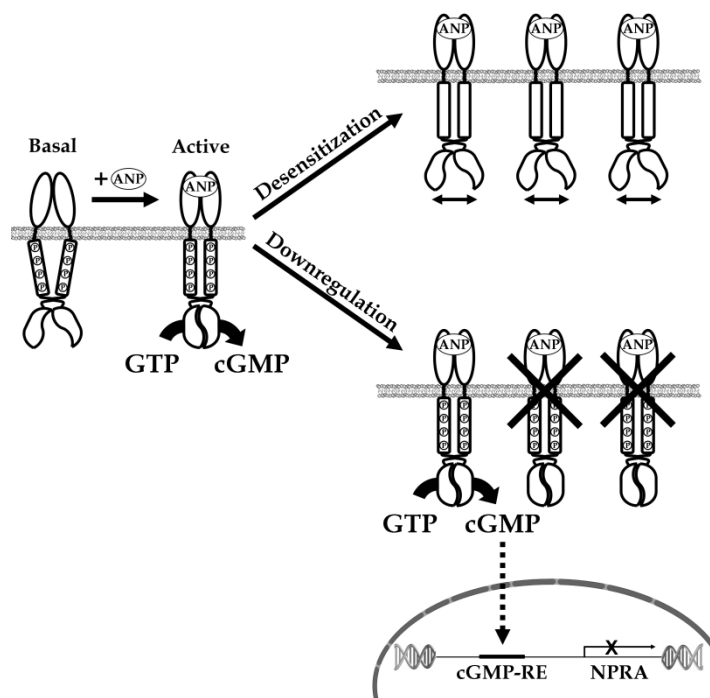
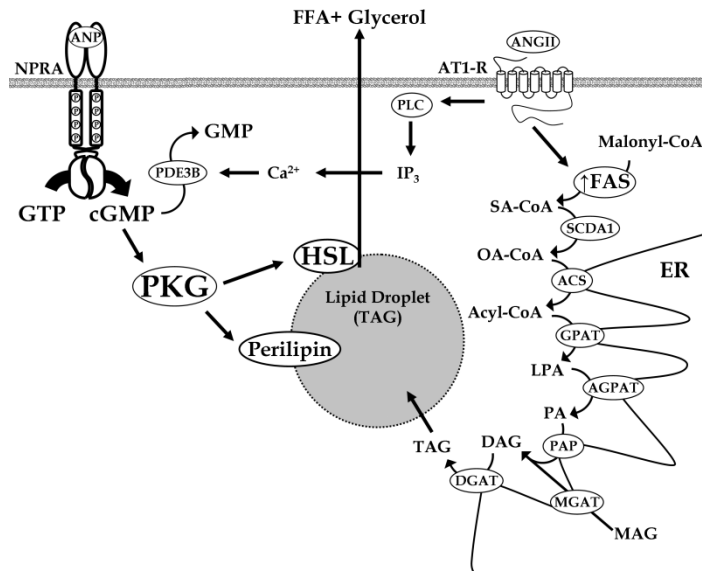


Figure 3



Annexe II

Article publié dans:

The Journal of Biological Chemistry, 2010 Jul 2;285(27):20926-39

**GREBP: A cGMP RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN
REPRESSING THE TRANSCRIPTION OF NATRIURETIC PEPTIDE
RECEPTOR 1 (NPR1/GCA)**

Guy Martel, Pavel Hamet and Johanne Tremblay

Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),
Montréal, Québec, Canada

Running title: GREBP is a novel transcription repressor

Natriuretic peptide receptor 1 (NPR1/GCA) expression is controlled by several agents, including atrial natriuretic peptide (ANP). After ANP stimulation, NPR1/GCA down-regulates the transcriptional activity of its gene via a cGMP-dependent mechanism. Since we previously identified a cis-acting element responsible for this cGMP sensitivity, we proceed here to explore novel putative protein binding to cGMP-response element (cGMP-RE). Using the yeast-one-hybrid technique with a human kidney cDNA library, we identified a strong positive clone able to bind cGMP-RE. The clone was derived from 1083-bp long cDNA of a gene of yet unknown function localized on human chromosome 1 (1p33.36). We named this new protein GREBP for cGMP-Response Element-Binding Protein. DNA-binding assays showed 18-fold higher cGMP-RE-binding capacity than the controls while electromobility shift assay indicated a specific binding for the cGMP-RE and ChIP confirmed the binding of GREBP to the element under physiological conditions. By acting on cGMP-RE, GREBP inhibited the expression of a luciferase-coupled NPR1 promoter construct. In H295R cells, ANP heightened GREBP expression by 60% after just 3 hours of treatment while inhibiting NPR1/GCA expression by 30%. Silencing GREBP with specific small interfering RNA increased the activity of the luciferase-coupled NPR1 promoter and GCA/NPR1 mRNA levels. GREBP is a nuclear protein mainly expressed in the heart. We report here the existence of a human specific gene which acts as a transcriptional repressor of NPR1/GCA gene.

Atrial natriuretic peptide (ANP) was discovered 25 years ago by the group of Adolfo J. de Bold (1). Our own team initially demonstrated that cGMP was the signaling pathway of this new hormone (2) acting via particulate guanylyl cyclase (3).

Produced in atrial granules, ANP is a small peptide of 28 amino acids that serves as a regulator of blood pressure and blood volume via its natriuretic and vasodilatory actions (1,4). ANP causes the relaxation of vascular muscles, leading to decreased blood pressure (5,6). The natriuretic and diuretic effects of ANP on volume homeostasis are achieved through the regulation of water and sodium excretion by the kidneys (7). ANP has also been described as a strong inhibitor of cell growth and hypertrophy (8,9) as well as a potent antagonist of the renin-angiotensin-aldosterone system via its inhibitory action on aldosterone synthesis by the adrenals (10). Recently, ANP was linked to lipid metabolism as the peptide can stimulate lipolysis through the activation of perilipin and hormone-sensitive lipase (11). In addition to ANP, the natriuretic peptide system includes 2 other members, brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP) (12,13) (for recent review, see Martel, Hamet, Tremblay (14)).

ANP binds to its receptor and stimulates its intracellular guanylyl cyclase (GC) domain. The ANP receptor has been named natriuretic peptide receptor 1 or guanylyl cyclase A (NPR1/GCA), a 130-kDa transmembrane protein that converts GTP to the intracellular second messenger cGMP (15,16). The active NPR1/GCA receptor is a homodimer containing an extracellular ANP-binding domain at its amino-terminal end and an intracellular GC domain at its carboxy-terminal end (17). The receptor is also able to transduce signals from BNP but is insensitive to CNP stimulation; the latter exerts its effects through a second receptor that shares the same topology as NPR1/GCA, guanylyl cyclase B (GCB or NPR2), which preferentially binds CNP (18,19). Synthesized cGMP molecules then bind to target proteins, including the cGMP-dependent protein kinases (PKG) I and II, the cyclic-nucleotide gated ion

channels and the cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) (20) which we initially discovered as cGMP-binding activity (21). cGMP also regulates the expression of tumor necrosis factor-alpha, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase (22-27). cGMP is now recognized as a second messenger regulating many cellular functions. Transcriptional regulation by cGMP has been shown to occur both directly and indirectly. Indirect control affects upstream signalling pathways modulating specific targets; for example, activation of mitogen-activated protein kinases by cGMP controls several transcription factors, such as cAMP response-element binding protein (CREB), ternary complex factor, activating transcription factor-2 (ATF-2) and c-jun (28-30). Direct control by cGMP involves PKG-dependent phosphorylation of proteins such as CREB, ATF-1, the multi-functional transcription factor TFII-I and nuclear factor-kappa B (31-34).

NPR1/GCA expression can be down-regulated by the intracellular accumulation of cGMP under the control of endothelins, glucocorticoids, angiotensin II and by the natriuretic peptides themselves (15,35-38). The effect of cGMP on NPR1/GCA consists in a retro-inhibition loop that down-regulates the transcriptional activity of NPR1/GCA gene upon stimulation by ANP or cGMP analogs (39,40).

Our group has recently reported the existence of a cGMP-response element (cGMP-RE) located in the promoter of NPR1/GCA gene which is responsible for the ANP-NPR1/GCA retro-inhibition loop. We have defined a short consensus sequence of 18 bp for this cGMP-RE, AaAtRKaNTTCaAcAKTY, between positions -1372 and -1354 of the NPR1/GCA promoter. The sequence has been initially identified in the rat genome but is also found in mice (95% homology) and humans (75% homology).

Deletion of this DNA-responsive element increases the transcriptional activity of the NPR1/GCA promoter by more than 40% (39).

This study identifies the first protein that binds to cGMP-RE and that inhibits the transcriptional activity of NPR1/GCA gene. We named the novel transcription repressor GREBP for cGMP-Response Element-Binding Protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

General procedures — All plasmids produced were subcloned in DH5 α bacterial strain and purified with Qiagen maxi prep kit (Mississauga, Ontario, Canada) or Invitrogen's Purelink maxi prep kit (Burlington, Ontario, Canada). Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen), followed by DNaseI treatment (20 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 U/mL RNaseOUT, 0.2 U/ μ L DNaseI), and re-extracted with Trizol Reagent. sqRT-PCR (semi-quantitative RT-PCR) was performed with M-MLV RT kit (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) and Ambion's Quantum RNA 18S internal standards (Austin, TX, USA).

Yeast-one-hybrid screening of a human kidney cDNA library — A human kidney cDNA library was obtained from Clontech (Mountain View, CA, USA) as pACT2 plasmids already transformed in the bacterial strain BNN132. The library was titrated, and the colonies were expanded in 30-150 mm petri dishes to produce maximal amounts of pACT2 plasmids. Plasmids were extracted and purified with Qiagen Gigaprep kit. One-hybrid screening was conducted with the Matchmaker One-Hybrid System from Clontech. Human cGMP-RE (5'-

AGGAAATGTA CTTCAACATTCTGC-3') was used as bait. The bait sequence was synthesized in 3 copies and cloned between the EcoRI and MluI site of pHISi, and the EcoRI and SalI site of pLACZi. Plasmids pHISi-hcGMP-RE and pLACZi-hcGMP-RE were introduced in the genome of the yeast strain YM4271 by homologous recombination, and colonies were selected for growth on histidine/uracil-deficient synthetic dextrose medium. The new yeast strain, YM4271pHISipLACZi-hcGMP-RE, was then transformed with human kidney cDNA library plasmids to produce GAL4 activation domain fusion proteins. Colonies, selected for growth at 30°C on histidine/uracil/leucine-deficient medium, containing 55 mM of 3-amino-1,2,4-triazole, were tested for β -galactosidase expression by agarose overlay assays, as described in (41). Blue colonies were picked up, transferred in his/ura/leu-deficient liquid medium and allowed to grow at high optical density (O.D. ~2). Liquid cultures were then re-tested for β -galactosidase activity with ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG), a more sensitive assay, as described by the manufacturer; this classified the selected clones by the strength of interaction between the bait and the GALAD fusion protein, thus affecting reporter gene expression. We obtained a strong positive clone expressing high levels of the reporter genes; the pACT2 plasmid was then isolated from crude yeast lysate according to Clontech's protocol and transformed into DH5 α E. coli according to standard procedures. pACT2 plasmids were then isolated and sequenced with pACT2-sense (5'-TACCCATACGATGTTCCAGA-3') and pACT2-antisense (5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA -3').

