

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**IDENTIFICATION DE DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES DE LA  
LIAISON DU RÉCEPTEUR UT DE L'UROTENSINE II**

**Par**

**BRIAN HOLLERAN**

**Département de pharmacologie**

**Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D) en pharmacologie**

**22 mai 2009**

**Évaluateurs**

**Dr. Richard Leduc, département de pharmacologie**

**Dr. Emanuel Escher, département de pharmacologie**

**Dr. Guylain Boulay, département de pharmacologie**

**Dr. Jean-Guy Lehoux, département de biochimie**

**Dr. François Marceau, département de médecine, Université Laval**



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-64194-1  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-64194-1

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

# RÉSUMÉ

## **Identification de déterminants moléculaires de la liaison du récepteur UT de l'urotensine II**

Par

**Brian Holleran**

**Département de Pharmacologie**

**Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor en pharmacologie**

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) forment la classe de récepteurs la plus nombreuse et la plus étudiée. La compréhension du mode de fonctionnement de cette famille de récepteurs fait l'objet d'études intenses, tant au niveau de leur interaction avec le ligand qu'au niveau du processus d'activation suite à cette liaison.

Le récepteur de l'U-II (UT) est un membre de la classe A des GPCRs et possède toutes les caractéristiques de cette famille. Notre hypothèse est que le récepteur UT possède des déterminants moléculaires identifiables qui sont impliqués lors de sa liaison à l'U-II et de son activation. Dans un premier temps, des études de marquage par photoaffinité du récepteur UT ont été effectuées en utilisant deux séries de ligands U-II qui contiennent le résidu photosensible para-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) et qui possèdent un caractère agoniste ou agonistes partiel. Il a été montré pour les deux séries de ligands que les quatre premiers résidus de l'U-II sont à proximité du résidu Met288 dans la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur UT. Cette approche a également été utilisée pour comparer le patron de photomarquage entre deux ligands contenant le Bpa à la position 6, soit de l'analogue agoniste complet avec celui de l'analogue agoniste partiel. Il a été montré que le peptide agoniste photomarque les résidus Met184/Met185 du TMD4 de l'UT, tandis que l'agoniste partiel photomarque plutôt une région délimitée au TMD5. Le deuxième objectif du projet a été l'identification, au moyen de l'approche SCAM (Substituted Cysteine Assessibility Method) de résidus qui bordent la pochette de liaison du récepteur. Chacun des résidus des domaines transmembranaires 6 et 7 ont été mutés, un à un, par une cystéine. Suite au traitement par des composés MTS, la liaison du ligand <sup>125</sup>I-U-II aux mutants F268C<sup>(6.44)</sup>, W278C<sup>(6.54)</sup> et A282C<sup>(6.58)</sup> du TMD6 ainsi qu'aux mutants L298C<sup>(7.34)</sup>, Y300C<sup>(7.36)</sup>, T302C<sup>(7.38)</sup> et T303C<sup>(7.39)</sup> du TMD7 a été inhibée, démontrant que ces positions du récepteur font face à la pochette de liaison. L'ensemble de ces études mène à une meilleure compréhension des bases moléculaires de la liaison et de l'activation du récepteur UT et nous a permis de proposer un modèle moléculaire du récepteur UT ligandé. Ce modèle pourra ouvrir la voie vers une meilleure compréhension du processus de liaison et d'activation des GPCRs peptidergiques de la classe A.

Mots-clés : Récepteur couplé à une protéine G, urotensine II, récepteur de l'urotensine II, liaison, modélisation moléculaire

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs).....</b>	<b>1</b>
1.1. Classification structurale des GPCRs.....	3
1.1.1. GPCRs de la classe A.....	5
1.1.2. GPCRs de la classe B .....	7
1.1.3. GPCRs de la classe C .....	7
1.2. Mécanismes de liaison des GPCRs .....	8
1.2.1. La rhodopsine .....	10
1.2.2. Le récepteur $\beta$ 2-adrénergique .....	12
1.2.3. Les récepteurs peptidergiques de la classe A .....	17
1.2.3.1. Les récepteurs aux tachykinines.....	17
1.2.3.2. Le récepteur AT <sub>1</sub> de l'angiotensine II.....	18
1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des GPCRs.....	20
1.3.1. État basal vs état actif.....	21
1.3.2. Modèles d'activation des GPCRs : de la liaison vers l'activation .....	23

1.3.3. Changements conformationnels impliqués dans l'activation des GPCRs	24
1.3.4. Rôle des motifs conservés dans le processus d'activation	27
1.3.4.1. Motif D/ERY	28
1.3.4.2. Motif NPxxY	29
1.3.4.3. Motif CW/FLP	30
1.3.5 Sélectivité fonctionnelle des ligands	31
<b>2. Le système urotensine II</b>	<b>33</b>
2.1. Urotensine II (U-II)	33
2.1.1. Découverte	33
2.1.2. Expression, maturation et localisation	34
2.1.3. Urotensin II-Related Peptide (URP)	36
2.2. Récepteur de l'urotensine (UT)	37
2.2.1. Découverte	37
2.2.2. Structure	37
2.2.3. Localisation	40
2.3. Actions physiologiques de l'U-II	40
2.3.1. Actions périphériques	40
2.3.1.1. Rôle dans le système cardiovasculaire	41
2.3.1.2. Rôle dans le système rénal	42
2.3.1.3. Rôle comme chémoattractant	42
2.3.2. Actions centrales	43
2.4. Rôle pathophysiologique du système U-II/UT	44

2.5. Analogues synthétiques de l'U-II.....	44
<b>3. Méthodes employées pour l'identification des déterminants de liaison du récepteur UT.....</b>	<b>45</b>
3.1. Marquage par photoaffinité.....	45
3.1.1. Utilisation du p-benzoyl-L-phenylalanine .....	46
3.2. Substituted cysteine accessibility method (SCAM).....	49
3.2.1. Principe du SCAM .....	49
3.2.2. Utilisation du SCAM pour sonder la pochette de liaison des GPCRs ..	50
<b>4. Raisonnement théorique et objectif de l'étude .....</b>	<b>54</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>56</b>
<b>Article 1 .....</b>	<b>56</b>
<b>Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites.....</b>	<b>56</b>
<b>Article 2 .....</b>	<b>101</b>
<b>Identification of transmembrane domain 6 &amp; 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor .....</b>	<b>101</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>150</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>154</b>

## LISTE DES PUBLICATIONS

Pour cette thèse :

**Holleran, B.J.**, Beaulieu, M.E., Proulx, C.D., Lavigne, P., Escher, E. & Leduc, R. (2007). Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochemical Journal*. **402**(1): 51-61

**Holleran, B.J.**, Domazet, I., Beaulieu, M.E., Yan, L., Guillemette, G., Lavigne, P., Escher, E. & Leduc, R. (2008). Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochemical Pharmacology*. **77**(8):1374-1382

**AUTRES PUBLICATIONS**

Domazet, I., **Holleran, B.J.**, Martin, S. S., Lavigne, P., Leduc, R., Escher, E., & Guillemette, G (2009). The second transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor participates in the formation of the ligand binding pocket and undergoes pivoting movement during the process of receptor activation. *J. Biol. Chem.* 284: 11922-11929.

Proulx, C.D., **Holleran, B.J.**, Boucard, A. A., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol. Pharmacol.* 74: 552-561.

\*Proulx, C.D., \***Holleran, B.J.**, Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (2008). Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides.* 29: 691-699 \*Ces auteurs ont contribué également à ce manuscrit.

Martin, S.S., **Holleran, B.J.**, Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (2007). Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method. *Mol. Pharmacol.* 72: 182-190.



Fillion, D., Deraët, M., **Holleran, B.J.**, & Escher, E. (2006). Stereospecific synthesis of a carbene-generating angiotensin II analogue for comparative photoaffinity labeling: improved incorporation and absence of methionine selectivity. *J. Med. Chem.* 49: 2200-2209.

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### Introduction

Figure 1. Résidus et motifs conservés pour les GPCR de la classe A.....	4
Figure 2. Représentation schématique des classes de GPCRs .....	6
Figure 3. Modes de liaison orthostérique des GPCRs.....	11
Figure 4. Représentation schématique de la pochette de liaison du 11-cis rétinol.....	13
Figure 5. Représentation schématique du mode de liaison de la noradrénaline avec le récepteur $\beta_2$ adrénergique .....	14
Figure 6. Pochette de liaison du carazolol dans le récepteur $\beta_2$ adrénergique .....	16
Figure 7. Sélectivité fonctionnelle des ligands.....	32
Tableau 1. Comparaison de la séquence primaire de l'urotensine II et de l'URP provenant de diverses espèces.....	35
Figure 8. Représentation schématique du récepteur UT de rat. ....	39
Figure 9. La méthode de marquage par photoaffinité. ....	47
Figure 10. L'approche du SCAM.....	51

## Article 1

Figure 1. Amino acid sequence of human urotensin II and urantide-based photoreactive analogues and two-dimensional representation of the primary structure of the rat UT receptor .....	70
Table 1. Pharmacological characterization of photolabile urotensin II derivatives. ....	72
Figure 2. Specific photoaffinity labelling of rat UT from transiently transfected COS-7 cells.....	74
Figure 3. Proteolytic and chemical cleavage of $^{125}\text{I}$ -[Bpa <sup>1</sup> ] U-II, $^{125}\text{I}$ -[Bpa <sup>2</sup> ]U-II, $^{125}\text{I}$ -[Bpa <sup>3</sup> ]U-II and $^{125}\text{I}$ -[Bpa <sup>4</sup> ]U-II photolabelled rUT .....	75
Figure 4. CNBr cleavage of $^{125}\text{I}$ -[Pen <sup>5</sup> Bpa <sup>1</sup> D-Trp <sup>7</sup> Orn <sup>8</sup> ]U-II and $^{125}\text{I}$ -[Bpa <sup>2</sup> Pen <sup>5</sup> D-Trp <sup>7</sup> Orn <sup>8</sup> ]U-II photolabelled rUT.....	80
Figure 5. Proteolytic and chemical cleavage of the partially purified V8-protease generated fragment of $^{125}\text{I}$ -[Pen <sup>5</sup> Bpa <sup>6</sup> D-Trp <sup>7</sup> Orn <sup>8</sup> ]U-II photolabelled rUT .....	82
Figure 6. Molecular models of U-II analogues and U-II/rUT complexes.....	88

## Article 2

Figure 1. Schematic representation of the rat UT receptor .....	111
Table 1. Binding properties of U-II to Cysteine-Substituted rUT TMD6 Mutant Receptors.....	112
Table 2. Binding properties of U-II to Cysteine-Substituted rUT TMD7 Mutant Receptors.....	113