Plasmids — Constructs encoding the GREBP sequence were generated by standard PCR methods with specific primers. pGEX-3X-GREBP was produced with the sense primer 5'-TTGGATCCTTATGAACCATAACCAATAC-3' and antisense

pGL3b plasmid (Promega, Madison, WI, USA). The cGMP-RE deleted form of the hNPR1/GCA promoter (hGCAP(Δ cGMP-RE)-pGL3b) was created with hGCAP-pGL3b as template. cGMP-RE was removed by jumping PCR with the sense primer 5'-AGTCTCCTAAAATTCCATATATGTAGTCTGTCTACACAGAATACCT-3' and antisense primer 5'-GTATTCTGTGTAGACAGACTACATATATGGAATTTTAGGAGACTTG-3'.

Jumping PCR allows removal of the cGMP-RE sequence while preserving the structural components of the promoter by cutting down 2 full turns (20 bp) of the plasmid. Silencing plasmids were generated with pSilencer 2.0-U6 (Ambion) by annealing and cloning inserts for small hairpin RNA (shRNA) at the BamHI/HindIII site. Control plasmid pSilencer 2.0-U6 NT (Non-Target) contains the upstream sequence 5'-GATCC CAGTGCTGGTACTTGTACTTCTCTTGAAAGTACAAGTACCAGCACTGTTTT TTTGGAAA -3' and the downstream sequence 5'-AGC TTTTCCAAAAAACAGTGCTGGTACTTGTACTTTCAAGAGAAGTACAAGT ACCAGCACTGG-3'. The non-target shRNA sequence was designed for its ability to activate the interference RNA pathways without targeting any gene, allowing rapid screening of gene-specific iRNA, as used successfully by many groups (43-45). The plasmid producing shRNA directed against GREBP was named pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP and was created with the upstream sequence 5'-GATCCATGGGCCATTATCGAAGAATTCAAGAGATTCTTCGATAATGGCCC ATTTTTTTGGAAA-3' and the downstream sequence 5'-AGC TTTTCCAAAAAATGGGCCATTATCGAAGAATCTCTTGAATTCTTCGATAA TGGCCCATG-3'.

Cell culture, stimulation and transfection — HEK293 (human embryonic kidney) and Hela (human cervical carcinoma) cells were purchased from ATCC (Rockville, MD, USA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's high glucose medium containing 10% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin, 2 g/l HEPES and 2.5 g/l sodium bicarbonate in a 5%P PCOR2R controlled atmosphere. NCI-H295R (human adrenocortical carcinoma, ATCC) cells were maintained in Ham's F12 medium containing 10% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin, 2.0 g/l HEPES and 2.5 g/l sodium bicarbonate. Transfections were performed with Fugene 6 (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

Primer extension and full length mRNA — Primer extension was conducted on HEK293 total RNA. Briefly, 5 μ g of HEK293 total RNA was M-MLV retro-transcribed with 45 fmole of specific radioactive antisense primer 5'-GGAGAGATTTGGTATATG-3'. The length of the extension was then compared to the sequence of pACT2 plasmid containing GREBP cDNA to calculate the number of unknown nucleotides in GREBP. pACT2 plasmid was sequenced by ThermoP Psequenase kit (GE Healthcare Bio-Sciences) and the same radioactive antisense primer. The total length of GREBP mRNA was then confirmed by PCR with the antisense primer 5'-GGTAGGAGTAGCGTGGTAAG-3' and 2 sense primers corresponding to regions -5/-25 (5'-GGTTATATCCTTCCCGTACT-3') or +1/+20 (5'-ATCCCCTGGCCCAACCCGTC-3') of GREBP cDNA.

GREBP functional studies — Tri-transfection assays were undertaken to study the effect of GREBP protein on NPR1/GCA promoter activity. The day before transfection, HEK293 cells were seeded in a 12-well plate (7x10⁴ cells/well), and plasmids hGCAP-pGL3p or hGCAP(Δ cGMP-RE)-pGL3b, pCDNA1-Neo and/or

pCDNA1-Neo-GREBP (for over-expression experiments), pSilencer 2.0-U6-NT or pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP (for silencing experiments) and internal control pCMV- β gal (Clontech) plasmids were transfected and allowed to grow for 24 hours. The cells were then lysed with Promega Reporter Buffer. Luciferase activity in the cell extract was quantified by 20/20n luminometer (Turnerbiosystem, Sunnyvale, CA, USA), and β -galactosidase activity was measured with o-nitrophenyl-D-galactopyranoside as substrate (46). GREBP mRNA over-expression was confirmed by sqRT-PCR with the sense primer 5'-CTTGGTACCGAGCTCGGATC-3' targeting the 5'untranslated region (5'UTR) generated by pCDNA1-Neo-GREBP plasmid and the antisense primer 5'- TTGCGGCCGCTTAGCGTTGTACGGTAGAAC-3'. GREBP-silencing experiments were performed with pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP and control plasmid pSilencer 2.0-U6-NT. In 6-well plates, HEK293 cells (1.7×10^5 cells/well) were transfected with either 1 μ g of NT or shRNA plasmid and allowed to grow for 24 hours before lysis. Expression levels were determined by sqRT-PCR with GREBP sense and anti-sense primers 5'-TCACTTCTGAGTCCCAGAGG-3' and 5'-GGTAGGAGTAGCGTGGTAAG-3', while NPR1/GCA expression was measured with 5'-ATCCAAGTGCCTGGTAGATGGG-3' and 5'-ATTCGGAAGGAGCGCACAGCAT-3' as sense and anti-sense primers.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay — ChIP was performed as described by Weinmann and Farnhan (47). Briefly, 5×10^6 HEK293 cells were seeded in a T-75 flask and transfected with peGFP or peGFP-GREBP and allowed to grow for 12 hours. Cross-linking was performed by adding 1% (v/v) formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature on a shaker and the reaction was stopped with 125mM

glycine for 5 min. After washing with ice-cold PBS, cells were allowed to swell 10 min at 4°C for nuclei isolation in 5mM PIPES pH8, 85mM KCl, 0.5% Igepal CA-630 (Sigma), 1 mM PMSF and 1x complete mini (Roche) protease inhibitor. After centrifugation, nuclei were re-suspended in nucleus lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1x complete mini protease inhibitor) and chromatin was fragmented by sonication using the Misonix sonicator 3000 (4x15 sec pulse at 90W). Debris were removed by centrifugation and supernatant was cleared with protein A Sepharose 6MB (GE healthcare, Piscataway, NJ, USA) for 1 hour at 4°C. Beads were pelleted and their supernatants were diluted in the antibody binding buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, 167 mM NaCl, and protease inhibitors) with 1µg of normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, SC-2027) for the “no antibody” control or with 1µg of rabbit anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology, SC-8334) and rocked overnight at 4°C. Before precipitation, one tenth of the supernatant was kept aside for the PCR reaction of the the “input fraction”. Precipitation of the DNA-protein-antibody complexes was done by centrifugation after the addition of protein A Sepharose for 1 hr at 4°C. The pellets were washed twice with 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% N-lauryl sarcosyl and 1 mM PMSF then 4 times in 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM LiCl, 1% deoxycholate and 1 mM PMSF. Elution of complexes was obtained by the addition of elution buffer (50 mM NaHCO₃, 1% SDS) and crosslink was reverse by incubating the samples 1 hr at 37°C with RNase A followed by an overnight digestion with proteinase K at 67°C. Next morning, samples were purified using the Illustra GFX purification column (GE Healthcare) and eluted in 50 µl Tris buffer. PCR were performed using 1µl of purified DNA using the sense primer 5’-

GGCCTATCGACCACAATT-3' and antisense primer 5'-TCATTCTGCTTGGATTGGG-3' respectively located at -40bp and +78bp of the cGMP-RE. PCR products were analyzed by 2% agarose gels containing ethidium bromide.

In vitro binding assays — pGEX-3X-GREBP or pGEX-3X was transformed into Rosetta bacterial strain (Novagen, Mississauga, Ontario, Canada) and grown in Terrific Broth (12 g/L tryptone, 24 g/L yeast extract, 0.4% glycerol, 2.31 g/L KHR2RPOR4R, 12.54 g/L KR2RHPOR4R) until 600 nm absorbance reached 0.5; proteins were induced with the addition of 1 mM IPTG to the liquid culture for 2 hours to produce GST or GST-GREBP proteins. Bacterial extracts were prepared as described by Schimtzter *et al.* (48). 1-mL columns of Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences) were prepared according to the manufacturer's protocols. Bacterial extracts were applied onto the matrix and washed with 5 volumes of PBS to remove unbound proteins. For Western blot experiments, 30 μ L of GST or GST-GREBP resin slurry were electrophoresed and transferred onto nitrocellulose according to a standard procedure. The membrane was blocked overnight in 1X TBS and 5% non-fat milk, and the 1PstP antibody (anti-GST, dilution 1/8000, SC-459, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was added for 1 hour in 1X TBS, 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20 at room temperature and followed by 3 X 10-minutes washes in 1X TBS and 0.05% Tween 20. We used a goat anti-rabbit (dilution 1/15000, SC-2004, 1X TBS, 5% non-fat milk, 0.05% Tween 20) secondary antibody followed again by 3 X 10-minute washes (1X TBS, 0.05% Tween 20). Bound protein content was determined by the Bradford method. For the binding assays, resin was poured into the column, and 5 mL of binding buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 35 mM

KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT) containing 10 ng of Klenow P32PP-labeled double-stranded rat consensus cGMP-RE (5'-AAAATAGATTTCAACAG-3') sequence were then added and incubated for 1 hour at room temperature. After incubation, the columns were drained and washed twice with 5 mL of binding buffer to remove excess radioactive probes. After washing, 250X excess of cold probe in 5 ml of binding buffer was added and incubated for 1 hour. The columns were then drained, and radioactivity was measured at each step.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) — HEK293 cells were transfected with pCDNA1-Neo-GREBP or control plasmid pCDNA1-Neo. Nuclear extracts were prepared as described previously (39). The 18bp-long consensus double-stranded human (5'-AAATGTACTTCAACATTC-3'), rat (5'-AAATAGATTTCAACAGTT-3') or mouse (5'-AAATAGACTTCAACAGTT-3') cGMP-RE probes were P32PP-labeled and purified. For probe conformational studies, we used the 24-bp long cGMP-RE double-stranded sequence previously defined (39). Human (H24: 5'-AGGAAATGTACTTCAACATTCTGC-3'), rat (R24: 5'-AGAAAATAGATTTCAACAGTTTGC-3'), mouse (M24: 5'-AGAAAATAGACTTCAACAGTTTGC-3') and two 24bp-long mutated probes corresponding to the shared sequence between rat and mouse cGMP-RE with nucleotide changes at position 11 (P1: 5'-AGAAAATAGAATTCAACAGTTTGC-3' and P2: 5'-AGAAAATAGAGTTCAACAGTTTGC-3'). 35,000 CPM of probes and 500 ng of poly dI-dC were added to 5 µg of nuclear extracts in a total volume of 18 µL of binding buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 35 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT, 300 µg/mL BSA, 12.5% glycerol) and incubated for 30 minutes at room temperature. Supershift experiments were performed using two tagged constructs of

GREBP. 5 μ g of nuclear protein extracts of GREBP-StrepTagII expressing cells were incubated with 1 μ g of mouse StreptagII monoclonal antibody (resuspended in PBS) (Novagen, Gibbstown, NJ, USA, cat#71590) or 1 μ g of BSA/PBS as control and, similarly, nuclear extracts of GREBP-HisTag expressing cells were incubated with 0.5 μ g of rabbit His-probe antibody (Santa Cruz Biotechnology, SC-803) or with 0.5 μ g of normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, SC-2027) as control. Antibodies or controls were added either 10 minutes before or 20 minutes after the P32PP-labeled probe and 100 ng of poly dI-dC. Samples were incubated for a total of 30 minutes at room temperature in 18 μ L of supershift binding buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 25 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 4% glycerol). The samples were resolved by 4.5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 4°C to prevent overheating. The gels were dried and exposed for PhosphoImager scanning.