Figure 2. Effect of MTS on the wild-type receptor and sensitive reporter cysteine-bearing mutant receptors .....	115
Figure 3. Effects of MTSEA on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD6 .....	116
Figure 4. Effect of MTSEA on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD7 .....	117
Figure 5. Effects of MTSES on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD6 .....	118
Figure 6. Effect of MTSES on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD7 .....	120
Figure 7. UT protection of MTSEA-sensitive receptor mutants.....	121
Figure 8. Molecular model of rUT receptor .....	125

## **Discussion**

Figure 11. Modèle moléculaire du récepteur rUT.....	145
---	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	Hormone adrénocorticotropine
Ang II	Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT <sub>1</sub>	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT <sub>2</sub>	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
Bpa	para-benzoyl-L-phenylalanine
CAM	Mutant constitutivement actif
cAMP	Adénosine monophosphate 3',5'-cyclique
CaSR	Récepteur du calcium
CCK	Cholecystokinine
CRF	<i>corticotropin-releasing factor</i>
DAG	Diacylglycérol
DEER	Résonance double électron-électron
δOR	Récepteur delta opioïde
EPR	Résonance paramagnétique à électron
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
GTP	Guanosine triphosphate
ICV	Intracérébroventriculaire
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate

IP <sub>3</sub> R	Récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate
κOR	Récepteur kappa opioïde
LH	Hormone lutéinisante
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MTS	Méthanethiosulfonate
MTSEA	Méthanethiosulfonate-éthylammonium
MTSES	Méthanethiosulfonate-éthylsulfonate
μOR	Récepteur mu opioïde
NK	Récepteur de la neurokinine
NKA	Neurokinine A
NKB	Neurokinine B
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
Pen	Pénicillamine
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PPT	Pédonculopontine tegmentale
PTH	Parathormone
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SST	Somatostatine
SSTR	Récepteur de la somatostatine
TMD	Domaine transmembranaire

TSH	Hormone stimulante de la thyroïde
U-II	Urotensine II
URP	<i>Urotensin II-related peptide</i>
UT	Récepteur de l'urotensine II
V1	Récepteur de type 1 de la vasopressine
VIP	Peptide intestinal vasoactif

# INTRODUCTION

## 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs)

Toutes les cellules doivent avoir un moyen de capter un stimulus venant de l'extérieur et de traduire ce stimulus en une réponse appropriée. Ainsi, les cellules possèdent toutes à leur surface des macromolécules protéiques qu'on appelle des récepteurs. Ces récepteurs ont la capacité de reconnaître spécifiquement et de lier des entités chimiques, appelés ligands. Suite à la liaison du ligand, le récepteur adopte une conformation active qui enclenche une réponse intracellulaire appropriée. Parmi les nombreuses classes de récepteurs connues se trouvent les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs, pour G Protein-Coupled Receptor).

Les GPCRs sont la famille de récepteurs la plus nombreuse (BOCKAERT et PIN, 1999). Pour les vertébrés, on connaît actuellement entre 1000 et 2000 GPCRs. Le séquençage du génome humain a permis de révéler la séquence de tous les GPCRs chez l'homme. Parmi ceux-ci se trouvent des GPCRs dont ligand naturel est inconnu, dit orphelins (LANDER *et al*, 2001; VENTER *et al*, 2001). Globalement, les GPCRs représentent plus de 1% du génome humain et codent pour 865 gènes chez l'homme (FREDRIKSSON et SCHIOTH, 2005). Les GPCRs sont responsables de la majorité de la réponse sensorielle et la majorité des GPCRs connus sont des récepteurs olfactifs. Les GPCRs sont aussi impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques, et sont impliqués dans l'homéostasie des divers systèmes. Pour l'industrie pharmaceutique, les GPCRs représentent des cibles thérapeutiques très intéressantes pour le développement de médicaments pouvant



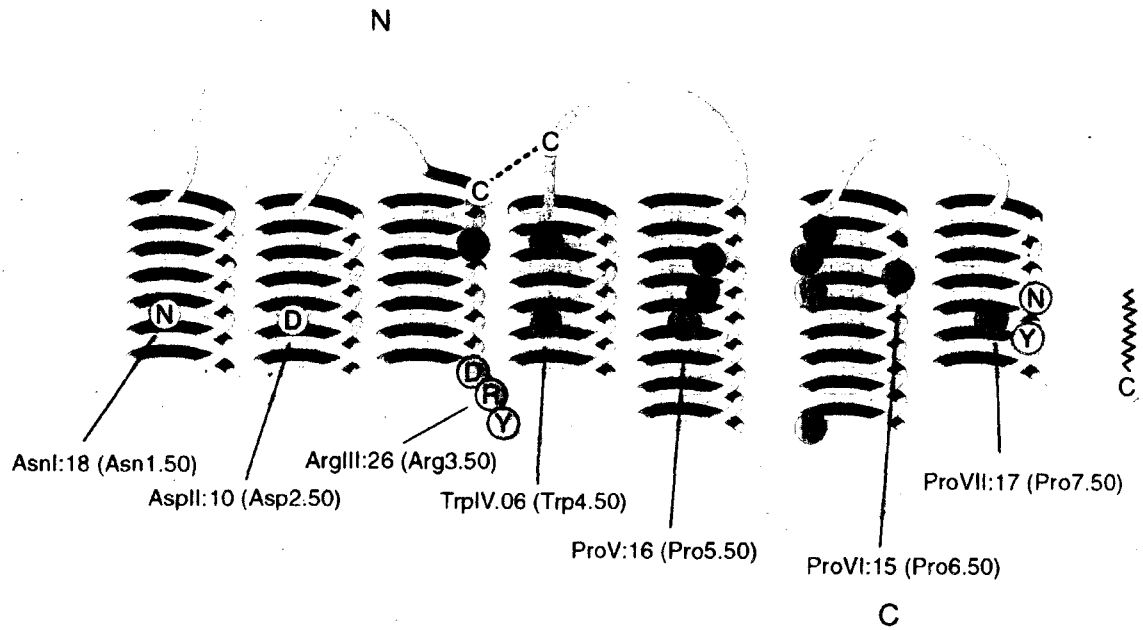
servir au traitement de nombreux désordres que peuvent réguler ceux-ci. En effet environ 25% des médicaments sur le marché actuellement ciblent les GPCRs (OVERINGTON *et al*, 2006).