Fluorescence microscopy — HEK293 cells were transfected with peGFP or peGFP-GREBP and allowed to grow for 12 hours. They were then treated as described previously (49) and viewed with a Olympus IX71 Inverted Microscope at 40X magnification.

GREBP and NPR1/GCA expression analysis — Hela cells and NCI-H295R cells were seeded in T-25 flasks at 1.0×10^6 and 1.5×10^6 cells respectively and grown until near confluency, synchronized by 24-hour serum starvation, and then stimulated with acetic acid (vehicle) or ANP for the times indicated. RNA was extracted to perform sqRT-PCR experiments. GREBP and NPR1/GCA expression was measured by sqRT-PCR with the same previously-mentioned primer. The data

are expressed as percentages of ANP-stimulated cells compared to vehicle-treated cells.

Multiple tissue expression (MTE) analysis — Human MTE arrays were purchased from Clontech. A 350-bp fragment, corresponding to the coding region of GREBP, was generated by PCR with the sense primer 5'-CGCCGGATCCATGAACCATAACCAATACTA-3' and anti-sense primer 5'-TTGCGGCCGCTTAGCGTTGTACGGTAGAAC-3'. This fragment was P32PP-labeled, with Klenow, hybridized to the membrane according to the manufacturer's instructions, and exposed 16 hours for PhosphoImager scanning.

RESULTS

Yeast-one-hybrid screening of a human kidney cDNA library — With human cGMP-RE as bait, we performed yeast-one-hybrid screening of a human kidney cDNA library (Figure 1A). A total of 60 clones able to grow on minimal media containing 55 mM 3-amino-1,2,4-triazole were tested for β -galactosidase production; 1 strongly positive clone was found to express high levels of the reporter gene; its β -galactosidase level was much higher than that of other clones (8.19 ± 1.6 vs 0.60 average units of ONPG/OD*min).

Gene, mRNA and protein — We then isolated pACT2 plasmid and sequenced the insert. Its sequence (Figure 1D) revealed a cDNA of 1060-bp containing a 48-bp long poly-A tail. Using GENBANK comparison via BLAST search, we located this gene on human chromosome 1 at position 1p36.33 (as a part of NT_004350.18) near the chromosomal region of ANP gene (1p36.21). As the DNA did not appear to

belong to any known gene or protein family, we putatively concluded that a novel gene was present, a gene we named GREBP, for cGMP-Response Element Binding Protein.

We performed primer extension assays to determine the total length of mRNA (Figure 1B); it added an extra 23 bp to our original sequence. We confirmed the sequence of these extra bp by RT-PCR with specific primers for the upstream -25/-5 region and for the +1/+20 region with HEK293 total RNA. No transcript corresponding to the -25/-5 region in RT-PCR was detected, even if we amplified the same region in DNA-control experiments (Figure 1C). These results revealed that the length of endogenous mRNA, including the poly-A tail, was 1083 bp and that the gene was transcribed as a single exon (Figure 1D).

Analysis of GREBP cDNA originally fused to the GAL4-AD gene of pACT2 plasmid showed the existence of an open reading frame of 348 bp, coding for a 115 amino acid long protein with a molecular mass of 13.2 kDa and an isoelectric point of 11.3. The 3'UTR contained 2 AU-rich elements (AREs) motifs known to be implicated in rapid mRNA degradation (Figure 1D, underlined bp) (50). Variation analysis with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) single nucleotide polymorphism (SNP) database revealed 24 SNP distributed within the GREBP gene (Table 1). The nucleotide and amino acid possibilities, in bold characters, are those from our original sequence. Even if population diversity is not provided for given variations, we can assume that SNP located within the coding region can have a strong impact on amino acid content and protein function while those located in the UTR can affect mRNA stability. Protein translation and amino acids analyzed with ExPASy tools indicated that GREBP contains many basic

residues (23/115) (Figure 1D, framed residues) characteristic of DNA-binding proteins. The protein sequence contains 6 serine residues that have a high probability of being phosphorylated ($>0.800/1$) and 1 threonine that could be strongly phosphorylated ($>0.900/1$) (Figure 1D, bolded residues) by protein kinases, including PKG (51), reinforcing the idea of GREBP's potential role in the cGMP signaling cascade.

GREBP binding to cGMP-RE —We confirmed the ability of this protein to bind the cGMP-RE, by immobilizing a GST-GREBP fusion protein or control GST onto a glutathione sepharose 4B matrix. Columns were gravity-drained, and a radioactive-labeled, double-stranded DNA probe corresponding to the consensus cGMP-RE was applied on the resin. After column-washing with binding buffer to remove unbound radioactive probe, bound radioactive probe was eluted from the resin by adding a 250-fold excess of cold probe. GST-GREBP resin retained more radioactivity than the GST column, as can be seen in the flow-through fraction (Figure 2A, left) while elution with the cold probe after washing demonstrated greater specific binding of the probe by the GST-GREBP column (Figure 2A, right). These experiments were repeated 3 times with similar results and, on average, we observed a 5-fold higher binding capacity of GST-GREBP compared to the GST columns (Figure 2A). We detected 3.5-fold more GST than GST-GREBP protein on the columns and, thus, after correction for the amount of protein present on the columns, we noted a 18-fold higher binding capacity of the cGMP-RE probe for the GST-GREBP protein compared to control GST (Figure 2B).

We then proceeded by EMSA, to determine the ability of intracellularly-expressed GREBP to bind cGMP-RE. HEK293 cells were stably-transfected with pCDNA1-

Neo-GREBP expressing the full length coding region of GREBP or the control empty plasmid pCDNA1-Neo. Nuclear proteins were isolated from transfected cells, and EMSA was performed, as described in the Experimental Procedures. We synthesized double-stranded, 18-bp and 24-bp long fragments corresponding to human, rat and mouse cGMP-RE and tested their potential for interaction with GREBP. Nuclear extracts from HEK293 cells were able to bind the 18-bp long human and rat but not the mouse probes as can be seen in Figure 3A. The arrow in Figure 3A represents specific interaction between cGMP-RE and over-expressed GREBP protein. Nuclear proteins from cells transfected with control plasmid (Neo) slightly bound the human radioactive probe (Figure 3A, lane 2) but GREBP over-expression led to an increase in binding capacity (Figure 3A, lane 3). This augmented binding was specific, as it could be competed for by an excess of cold human cGMP-RE; the addition of cold cGMP-RE DNA fragment decreased binding at 50X and returned it to the levels obtained with empty pCDNA1-Neo with 100X excess of cold probe (Figure 3A, lanes 4-5). We saw a similar pattern with the rat probe (Figure 3A, lanes 6-10). Binding to rat cGMP-RE was increased by GREBP over-expression in HEK293 cells, and the addition of 50- and 100-fold excess of rat cold probe reduced binding of the radioactive probe. We did not observe any band corresponding to GREBP-cGMP-RE interactions with the probe corresponding to the mouse cGMP-RE sequence (Figure 3A, lanes 11-15). We were intrigued by the different binding capacity of the rat and mouse probes despite only one nucleotide difference and investigated it further. We synthesized longer (24-bp long) probes corresponding to the human, rat and mouse sequences, and observed that GREBP, while keeping its binding capacity for the human 24-bp long probe (H24, Figure 3B, lane 3), was not able to bind the 24-bp

long rat (R24, Figure 3B, lane 4) and mouse (M24, Figure 3B, lane 5) probes. Replacing the nucleotide at position 11 as A or G respectively (P1 and P2) did not restore the binding capacity of the rat or mouse probe (lanes 6 and 7 of Figure 3B). These results demonstrate differences in binding of GREBP to the cGMP-RE probes. To confirm that GREBP is the protein involved in the DNA-protein complex formation in the nuclear extracts, we performed supershift experiments. For this purpose, we generated two tagged-GREBP proteins, each one coupled to a small epitope tag separated by a 3 amino acid linker. Over-expression of these two tagged proteins, GREBP-StrepTagII and GREBP-HisTag, in HEK293 cells led to the same pattern of DNA-protein and DNA-protein-antibody complexes as shown in Figure 3C and D; the addition of antibodies specific to the StrepTagII or the polyhistidine tags inhibited the formation of the cGMP-RE/GREBP complex when added prior to the radio-labeled probe (lanes 5 of Figure 3 C and D). We also noted that the inhibition of the cGMP-RE/GREBP complex formation was reduced when the antibodies were added after the radio-labeled cGMP-RE probe (lanes 7 of Figure 3C and D). By demonstrating that two antibodies directed towards two tagged-GREBP were able to inhibit the DNA-protein complex formation, we confirmed that GREBP is specifically involved in the formation of this complex. Taken together, these experiments demonstrated species-specific binding of GREBP to human cGMP-RE. Finally, we investigated the ability of GREBP to bind the cGMP-RE under physiological conditions by performing a chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay. We transfected cells with GFP-GREBP or GFP plasmid, fixed the protein-DNA interaction with formaldehyde and isolated the nuclear fraction. After immuno-precipitation (IP) with IgG or with anti-GFP antibody, we proceeded to PCR

amplification of the genomic region spanning the cGMP-RE in NPR1/GCA promoter. Figure 4A shows the presence of a band of 178 bp corresponding to the amplified (-1611 to -1433bp) region of the NPR1/GCA promoter in the input (before IP) as well as in the nuclear fraction of the GFP-GREBP transfected cells immunoprecipitated with anti-GFP antibody. Controls consisted of rabbit IgG (representing “no antibody” condition) or nuclear extracts of GFP overexpressing cells (representing control for GFP binding). No bands could be seen in these latter fractions. These results confirm that GREBP binds to a specific region spanning the cGMP-RE in the genome.

Cellular localization of GREBP — We transiently transfected HEK293 cells with peGFP-GREBP to localize GREBP protein. The control experiment, with empty peGFP vector, showed diffuse distribution of GFP (Figure 4B, upper panels). As expected for a DNA binding protein, peGFP-GREBP-transfected cells presented a nuclear accumulation of the GFP-GREBP protein overlapping with blue DAPI staining (Figure 4B, lower panel).

GREBP regulates NPR1/GCA promoter activity — We next examined whether GREBP indeed inhibits the transcriptional activity of the NPR1/GCA promoter by co-transfecting HEK293 cells (7x10⁴ cells/wells/12 wells) with region -2055 to +338 (cGMP-RE located at -1546 bp) of the human NPR1/GCA promoter, hGCAP-pGL3b and a plasmid encoding or not GREBP protein, pCDNA1-Neo-GREBP or pCDNA1-Neo, together with pCMV- β gal as an internal standard plasmid. The cells were transfected with 10 ng of pCMV- β gal, 200 ng of hGCAP-pGL3 and a total amount of 500 ng of pCDNA1 plasmids. Because plasmid quantity is known to affect transfection efficiency, we reduced inter-experiment variation by

keeping the total amount of pCDNA plasmids constant and varying only the ratio pCDNA1-Neo-GREBP:pCDNA1-Neo, allowing us to capture the specific effect of GREBP. Increasing the ratio of pCDNA1-Neo-GREBP over control plasmid pCDNA1-Neo leads to a dose-dependent increase in the level of GREBP expression and a concomitant decrease in luciferase activity of the NPR1/GCA promoter (Figure 5A). We next evaluated whether the effect of GREBP on cGMP-RE is specific by deleting cGMP-RE. We transfected HEK293 cells with 10 ng of pCMV- β gal, 500 ng of pCDNA1-Neo plasmids and 200 ng of hGCAP-pGL3b or the cGMP-RE deletion mutant, hGCAP(Δ cGMP-RE)-pGL3b plasmid. GREBP expression inhibited the intact NPR1/GCA promoter highly significantly ($p < 0.0001$) by more than 30% while it had no significant effect on the NPR1/GCA promoter without cGMP-RE (Figure 5B). We also noted that the deletion of cGMP-RE, a negative regulatory element, increased basal NPR1/GCA promoter activity by 175% (Neo versus Neo with and without cGMP-RE respectively, $p < 0.0001$). These experiments demonstrated that GREBP expression results in dose-dependent inhibition of luciferase activity of the NPR1/GCA/luciferase-coupled promoter and that GREBP-dependent inhibition of the NPR1/GCA promoter is mediated by cGMP-RE.

We next looked at the effect of silencing GREBP on NPR1/GCA expression levels. We first transfected HEK293 (1.7×10^5 cells/wells/6 wells) with 1 μ g of pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP or control plasmid pSilencer 2.0-U6-NT and let the cells grow for 24 hours before RNA extraction and sqRT-PCR. We found that specific shRNA directed to the 781-bp region of GREBP gene is able to significantly reduce ($p < 0.001$) (Figure 6A) its mRNA levels by 35% over the control plasmid. This decrease in GREBP mRNA levels is accompanied by a slight but significant increase

(15%) in endogenous NPR1/GCA mRNA levels (Figure 6B). Moreover, in luciferase experiments, the co-transfection of 10 ng pCMV- β gal with 200 ng hGCAP-pGL3 and 300 ng of 2.0-U6-shRNA-GREBP or control plasmid pSilencer 2.0-U6-NT elicits a 30% increase in NPR1/GCA promoter activity for GREBP-silenced cells compared to control cells (Figure 6C). Taken together, these experiments demonstrated that even partial inhibition of GREBP mRNA directly affects the NPR1/GCA promoter by up-regulating its activity, both for the endogenous promoter and for the luciferase-coupled one.

Effects of ANP on NPR1/GCA and GREBP mRNA expression — Since ANP is able to regulate the expression of its receptor, we tested the hypothesis that it could also affect GREBP expression levels as a possible intermediate of this action. We incubated HeLa cells with 100 nM ANP and observed a 2-fold increase in GREBP mRNA levels within 3 hours of incubation (Figure 7A). We confirmed this effect in another target cell line for ANP, NCI-H295R cells, which were incubated with a maximal concentration of ANP (100 nM) for the indicated times. After stimulation, they were lysed, RNA was extracted and subjected to sqRT-PCR assays with expression levels measured as summarized in Figure 7B. We completed several experiments and observed a 32% decrease in NPR1/GCA mRNA levels at 3 hours which reached 44% at 14 hours of ANP incubation (Figure 7C, circles) concomitantly with a transient but marked increase of GREBP mRNA levels, maximum of 162% at 3 hours compared to untreated cells, followed by a return to near baseline values by 6 hours and to 87% of basal levels at 14 hours of incubation with ANP (Figure 7C, diamonds). These results demonstrate that, in human adrenal cells, ANP binding to its receptor evokes rapid induction of GREBP expression which, via its binding to

cGMP-RE present in the NPR1/GCA promoter, inhibits NPR1/GCA transcription with a concomitant reduction of its mRNA levels.

GREBP MTE arrays — ANP exerts its various biological functions by binding to its receptor NPR1/GCA. We explored whether the pattern of GREBP expression in humans parallels that of ANP and/or NPR1/GCA in human MTE arrays. Each array contained 75 RNA samples from various P adult and fetal tissue sources. Their analysis showed that GREBP expression was lower in fetal than in adult samples. As for ANP, we found that GREBP is predominately expressed in the atria, ventricles, septum and apex of the heart (Figure 8).

DISCUSSION

Since NPR1/GCA plays a key role in transducing various biological functions including the natriuretic, vasodilatory and antiproliferative effects of ANP, a better understanding of its mechanism of regulation is essential. Two major processes control NPR1/GCA mRNA and protein levels. GC desensitization involves receptor dephosphorylation after stimulation by its ligand, ANP. This mechanism has been described in several models and is still at the center of many research projects. After short-term desensitization, the long-term path establishes itself through receptor down-regulation affecting transcriptional regulation of the gene. First described in the mid-1990s, the mechanism involves outcome at the level of the NPR1/GCA gene promoter.

We previously demonstrated the existence of cGMP-RE near the -1500-bp position in mouse, rat and human NPR1/GCA gene promoters (39). This short

element mediates the transcriptional down-regulation of NPR1/GCA receptor after incubation of the cells with ANP or cGMP analogs. We thus searched for putative binding proteins for this unique cGMP-RE. Here, we report the identification of the first protein which is able to bind cGMP-RE and control NPR1/GCA expression. We present several pieces of evidence in this report to support the hypothesis that GREBP is a transcriptional repressor of NPR1/GCA.

Using the yeast-one-hybrid system to screen a human kidney cDNA library, we isolated a clone coding for a protein that binds strongly to cGMP-RE serving as bait. The clone codes for a small protein of previously-unknown function that we named GREBP for cGMP-Response Element-Binding Protein. The gene is located on human chromosome 1 (1p36.33) close to the ANP gene region (1p36.21). It is interesting to know that several cross-interacting gene products are clustering in the same chromosomal region, leading to the hypothesis that, through evolution, GREBP and ANP genes were kept tightly together because of their strong functional relationship, as, for example, paraoxonase 1 and 2 genes (52). GREBP mRNA is transcribed as a single exon 1083-bp long, and polyadenylated with no splicing process. It has been shown that an elevated concentration of cGMP inhibits the maturation and mRNA splicing process through PKG-dependent phosphorylation of the splicing factor 1 (SF1) which prevents pre-spliceosome assembly (53). Thus, inhibition of the spliceosome machinery should not affect GREBP mRNA, and the protein could reach its target sites, reinforcing the idea that GREBP is involved in a cGMP-signaling pathway. Another interesting fact about this mRNA is the presence of 2 AREs at the 3'-UTR, which contributes to rapid mRNA decay. These elements are essential instability determinants for several early-response-gene mRNAs (54).

Tight control of gene expression in response to rapidly-changing cellular conditions is important and, as cGMP concentrations vary rapidly under control of the synthesizing enzymes GC and degrading enzymes PDEs, retro-inhibition loops have to rely on rapid and effective signaling pathways. Another surprising finding about this sequence is the high amount of SNP located within GREBP gene. In fact, the 1083-bp long transcript has 24 SNP listed in the NCBI SNP database. However, population diversity is not yet available for these variations. The 5'UTR does not contain any SNP, probably due to the important level of regulatory proteins and translation factors targeting this region and making any variation harmful. The coding region contains 14 SNP which can be as inoffensive as structurally relevant. Indeed, some of the variations can affect amino acid volume (Leu↔Phe), side chain charge levels (His↔Tyr), global protein structure (Pro↔Ser) and phosphate content by destroying or creating phosphorylatable residues. SNP located within the 3'UTR could have an impact on mRNA stability and half-life but, as for the coding region, further studies will be needed to determine which SNP affect GREBP functions.

Studies of derived amino acid sequence resulting from the translation of GREBP mRNA have led to certain assumptions regarding its possible functions. Indeed, the high number of basic amino acids is representative of DNA binding proteins (55,56). ANP-NPR1/GCA signaling results in PKG activation by cGMP and elicits the phosphorylation of downstream proteins. PKG is a serine/threonine kinase. Translational analysis of the gene product by ExPASy tools has revealed putative serine/threonine phosphorylation sites; it is thus possible that cGMP can activate GREBP through PKG-dependent phosphorylation.

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays demonstrated that GREBP can bind the cGMP-RE present in the human genome, moreover, this experiment shows that this protein-DNA interaction occurs under physiological conditions and that GREBP is a key protein involved in a, probably, larger complex. Indeed, in our EMSA experiments, the addition of an antibody directed towards the tagged GREBP inhibited its ability to bind the cGMP-RE only when the antibody was added prior to the radio-labeled probe. A similar phenomenon was reported and validated by other groups (57,58) for other DNA binding proteins. Interestingly, addition of antibody after the cGMP-RE probe had almost no effect on the DNA-GREBP complex formation; GREBP may undergo a conformational change upon DNA binding, act within a multi-protein complex or even homomultimerize around DNA. Further studies are needed to elucidate this mechanism.