Les GPCRs reconnaissent spécifiquement une grande variété de substances. Suite à leur activation, ces récepteurs enclenchent une cascade d'événements intracellulaires qui constituent la réponse appropriée au signal externe provenant de leur environnement; c'est ce qu'on appelle la transduction du signal. Les GPCRs doivent leur nom au fait que leur mécanisme de transduction la mieux connue implique l'activation de protéines G hétérotrimériques qui servent d'intermédiaires dans l'activation d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, etc). Les protéines G hétérotrimériques sont composés de 3 sous-unités, soit la sous-unité  $G\alpha$  et les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  qui forment le dimère stable  $G\beta\gamma$ . Suite à leur activation, les GPCRs catalysent l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP à l'intérieur de la sous-unité  $G\alpha$  de la protéine G. Cet échange cause la dissociation et l'activation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ , qui peuvent chacune aller activer leurs effecteurs respectifs (OLDHAM et HAMM, 2008). On peut classer les protéines  $G\alpha$  en fonction de leur capacité à activer des voies précises. Ainsi, la protéine  $G\alpha_s$  active la voie de l'adénylyl cyclase menant à la production d'AMP cyclique, alors que la protéine  $G\alpha_i$  inhibe l'adénylyl cyclase. La protéine  $G\alpha_q$  active la phospholipase C, qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ). L' $IP_3$  active un canal calcique (l' $IP_3R$ ) situé sur le réticulum endoplasmique, et le diacylglycérol active la protéine kinase C. Enfin, la protéine  $G\alpha_{12/13}$  active la protéine Rho qui est impliquée dans la réorganisation du

cytosquelette (OLDHAM et HAMM, 2008). Les protéines G sont responsables de la majorité des effets observés suite à l'activation d'un GPCR, mais les GPCRs activent aussi d'autres voies de signalisation qui sont indépendantes des protéines G.

### **1.1. Classification structurelle des GPCRs**

Bien que la structure primaire de tous les GPCRs soit très hétérogène, une particularité structurale partagée par tous les GPCRs est la présence de sept domaines transmembranaires (TMD). Ces séquences d'environ 30 acides aminés très hydrophobes traversent la membrane plasmique pour y ancrer le récepteur. La cristallisation récente de quelques GPCRs a permis de visualiser leur structure pour la première fois (CHEREZOV *et al*, 2007; PALCZEWSKI *et al*, 2000). Ces cristaux ont montré que chaque TMD possède une structure secondaire alphahélicale et les TMDs traversent la membrane sept fois dans un sens antihoraire pour former le corps du récepteur (Figure 1). Également, ces cristaux ont révélé la présence d'un 8<sup>e</sup> segment alphahélicale, nommé l'hélice 8, située immédiatement après le TMD7 et parallèle à la membrane plasmique. Tous les GPCRs contiennent un domaine N-terminal extracellulaire ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire. Les TMDs sont reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires hydrophiles, qui sont de longueurs variables. Une autre caractéristique partagée par les GPCRs est la présence d'un pont disulfure qui relie une cystéine du côté extracellulaire du TMD3 avec une cystéine dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire. Ce pont semble être impliqué dans la stabilité d'un nombre restreint de conformations. Les GPCRs possèdent aussi des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations et des palmitoylations. Chez les eucaryotes, les GPCRs peuvent être regroupés en 3 grandes familles



**Figure 1. Résidus et motifs conservés pour les GPCR de la classe A**

Les résidus les plus conservés pour chacun des TMDs sont indiqués avec la nomenclature de Ballesteros-Weinstein.

Figure tirée de Gether, U. et Kobilka, B. (1998)

selon leur homologie de séquence et selon la présence de motifs ou résidus conservés (FREDRIKSSON *et al*, 2003). La classe A regroupe les GPCRs apparentés à la rhodopsine, la classe B regroupe les GPCRs apparentés au récepteur de la sécrétine et la classe C regroupe les GPCRs apparentés au récepteur métabotropique du glutamate (Figure 2). Chez les organismes inférieurs, on retrouve aussi d'autres classes mineures de GPCRs, absents chez l'humain tels les récepteurs des phéromones Ste2 et Ste3 chez la levure ou les récepteurs Frizzled chez les métazoaires.