Our *in vitro* DNA-binding experiments and EMSA showed that GREBP specifically binds the cGMP-RE. Initially, we observed that GREBP could bind the 18-bp long human and rat cGMP-RE probes but not the mouse one. This intrigued us as there are several differences in the sequence of the cGMP-RE between the human and rodents but only one nucleotide difference between rat and mouse cGMP-RE; a T/C change where the C nucleotide is present in both mouse and human cGMP-RE. So, we hypothesized that this lack of interaction between GREBP and the mouse probe was not dependent on the different nucleotide present in the rat/mouse cGMP-RE but on the *in vitro* conformational structure of the probe. To test this hypothesis, we synthesized longer cGMP-RE (24 bp-long) probes corresponding to the human, rat and mouse sequences and found that GREBP could bind only the 24-bp long probe corresponding to the human sequence. Longer probes exhibit different conformations

(A-, B- and Z-conformations, coiled and non-helical) as the number of DNA bp increases so, the difference in binding GREBP between the two rat cGMP-RE probes of different length could be explained by different conformations as nucleotide mutations did not restore the binding capacity of the 24-bp long rat or mouse probes (P1 and P2).

We did not detect any close analog to GREBP in the rat or mouse genome. Several facts can explain the absence of GREBP in the genome from rodent models. Transcriptional controls are different between humans and rodents, being usually more complex in humans; the 5'UTR of NPR1/GCA is shorter in humans and lacks an Inr element (59). Based on the fact that rat and mouse cells are able to down-regulate NPR1/GCA gene expression, we can assume that a protein with a similar role almost certainly exists in rodents. In fact, GREBP appears to be present in only 1 other known genome, the chimpanzee. Humans and chimpanzees share a high proportion of their genome; indeed, human ANP mRNA (NM_006172) is 845 bp long and is 98% homologous to 844 bp chimp ANP mRNA (NM_006468). Even if the chimpanzee NPR1/GCA gene has not yet been defined, a region (NW_001229599.1) of its genome is homologous at 99% for 4062 bp of 4246-bp long human NPR1/GCA mRNA (NM_000906). These 2 genes, ANP and NPR1, are co-localized on human and chimpanzee chromosome 1. By comparative genomics, we were able to find a chimpanzee version of human GREBP. This putative gene is also located on chromosome 1 (region NW_001229478.1) and has 89% homology with human GREBP. Translated chimpanzee GREBP protein appears to have the same characteristics as its human counterpart. The hypothetical chimpanzee GREBP is a 113 amino acid long protein, 82% homologous to that of humans, with a

molecular weight of 13.2 kDa and an isoelectric point of 11.1. Its protein sequence analysis reveals that 5 serines ($>0.750/1$) and 1 threonine ($>0.603/1$) could be phosphorylated by a serine/threonine protein kinase, including PKG. Additional studies are needed to determine if this putative chimp protein is involved in ANP-NPR1/GCA signaling pathways of the chimpanzee. Moreover, we can hypothesize that GREBP is a human specific gene and may be also present and functional in the chimpanzee ANP-NPR1/GCA pathway. First, it has been proposed that transcription factors/repressors have evolved differently in humans compared to other species (60) and, second, GREBP may belong to a younger age class. These genes, which usually control immunity, perception and signal transduction, are known to be shorter, intronless, and evolved faster than the older classes of gene present in every eukaryote cell and which runs translation, transcription and replication (61). Evidence that GREBP is really a young gene also came from the fact that only the chimpanzee genome seems to have a homologous GREBP gene and, in an evolutionary way, the chimp is the human's closest species with 4-5 million years separating the 2 groups. Cellular localization studies have shown that GREBP accumulates in the nuclear region of cells. Such compartmentalization is common for proteins associated with transcriptional activity; several studies have revealed that nuclear localization is highly associated with transcription factor function (62,63).

Our promoter-reporter experiments disclosed that GREBP expression inhibits NPR1/GCA promoter activity in a dose-dependent manner. Moreover, the inhibition caused by GREBP is entirely mediated through cGMP-RE, as demonstrated by the loss of effect of the promoter deletion mutant. In silencing experiments, targeting GREBP with specific shRNA reduced its mRNA levels with consequences on

NPR1/GCA regulation. Thus, even a small decrease in GREBP is associated with an increase in endogenous NPR1/GCA transcripts and, concomitantly, augmented activity of the NPR1/GCA luciferase-coupled promoter. Our results also indicate that NPR1/GCA promoter activity can be heightened by either a deletion of cGMP-RE in its promoter (Figure 5B) and/or by a reduction of GREBP levels (Figure 6C) with reciprocal regulation and an inverse relationship between GREBP and NPR1/GCA levels.

Endogenous elevations of GREBP mRNA levels are also related to ANP stimulation. Indeed, we were able to show a significant increase of GREBP within 3 hours of ANP incubation in 2 cell lines. This increase correlates with a marked decrease of the NPR1/GCA transcript. NPR1/GCA mRNA still continued to decline after longer ANP incubation but at a much lower pace than with 3 hours stimulation. GREBP levels fell after sustained ANP stimulation. Such a decrease in GREBP mRNA is probably under the control of factors, such as decay rate of GREBP mRNA (implication of AREs), cGMP levels, GREBP partners, trafficking of existing NPR1/GCA receptors, the early responsiveness character of GREBP and several others that remain to be identified. However, we provide strong evidence here for the implication of ANP in the regulation of both GREBP and NPR1/GCA gene expression.

GREBP is widely expressed in human tissues, such as the heart, thymus, brain and several endocrine glands. A protective role could explain its high level of expression in the heart. Indeed, over-expression in the heart could be protective against overstimulation of NPR1/GCA by ANP which normally exerts a negative inotropic effect on normal cardiac tissue (64). A constant cardiodepressant effect

would be dramatic, so control of GREBP expression through its early and transient response would allow an additional level of fine regulation of NPR1/GCA stimulation.

In conclusion, GREBP emerges as a new transcription repressor acting on unique cGMP-RE present in the NPR1/GCA promoter and controlling the expression of the major receptor of ANP, NPR1/GCA. GREBP (1p33.36) is the third interacting partner in the retro-inhibition loop co-located on chromosome 1 with ANP (1p33.21) and NPR1/GCA (1q21-22). Further proteomics and genetics studies are needed to determine the structural domain, protein partners, signaling pathways and gene mutation that could disable its repressive action.

REFERENCES

1. de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T., and Sonnenberg, H. (1981) *Life Sci* 28(1), 89-94
2. Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S. C., Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M., and Genest, J. (1984) *Biochem. Biophys. Res Commun* 123(2), 515-527
3. Tremblay, J., Gerzer, R., Pang, S. C., Cantin, M., Genest, J., and Hamet, P. (1986) *FEBS Lett* 194(2), 210-214
4. Inagami, T. (1989) *J Biol Chem* 264(6), 3043-3046

5. Winquist, R. J., Faison, E. P., Waldman, S. A., Schwartz, K., Murad, F., and Rapoport, R. M. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(23), 7661-7664
6. Currie, M. G., Geller, D. M., Cole, B. R., Boylan, J. G., YuSheng, W., Holmberg, S. W., and Needleman, P. (1983) *Science* 221(4605), 71-73
7. Zeidel, M. L. (1990) *Annu Rev Physiol* 52, 747-759
8. Itoh, H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1990) *J Clin Invest* 86(5), 1690-1697
9. Itoh, H., Pratt, R. E., Ohno, M., and Dzau, V. J. (1992) *Hypertension* 19(6 Pt 2), 758-761
10. Chartier, L., Schiffrin, E., Thibault, G., and Garcia, R. (1984) *Endocrinology* 115(5), 2026-2028
11. Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003) *J Biol Chem* 278(49), 48617-48626
12. Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., and Matsuo, H. (1988) *Nature* 332(6159), 78-81
13. Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 168(2), 863-870
14. Martel, G., Hamet, P., and Tremblay, J. (2010) *Mol Cell Biochem* 334(1-2), 53-65
15. Huo, X., Abe, T., and Misono, K. S. (1999) *Biochemistry* 38(51), 16941-16951
16. Potter, L. R. and Hunter, T. (1999) *Methods* 19(4), 506-520
17. Garbers, D. L. (1992) *Cell* 71(1), 1-4
18. Garbers, D. L. and Lowe, D. G. (1994) *J Biol Chem* 269(49), 30741-30744

19. Bennett, B. D., Bennett, G. L., Vitangcol, R. V., Jewett, J. R., Burnier, J., Henzel, W., and Lowe, D. G. (1991) *J Biol Chem* 266(34), 23060-23067
20. Beavo, J. A. and Brunton, L. L. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9), 710-718
21. Hamet, P. and Coquil, J. F. (1978) *J Cyclic Nucleotide Res* 4(4), 281-290
22. Cheng, H. F., Wang, J. L., Zhang, M. Z., McKanna, J. A., and Harris, R. C. (2000) *Am J Physiol Renal Physiol* 279(1), F122-F129
23. Inoue, T., Fukuo, K., Nakahashi, T., Hata, S., Morimoto, S., and Ogihara, T. (1995) *Hypertension* 25(4 Pt 2), 711-714
24. Kiemer, A. K. and Vollmar, A. M. (1998) *J Biol Chem* 273(22), 13444-13451
25. Kiemer, A. K., Hartung, T., and Vollmar, A. M. (2000) *J Immunol* 165(1), 175-181
26. Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E., Diaz-Cazorla, M., Rodriguez-Pascual, F., and Lamas, S. (2001) *Am J Physiol Renal Physiol* 280(3), F466-F473
27. Yamamoto, K., Ikeda, U., and Shimada, K. (1997) *J Mol Cell Cardiol* 29(9), 2375-2382
28. Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(1), 30-40
29. Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X. L., Douglas, J. G., Hood, J. D., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1998) *J Biol Chem* 273(7), 4220-4226
30. Zaragoza, C., Soria, E., Lopez, E., Browning, D., Balbin, M., Lopez-Otin, C., and Lamas, S. (2002) *Mol Pharmacol* 62(4), 927-935
31. Casteel, D. E., Zhuang, S., Gudi, T., Tang, J., Vuica, M., Desiderio, S., and Pilz, R. B. (2002) *J Biol Chem* 277(35), 32003-32014

32. Chan, S. H., Chang, K. F., Ou, C. C., and Chan, J. Y. (2004) *Mol Pharmacol* 65(2), 319-325
33. He, B. and Weber, G. F. (2003) *Eur J Biochem* 270(10), 2174-2185
34. Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G., and Pacaud, P. (2003) *J Biol Chem* 278(11), 9472-9480
35. Garg, R. and Pandey, K. N. (2003) *Hypertension* 41(3 Pt 2), 730-736
36. Katafuchi, T., Mizuno, T., Hagiwara, H., Itakura, M., Ito, T., and Hirose, S. (1992) *J Biol Chem* 267(11), 7624-7629
37. Lanier-Smith, K. L. and Currie, M. G. (1991) *Endocrinology* 129(5), 2311-2317
38. Ye, Q., Chen, S., and Gardner, D. G. (2003) *Hypertension* 41(3 Pt 2), 675-681
39. Hum, D., Besnard, S., Sanchez, R., Devost, D., Gossard, F., Hamet, P., and Tremblay, J. (2004) *Hypertension* 43(6), 1270-1278
40. Cao, L., Wu, J., and Gardner, D. G. (1995) *J Biol Chem* 270(42), 24891-24897
41. Duttweiler, H. M. (1996) *Trends Genet* 12(9), 340-341
42. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res* 15(20), 8125-8148
43. Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M., Ie, S. C., Nagel, R., Nair, S., Egan, D. A., Li, A., Huang, G., Klein-Szanto, A. J., Gimotty, P. A., Katsaros, D., Coukos, G., Zhang, L., Pure, E., and Agami, R. (2008) *Nat Cell Biol* 10(2), 202-210
44. Sadat, S., Gehmert, S., Song, Y. H., Yen, Y., Bai, X., Gaiser, S., Klein, H., and Alt, E. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* 363(3), 674-679
45. Lee, E. S., Yoon, C. H., Kim, Y. S., and Bae, Y. S. (2007) *FEBS Lett* 581(22), 4325-4332

46. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,
47. Weinmann, A. S. and Farnham, P. J. (2002) *Methods* 26(1), 37-47
48. Schmitzer, A. R., Lepine, F., and Pelletier, J. N. (2004) *Protein Eng Des Sel* 17(11), 809-819
49. El, Hader. C., Tremblay, S., Solban, N., Gingras, D., Beliveau, R., Orlov, S. N., Hamet, P., and Tremblay, J. (2005) *Am J Physiol Renal Physiol* 289(6), F1273-F1280
50. Shaw, G. and Kamen, R. (1986) *Cell* 46(5), 659-667
51. Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999) *J Mol Biol* 294(5), 1351-1362
52. Saeed, M., Perwaiz, I. M., Yousuf, F. A., Perveen, S., Shafiq, M., Sajid, J., and Frossard, P. M. (2007) *Clin Genet* 71(3), 238-244
53. Wang, X., Bruderer, S., Rafi, Z., Xue, J., Milburn, P. J., Kramer, A., and Robinson, P. J. (1999) *EMBO J* 18(16), 4549-4559
54. Chen, C. Y. and Shyu, A. B. (1995) *Trends Biochem Sci* 20(11), 465-470
55. Isono, K., Yamamoto, H., Satoh, K., and Kobayashi, H. (1999) *Nucleic Acids Res* 27(18), 3728-3735
56. Ramji, D. P. and Foka, P. (2002) *Biochem J* 365(Pt 3), 561-575
57. Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D., and Winoto, A. (1997) *EMBO J* 16(8), 1865-1875
58. Yu, X., Zhu, X., Pi, W., Ling, J., Ko, L., Takeda, Y., and Tuan, D. (2005) *J Biol Chem* 280(42), 35184-35194
59. Garg, R. and Pandey, K. N. (2005) *Peptides* 26(6), 1009-1023

60. Gilad, Y., Oshlack, A., Smyth, G. K., Speed, T. P., and White, K. P. (2006) *Nature* 440(7081), 242-245
61. Wolf, Y. I., Novichkov, P. S., Karev, G. P., Koonin, E. V., and Lipman, D. J. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18), 7273-7280
62. Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., Montecino, M., Choi, J., Zaidi, K., and Javed, A. (2000) *J Cell Sci* 113(Pt 14), 2527-2533
63. Kopp, K. and Huang, S. (2005) *J Cell Biochem* 95(2), 217-225
64. Neyses, L. and Vetter, H. (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 163(3), 1435-1443

FOOTNOTES

We thank Suzanne Cossette for her technical help with the chIP assays and for the yeast-one-hybrid plasmid constructs and Nathalie Bourcier for her help with the multiple tissue expression assays. These studies were supported by a Canadian Institutes of Health Research Grant (MOP-11463) to JT.

The abbreviations used are: ANP, atrial natriuretic peptide; ATF, activating transcription factor; ARE, AU-rich element; BNP, brain natriuretic peptide, ChIP, chromatin immunoprecipitation; CNP, C-type natriuretic peptide; CREB, cAMP response element binding protein; eGFP, enhanced green fluorescent protein; EMSA, electromobility shift assay; cGMP-RE, cGMP response element; GST, glutathione-s-transferase; GREBP, cGMP response element binding protein; MTE, multiple tissue expression; NPR1/GCA, natriuretic peptide receptor 1/guanylyl cyclase A; PDE,

phosphodiesterase; PKG, cGMP-dependant protein kinase; SF1, splicing factor 1; SNP, single nucleotide polymorphism.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Identification of a cGMP-response element binding protein. A, yeast-one-hybrid screening of a human kidney cDNA library; the putative binding protein interacts with cGMP-RE (present in 3 copies) to activate the reporter gene via GAL4AD. B) Full-length mRNA determination was by primer extension. HEK293 total RNA was retro-transcribed using a radio-labeled primer targeting GREBP mRNA and run beside pACT2-GREBP plasmid sequencing with the same radioactive primer. C) Full-length GREBP mRNA was confirmed by RT-PCR with a specific primer targeting upstream and downstream regions of the transcription start site. The positive control was HEK293 DNA, while retro-transcribed HEK293 RNA was studied by -25/-5 and +1/+20 RT-PCR. D) Nucleotide and amino acid sequences of GREBP. The mRNA destabilization motif is underlined. Basic residues (framed) constitute 20% of GREBP (23/115) and are distributed along the whole sequence. Bolded residues are those with high possibility of serine phosphorylation (>0.800/1.00) and threonine could be strongly phosphorylated (>0.900/1.00) by serine/threonine kinase, including PKG.

Fig. 2. DNA-binding assays. A) GST or GST-GREBP fusion proteins were immobilized on a glutathione sepharose matrix and incubated with P32PP -labeled, double-stranded cGMP-RE DNA probe. After draining and washing, 250X excess of

cold probe was applied to the matrix to compete for hot probe binding. B) Results of 3 different experiments. Radioactive counts after elution of GST-GREBP, GST and beads control columns are corrected for protein content (GST and GST-GREBP) and compared. The presence of GST and GST-GREBP proteins on the resin was confirmed by Western blotting with a specific antibody directed against GST. *, $p=0.012$

Fig. 3. EMSA of GREBP interacting with cGMP-RE from human, rat and mouse species. A) 5 μ g of nuclear extracts from GREBP or Neo stably-transfected HEK293 cells were incubated with 18-bp long P32PP-labeled double-stranded consensus cGMP-RE oligonucleotides corresponding to human, rat and mouse sequences (39) and were run on non-denaturing PAGE. The figure shows representative EMSA in which the 3 probes could bind to nuclear proteins (all lanes). The arrow indicates the presence of a protein band visible only with the human and rat RE probes in control (Neo) nuclear extracts (lane 2), which increased in intensity with nuclear extracts from GREBP-transfected cells (lanes 3 and 8). This binding is specific as it could be competed for by 50X and 100 X excess cold probes (lanes 4, 5, 9 and 10). B) Nuclear extracts of GREBP expressing cells were used to investigate binding to 24-bp long cGMP-RE oligonucleotides. Binding was visible only with the human 24 bp-long P32PP-labeled probe (H24, lane 3) that was more intense after GREBP compared to Neo over-expression (lane 2). The other 24bp-long probes (rat: R24, mouse: M24, rat/mouse probe with the nucleotide A at position 11: P1 and rat/mouse probe with the nucleotide G at position 11: P2) showed only non-specific faint bands (lane 4-7). C) Supershift experiments using nuclear extracts of GREBP-StrepTagII expressing

cells. The probe corresponding to the human cGMP-RE sequence was used here. Overexpression of GREBP-StrepTagII protein (lane 3) led to an increased binding over Neo (lane 2). Addition of 1 μ g of StrepTagII antibody prior to the P32PP-labeled cGMP-RE inhibited DNA-protein interaction (lane 5) while the same amount of antibody added after the radio-labeled probe had almost no effect on the binding (lane 7). BSA used as a control added before the probe (lane 4) or after it (lane 6) did not alter the binding compared to GREBP-StrepTagII alone (lane 3). D) Overexpression of GREBP-HisTag protein (lane 3) led to an increased binding of the human cGMP-RE probe over Neo (lane 2). Addition of 0.5 μ g of HisTag antibody prior to the P32PP-labeled probe inhibited DNA-protein interaction (lane 5) while the same amount of antibody added after the probe had almost no effect on the binding (lane 7). Normal rabbit IgG added before (lane 4) or after (lane 6) had no effect on probe binding compared to GREBP-HisTag alone (lane 3). N.E.: nuclear extracts, Comp.: cold competitor, Anti-ST: antibody against StrepTagII, Anti-HT: antibody against poly histidine tag.

Fig. 4. A) ChIP assays for GREBP/cGMP-RE complex. HEK293 cells were transfected with peGFP or peGFP-GREBP for 12 hours and fixed with formaldehyde as described in the Experimental Procedures section. GFP overexpressing cells was used as negative controls. Fixed DNA-protein complexes were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody and normal rabbit IgG served as (no Ab) negative control. Input represented one tenth of cleared unprecipitated supernatant. B) Cellular localization of GREBP in HEK239 cells. HEK293 cells were transfected with peGFP or peGFP-GREBP for 12 hours. They were then fixed and stained with phalloidin and

DAPI. The upper panel shows the whole cell distribution of green fluorescent protein (GFP) as control. The lower panels present nuclear localization of the chimeric protein GFP-GREBP.

Fig. 5. NPR1/GCA promoter activity is inhibited by GREBP over-expression, and this inhibition is dependent on cGMP-RE. A) HEK293 cells were co-transfected with 10 ng of pCMV- β gal, 200 ng of hGCAP-pGL3b and a combination of varying amounts of pCDNA1-Neo and/or pCDNA1-Neo-GREBP for a total plasmid amount of 500 ng per test. GREBP over-expression was confirmed by sqRT-PCR with specific primers targeting GREBP expressed by pCDNA1-Neo-GREBP. B) HEK293 cells were co-transfected with 10 ng of pCMV β , 400 ng of pCDNA1-Neo or pCDNA1-Neo-GREBP and 200 ng of hGCAP-pGL3b or the deleted cGMP-RE form of the human NPR1/GCA promoter hGCAP(Δ cGMP-RE)-pGL3b. All values are expressed as means \pm SEM of relative luciferase activity from 4 different experiments performed in triplicate (n=12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ versus Neo alone.

Fig. 6. NPR1/GCA transcriptional regulation requires GREBP expression. HEK293 cells were transfected with the pSilencer plasmid producing a non-target (NT) hairpin sequence (pSilencer 2.0-U6 NT) or shRNA directed against GREBP (pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP). mRNA levels were analyzed for GREBP expression in A and for NPR1/GCA in B. C) HEK293 cells were co-transfected with 10 ng of pCMV β , 200 ng of hGCAP-pGL3b and 300 ng of pSilencer 2.0-U6 NT or of pSilencer 2.0-U6-shRNA-GREBP. All values are expressed as means \pm SEM of relative mRNA levels

(A, B) or relative luciferase activity (C) from experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus NT.