### 1.1.1. GPCRs de la classe A

Les GPCRs de la classe A, apparentés à la rhodopsine, forment la famille la plus nombreuse et la plus étudiée. On estime qu'il y a 241 gènes qui codent pour des GPCRs non-olfactifs de cette classe (FREDRIKSSON *et al*, 2003). Les GPCRs de la classe A sont des récepteurs avec des séquences primaires très diversifiées et qui possèdent très peu d'homologie de séquence. La classe A est caractérisée par la présence de plusieurs résidus et motifs hautement conservés dans l'ensemble de la famille (ces motifs conservés seront abordés dans la section 1.3.4). La plus grande homologie de séquence se trouve à l'intérieur des sept TMDs. Pour faciliter la comparaison des résidus situés dans les TMDs des différents GPCRs de la classe A, plusieurs nomenclatures ont été proposées. Dans cette thèse, j'ai retenu la nomenclature de Ballesteros et Weinstein (BALLESTEROS et WEINSTEIN, 1995). Chaque TMD possède un résidu qui est le plus conservé, désigné le résidu x.50, où x est le numéro du TMD. Les autres résidus sont numérotés relativement à leur position en aval ou en amont de ce résidu conservé. À titre d'exemple, dans la classe A



Le résidu le plus conservé du TMD6 est une proline (Pro<sup>(6.50)</sup>). Pour le récepteur de l'urotensine II, le résidu Phe272<sup>(6.48)</sup> indique le résidu situé à deux positions avant cette proline tandis que chez le récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II le résidu correspondant est la Trp253<sup>(6.48)</sup>. On parle alors de la position 6.48 du récepteur en question.

### **1.1.2. GPCRs de la classe B**

Les GPCRs de la classe B sont apparentés au récepteur de la sécrétine (FREDRIKSSON *et al*, 2003). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine N-terminal très long qui contient plusieurs ponts disulfures conservés. C'est dans ce domaine N-terminal que se trouve vraisemblablement le domaine de liaison de ces récepteurs. Bien que le pont disulfure reliant la 1<sup>ière</sup> boucle extracellulaire et le haut du TMD3 soit présent chez cette classe, il y a absence des motifs conservés retrouvés chez la classe A. Parmi les récepteurs de la classe B, on retrouve les récepteurs de la calcitonine, de la PTH (parathormone), du CRF (corticotropin-releasing factor), du glucagon, du VIP (vasoactive intestinal peptide) et du PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), qui sont tous des ligands polypeptidiques volumineux.

### **1.1.3. GPCRs de la classe C**

Les GPCRs de la classe C sont apparentés aux récepteurs métabotropiques. Parmi les récepteurs de cette classe, on trouve les récepteurs métabotropiques du

glutamate (mGluR), le récepteur à l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (récepteur GABA<sub>B</sub>), le récepteur 'senseur du calcium' (CaSR) ainsi que les récepteurs aux phéromones et certains récepteurs du goût amer (PIN *et al*, 2003). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un large domaine extracellulaire qui contient le domaine de liaison, formant un motif caractéristique appelé 'venus flytrap' (PIN *et al*, 2003). Les récepteurs de la classe C sont exprimés et fonctionnent obligatoirement en dimères. Les mGluR sont des homodimères (ROMANO *et al*, 1996) tandis que les GABA<sub>B</sub> sont des hétérodimères (JONES *et al*, 1998).

## **1.2. Mécanismes de liaison des GPCRs**

La superfamille des GPCRs est remarquable pour sa diversité, ainsi que pour la diversité de ses ligands. Pour la classe A, ces ligands peuvent être très petits tels des ions, des petites molécules organiques et des lipides ou bien des grosses macromolécules tels les polypeptides, des glycoprotéines ou même des particules virales. Parmi ces récepteurs, ce sont ceux de la lumière (rhodopsine) et des petites amines (adrénergiques, dopaminergiques, cholinergiques) qui ont été les mieux caractérisés pour leur mécanisme de liaison. Ces récepteurs servent de modèles pour la compréhension de la liaison et de l'activation des GPCRs de la classe A. L'identification des domaines de liaison des GPCRs fait actuellement l'objet d'intenses efforts, puisqu'elle pourrait mener à la conception de nouveaux ligands synthétiques ayant des activités souhaitées, ce qui représente un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