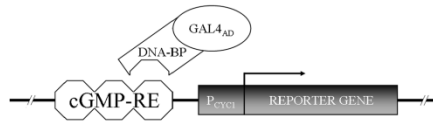
Fig. 7. ANP stimulation influences GREBP and NPR1/GCA expression patterns. A) HeLa cells were treated with 100 nM ANP for the indicated time, GREBP expression was measured by sqRT-PCR corrected for 18S internal standard (from 4 different experiments). NCI-H295R cells were treated with 100 nM ANP and gene expression was measured after 1, 3, 6 and 14 hours and summarized in B for sqRT-PCR results and compiled in C for graphic representation. All data are from 3 different experiments performed in duplicate. Values are expressed as means \pm SEM relative to the basal state after ANP stimulation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

Fig. 8. GREBP expression profile in human tissue samples. The human multiple tissue expression (MTE) array from Clontech is composed of tissues obtained from normal subjects (male/female) from 15 to 66 years old after sudden and/or accidental death. The fetal samples combine 30 embryos, average age 18 to 30 weeks. GREBP expression is ubiquitous with the strongest signal in the heart and adult aorta.

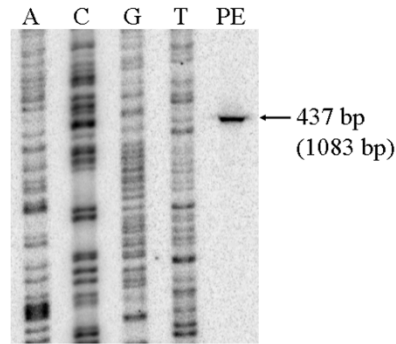
Table 1. Compilation of single nucleotide polymorphisms (SNP) located within GREBP gene. SNP analysis of the GREBP transcript was undertaken with the NCBI SNP database. The results are shown as change with associated SNP number, gene position, gene region and amino acid (A.A.) variation. Bold characters are the results of our original GREBP sequence.

Figure 1

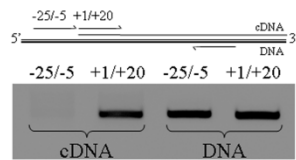
A



B



C



D

```

AATCCCCTGGCCCAACCCGTCTACTCTACT 32
CATCTTTGCAAGCAGCACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAA 103
ACATGTAGCTTTTATTCAGTTCTAACCAAAAAAATAAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTAT 174
TTCTCAGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCAACAATATACTCTCCGGACA 245

ATG AAC CAT AAC CAA TAC TAC CAA TCA ATA CTC ATC ATT AAT AAT CAT AAT GGC 299
MET ASN [HIS] ASN GLN TYR TYR GLN SER ILE LEU ILE ILE ASN ASN [HIS] ASN GLY

TAT AGC AAT AAA ACT AGG AAT AGC CCC CTT TCA CTT CTG AGT CCC AGA GGT TAC 353
TYR SER ASN [LYS] THR [ARG] ASN SER PRO LEU SER LEU LEU SER PRO [ARG] GLY TYR

CCA AGG CAC CCC TCT GAC ATC CGG CCT GCT TCT TCT CAC ATG ACA AAA ACT AGC 407
PRO [ARG][HIS] PRO SER ASP ILE [ARG] PRO ALA SER SER [HIS] MET THR [LYS] THR SER

CCC CAT CTC AAT CAT ATA CCA AAT CTC TCC CTC ACT AAA CGT AAG CCT TCT CCT 461
PRO [HIS] LEU ASN [HIS] ILE PRO ASN LEU SER LEU THR [LYS][ARG][LYS] PRO SER PRO

CAC TCT CTC AAT CTT ATC CAT CAT AGC AGG CAG TTG AGG TGG ATT AAA CCA AAC 515
[HIS] SER LEU ASN LEU ILE [HIS][HIS] SER [ARG] GLN LEU [ARG] TRP ILE [LYS] PRO ASN

CCA GCT ACG CAA AAT CTT AGC ATA CTC CTC AAT TAC CCA CAT AGG ATG AAT AAT 569
PRO ALA THR GLN ASN LEU SER ILE LEU LEU ASN TYR PRO [HIS][ARG] MET ASN ASN

AGC AGT TCT ACC GTA CAA CCC TAA CATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTATCCTAAC 632
SER SER SER THR VAL GLN PRO TERM

TACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCGACCCCTACTACTATCTCGCACCGAAACAG 703
CTACATGACTAACACCCTTAATTCATCCACCTCCTCTCCCTAGGAGGCTGCCCCGCTAACCGGCTTT 774
TTGCCAAATGGCCATTATCGAAGAATTACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATCATAGCCAC 845
CATCACCCCTCTTAACTCTACTTCTACCTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCATAT 916
CTAACACGTAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCATTCTCCCCACACTCATCGCC 987
CTTACCAGCTACTCCTACTATCTCCCTTTTATACTAATAATCTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1058
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1083
    
```

Figure 2

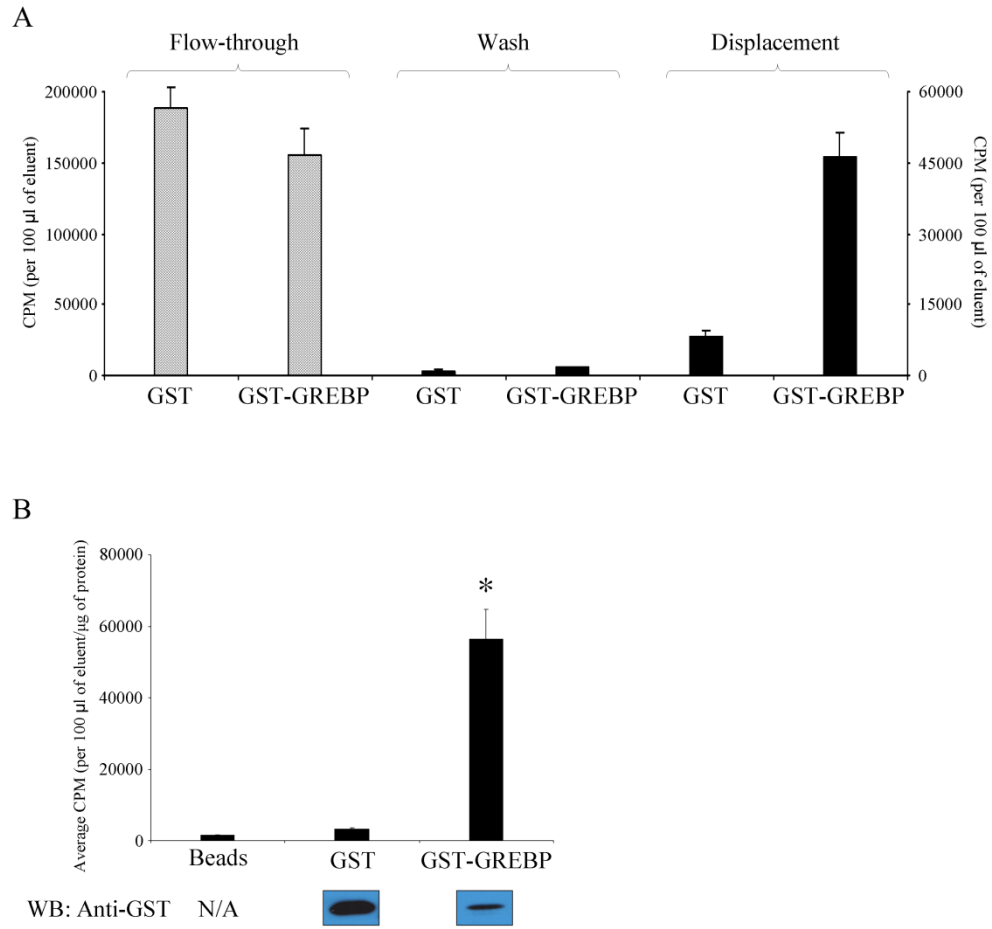
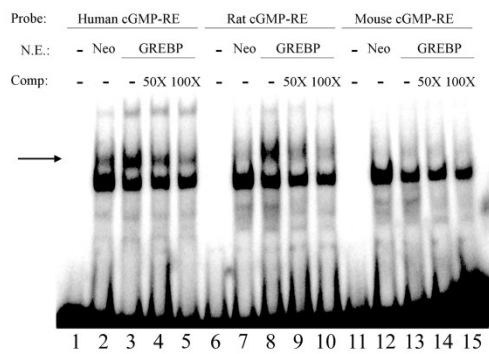
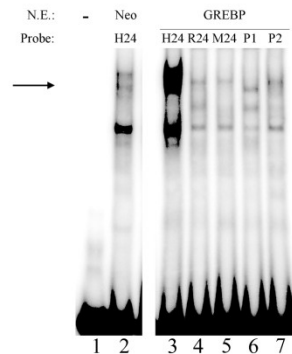


Figure 3

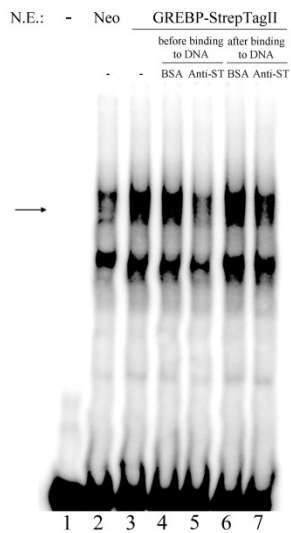
A



B



C



D

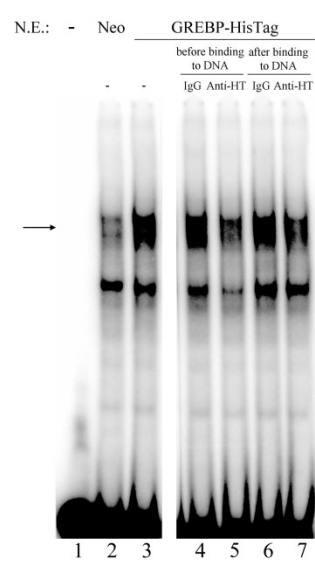
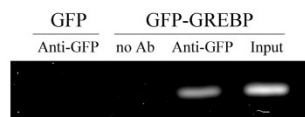


Figure 4

A



B

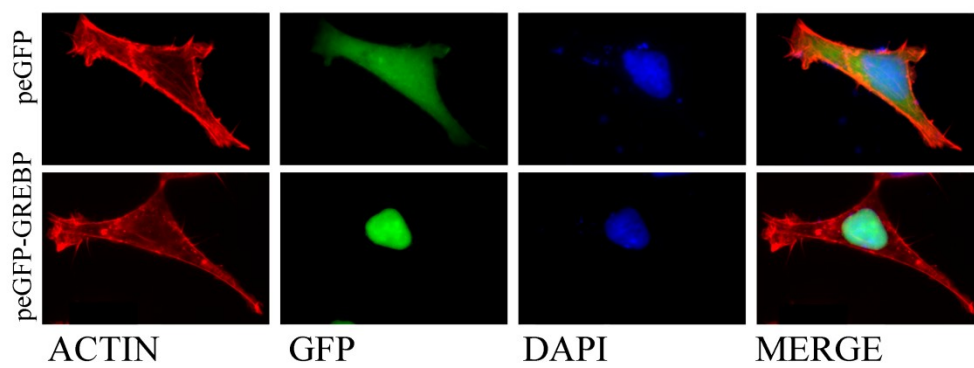
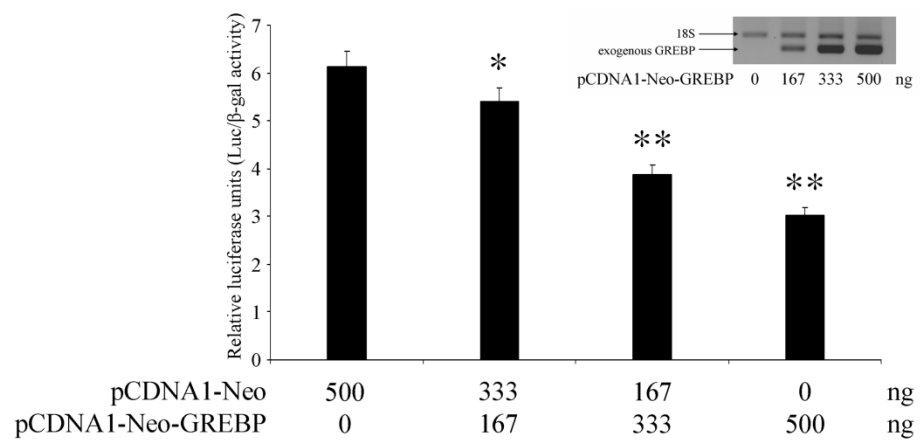


Figure 5

A



B

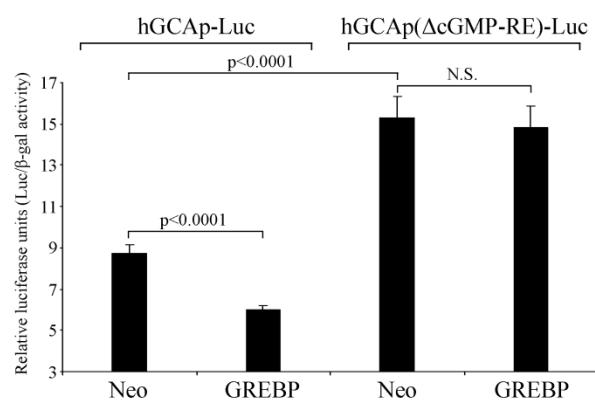


Figure 6

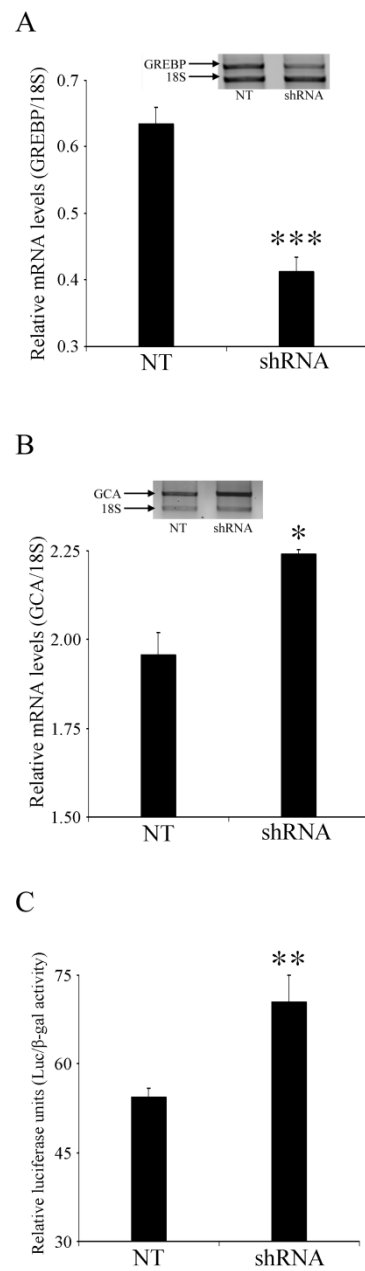
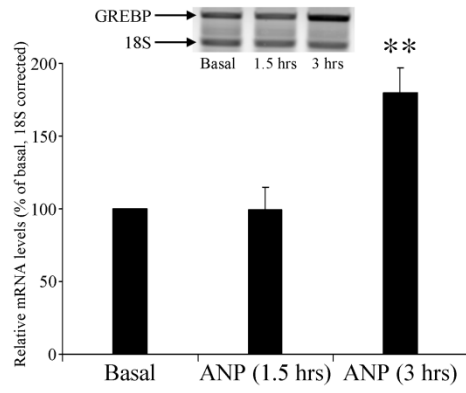
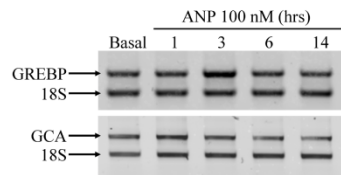


Figure 7

A



B



C

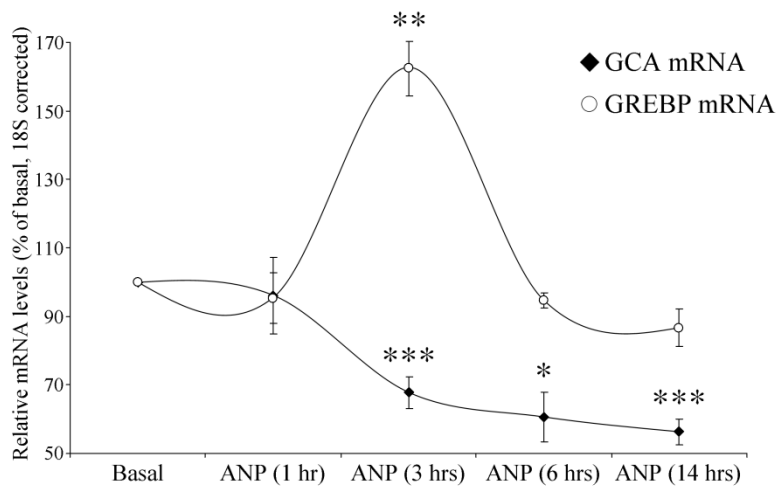


Figure 8

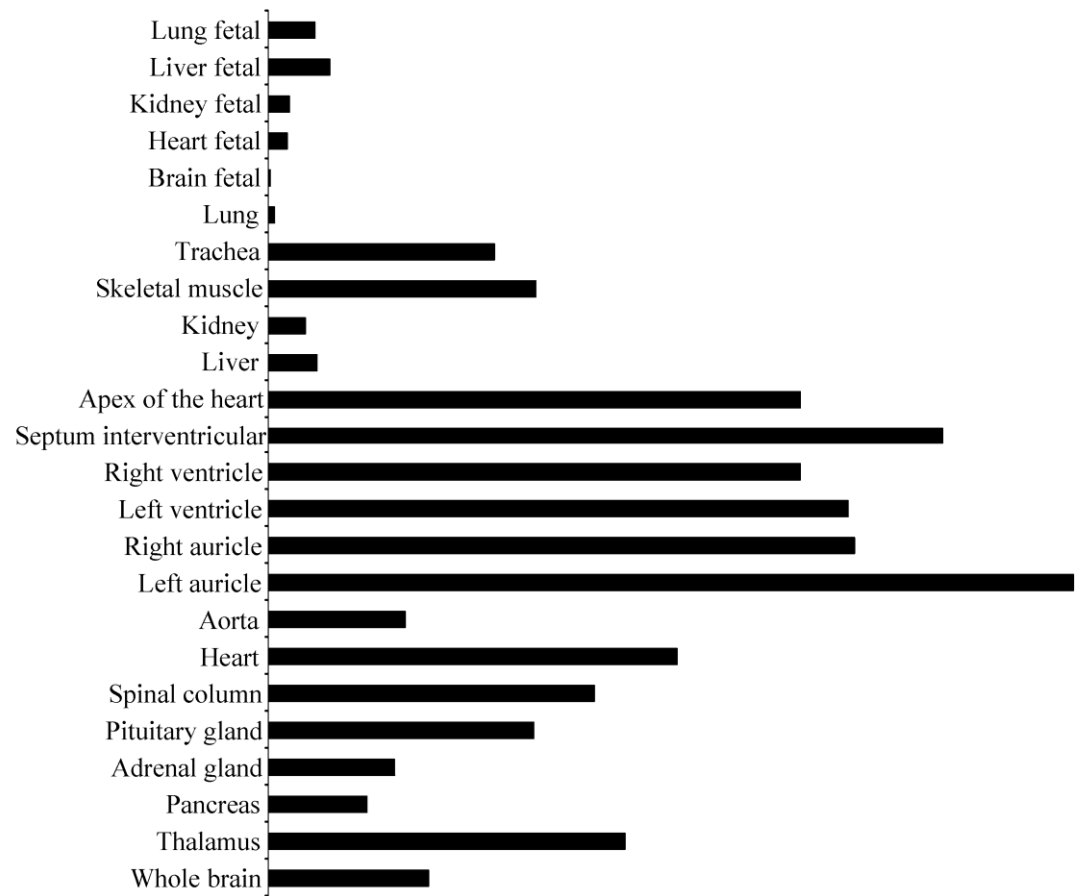


Table 1

Polymorphism	SNP Ref. Number	Gene position (bp)	Gene region	A.A. variation
A/G	rs41485244	321	Coding	Ser/Gly
A/G	rs9701779	352	Coding	Tyr/Cys
C/T	rs8179414	378	Coding	Pro/Ser
C/T	rs6594029	384	Coding	Pro/ Ser
C/G	rs55668158	397	Coding	Thr/Arg
C/T	rs9701055	411	Coding	His/Tyr
C/T	rs7349151	432	Coding	Leu/Phe
C/T	rs6594030	442	Coding	Thr/Ile
C/T	rs7349153	468	Coding	Leu/Phe
A/G	rs9283150	486	Coding	Ser/Gly
A/G	rs6594031	519	Coding	Thr/ Ala
C/T	rs7416152	569	Coding	Silent
A/G	rs9782892	574	Coding	Asn/ Ser
C/G	rs55982362	577	Coding	Ser/Cys
C/T	rs56211662	594	3'UTR	N/A
C/T	rs9326619	845	3'UTR	N/A
A/G	rs7411575	876	3'UTR	N/A
C/T	rs55973403	910	3'UTR	N/A
C/T	rs7417504	912	3'UTR	N/A
C/T	rs9283151	951	3'UTR	N/A
A/G	rs6421778	996	3'UTR	N/A
A/G	rs6421779	999	3'UTR	N/A
C/T	rs7340021	1016	3'UTR	N/A
A/G	rs6421780	1023	3'UTR	N/A