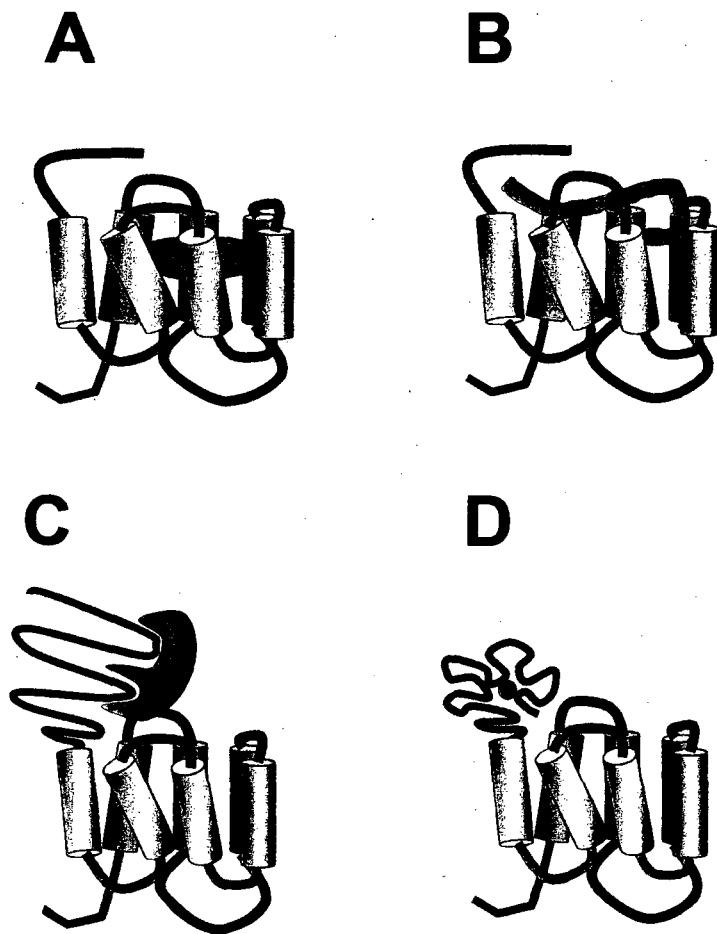
Dans le cas des GPCRs de la classe A qui lient des ligands endogènes de petite taille tels les récepteurs adrénergiques et dopaminergiques, de nombreuses études ont démontré que le site de liaison se situe dans une pochette hydrophile délimitée par le coté extracellulaire de leurs domaines transmembranaires (CHEREZOV *et al*, 2007; JAAKOLA *et al*, 2008; PALCZEWSKI *et al*, 2000; WARNE *et al*, 2008). Dans le cas des récepteurs de la classe A qui lient des ligands plus volumineux comme les peptides, le site de liaison se situe aussi dans les domaines transmembranaires et dans les régions extracellulaires (SCHWARTZ *et al*, 2006). La caractérisation du mode de liaison des récepteurs peptidergiques de la classe A est d'un intérêt considérable, étant donné l'implication de ces récepteurs dans de nombreux processus physiologiques. Il est très intéressant de noter que plusieurs résidus situés à des positions critiques dans les TMDs de la rhodopsine et du récepteur  $\beta 2$  adrénergique et impliqués dans le processus de liaison, sont tout autant critiques pour les propriétés de liaison des GPCRs peptidergiques (CHEREZOV *et al*, 2007; PALCZEWSKI *et al*, 2000; SCHEERER *et al*, 2008). Cela suggère qu'il pourrait y avoir un certain degré de similarité dans les modes de liaison de tous les GPCRs de la classe A et que la rhodopsine et les récepteurs aminergiques pourraient constituer des bons gabarits pour la modélisation par homologie des GPCRs peptidergiques (BALLESTEROS *et al*, 2001b). Toutefois, il a aussi été montré que les récepteurs peptidergiques possèdent des déterminants cruciaux de liaison au niveau des domaines extracellulaires, qui sont généralement absents chez les GPCRs à petits ligands (GETHER, 2000; SCHWARTZ *et al*, 2006). Les GPCRs de la classe B lient des ligands plus volumineux et leurs sites de liaison se situent exclusivement



au niveau du domaine N-terminal et des boucles extracellulaires. Pour les GPCRs de la classe C, le site de liaison se situe également le domaine N-terminal, au niveau du motif 'venus flytrap'. (Figure 3)

### 1.2.1. La rhodopsine

La rhodopsine est sans contredit le GPCR le plus employé dans les études visant à caractériser la structure-activité des GPCRs. En effet, la rhodopsine présente des avantages importants qui facilitent son étude par comparaison aux autres GPCRs. Ce récepteur est présent de façon très homogène et en grande quantité dans la rétine bovine, ce qui facilite grandement son isolation et sa purification. De plus, la rhodopsine, une fois isolée, est relativement stable. Un facteur qui contribue à cette stabilité est le fait que le ligand de la rhodopsine, le 11-*cis* rétinol, y est attaché de façon covalente dans sa pochette de liaison. En absence de lumière, le rétinol agit comme agoniste inverse de la rhodopsine, de façon à maintenir celle-ci dans une conformation inactive. Le 11-*cis* rétinol est retenu par un lien covalent sur une lysine (Lys296<sup>(7.43)</sup>) du TMD7 par la formation d'une base de Schiff protonée. Le contre-ion de cette charge est localisé sur la chaîne latérale du résidu Glu113<sup>(3.28)</sup> (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Ce glutamate situé dans le TMD3 de la rhodopsine contribue à stabiliser la structure globale du récepteur. Lorsque la rhodopsine capte la lumière, il y a isomérisation du 11-*cis* rétinol en all-*trans* rétinol, ce qui mène à une série de mouvements conformationnels à l'intérieur du récepteur et à la stabilisation



**Figure 3. Modes de liaison orthostérique des GPCRs**

Représentation schématique du site de liaison pour les diverses classes de GPCR. A)

Petits ligands de la classe A, B) Ligands peptidiques de la classe A, C) Classe B, D)

Classe C

Figure modifiée de Christopoulos, A et Kenakin, T. (2002)

de la métarhodopsine II, la forme active de la rhodopsine. La rhodopsine en complexe avec le 11- *cis* rétinol a été le premier GPCR à être cristallisé et analysé par diffraction aux rayons X (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Il s'agissait de la première détermination de la structure d'un GPCR, ce qui a permis de visualiser directement les résidus de la rhodopsine qui participent à la formation de sa pochette de liaison. Dans cette structure, le 11-*cis* rétinol est localisé dans une pochette délimitée surtout par les TMD3, TMD5, TMD6 et TMD7 ainsi que par la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Le ligand semble avoir des interactions directes avec plusieurs résidus situés dans ces domaines transmembranaires (Figure 4).

### 1.2.2. Le récepteur $\beta$ 2-adrénergique

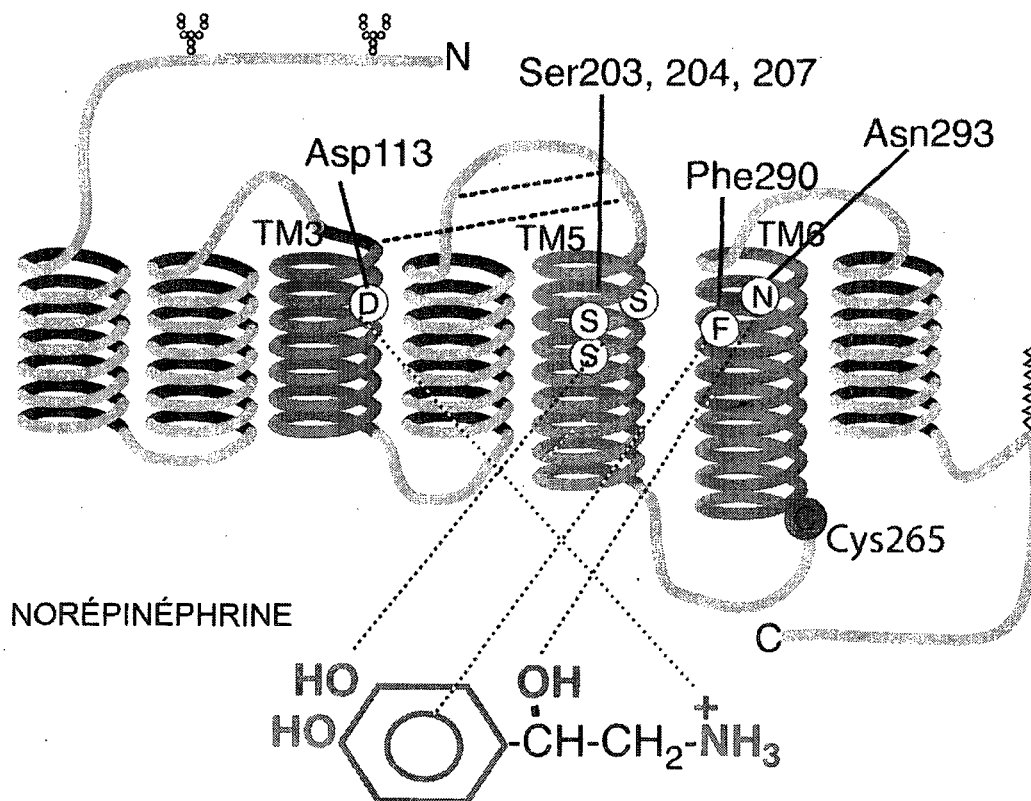
Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est parmi les GPCRs de la famille A les plus étudiés. Ce récepteur reconnaît et est activé par les catécholamines, de petites bioamines chargées. Les sites d'interactions entre les catécholamines et le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique ont d'abord été caractérisés par mutagenèse dirigée (Figure 5). Ces études ont montré que l'amine primaire des ligands agonistes ou antagonistes interagit avec le résidu Asp113<sup>(3.32)</sup> du TMD3 (STRADER *et al*, 1989) et que les groupements hydroxyles de l'anneau catéchol interagissent avec les sérines Ser203<sup>(5.42)</sup>, Ser204<sup>(5.43)</sup> et Ser207<sup>(5.46)</sup> du TMD5 (LIAPAKIS *et al*, 2000; STRADER *et al*, 1989). Pour leur part, l'anneau aromatique et le groupement  $\beta$ -hydroxyle chiral interagissent tous les deux avec des résidus du TMD6, soit avec Phe290<sup>(6.52)</sup> (STRADER *et al*, 1989) et Asn293<sup>(6.55)</sup> (WIELAND *et al*, 1996) respectivement. Ces



Figure 4. Représentation schématique de la pochette de liaison du 11-cis rétinale.

Le 11-cis rétinale est indiqué en magenta. Les chaînes latérales des acides aminés sont colorées en vert à l'exception des atomes d'azote (bleu) et oxygène (rouge). Les résidus Glu113, Ala117, Thr118, Gly121, Glu122, Glu181, Ser186, Tyr191, Met207, His211, Phe212, Phe261, Trp265, Tyr268, Ala269, and Ala292 sont à l'intérieur de 4.5 Å du rétinale. Le pont disulfure reliant Cys110/Cys187 est aussi indiqué.

Figure modifiée de Menon, S. T. (2001)

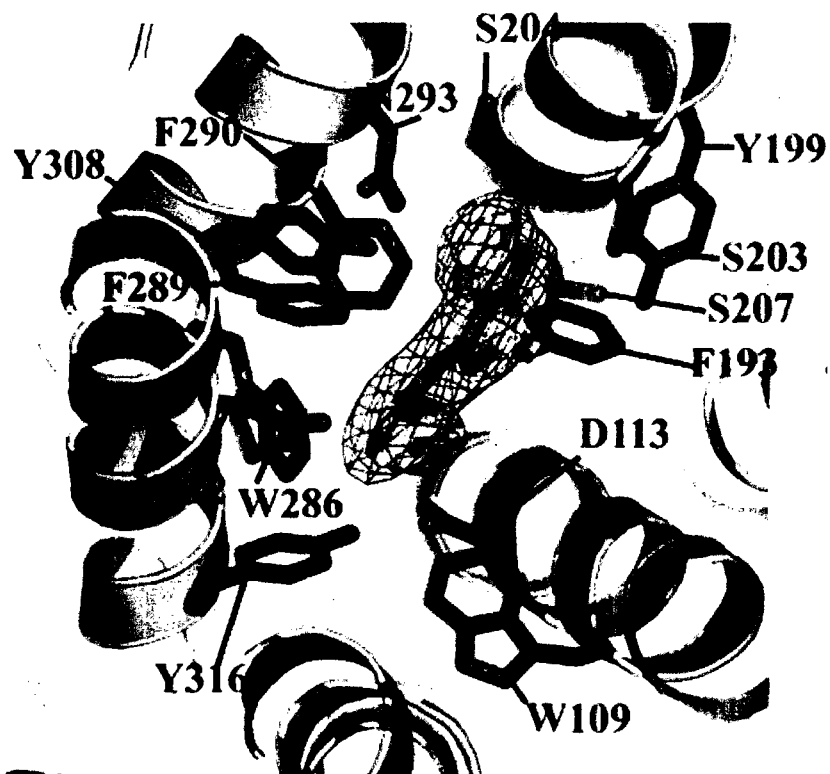


**Figure 5. Représentation schématique du mode de liaison de la noradrénaline avec le récepteur  $\beta_2$  adrénergique**

Les résidus du récepteur  $\beta_2$ AR impliqués dans la liaison ont été identifiés en utilisant une combinaison de mutagenèse dirigée du récepteur et des ligands modifiés. L'amine primaire interagit avec Asp113 du TMD3. Les groupements hydroxyles sur l'anneau catéchol interagissent avec les sérines 203, 204 et 207 du TMD5. Le groupement  $\beta$ -hydroxyle chiral interagit avec Asn293 du TMD6 et l'anneau aromatique interagit avec Phe290 du TMD6.

Figure modifiée de Swaminath, G. et al. (2003)

résultats suggèrent que la pochette de liaison du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est située dans une fente délimitée par le coté extracellulaire des TMD3, TMD5 et TMD6. En 2007, le groupe de Kobilka a cristallisé le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique en complexe avec l'agoniste inverse carazolol en employant deux stratégies différentes (CHEREZOV *et al*, 2007; RASMUSSEN *et al*, 2007). Les difficultés de cristalliser un GPCR pour un ligand diffusible résident dans l'instabilité inhérente de ces protéines, particulièrement autour de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire. Dans la première stratégie, le récepteur a été cristallisé en complexe avec un anticorps qui stabilise la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire (RASMUSSEN *et al*, 2007). Dans l'autre stratégie, la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur a été substituée par le lysozyme T4 afin de faciliter la cristallisation du récepteur (CHEREZOV *et al*, 2007). Les deux stratégies ont permis d'obtenir une structure du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Cette structure a confirmé les études de mutagenèse dirigée précédentes et fourni des informations précieuses sur le mode de liaison du ligand carazolol (Figure 6). Une différence frappante entre cette structure et celle de la rhodopsine est au niveau de la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire. Chez la rhodopsine cette boucle est repliée au dessus du corps du récepteur et semble agir comme un bouchon en contact avec plusieurs positions du rétinol dans la pochette de liaison (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Dans le cas du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, cette boucle est plus ouverte, ce qui laisse un accès libre pour l'entrée du ligand diffusible. De plus, dans le cas du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, cette boucle adopte une structure alphahélicale (CHEREZOV *et al*, 2007). Également, les pochettes de liaison du chromophore rétinol dans la rhodopsine et du carazolol dans le récepteur



**Figure 6. Pochette de liaison du carazolol dans le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique**

Représentation de la pochette de liaison du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique vue par le côté extracellulaire. Le carazolol est indiqué en batonnets avec les atomes carbone colorés en jaune. Les résidus du récepteur qui contribuent à la liaison sont indiqués en vert

Figure modifiée de Cherezov V. (2007)

$\beta$ 2-adrénérique ne sont pas parfaitement superposables, bien qu'elles impliquent les mêmes TMDs (CHEREZOV *et al*, 2007).

### **1.2.3. Les récepteurs peptidergiques de la classe A**

De nombreux GPCRs qui reconnaissent les hormones peptidiques font partie de la classe A. Pour la plupart, les peptides sont de bien plus grosses molécules que les petites amines et il n'est donc pas surprenant que des études aient montré que leur mode de liaison n'est pas identique (SCHWARTZ *et al*, 2006). Comme pour les récepteurs aminergiques, certains résidus impliqués dans la liaison se trouvent au niveau des TMDs. Contrairement aux récepteurs aminergiques, les récepteurs peptidergiques ont des déterminants de liaison localisés dans les régions extracellulaires (GETHER, 2000; SCHWARTZ *et al*, 2006). Parmi les récepteurs peptidergiques, les récepteurs des tachykinines et de l'angiotensine II sont de bons exemples pour décrire les déterminants moléculaires responsables de la liaison.

#### **1.2.3.1. Les récepteurs aux tachykinines**

La substance P (SP), la neurokinine A (NKA) et la neurokinine B (NKB) sont des peptides de la classe des tachykinines qui ont des profils pharmacologiques spécifiques envers leurs trois différents types de récepteurs NK (REGOLI et NANTEL, 1991). Ainsi, le récepteur NK-1 reconnaît la SP avec la plus haute affinité, alors que le récepteur NK-2 préfère la NKA et le récepteur NK-3 préfère la NKB (REGOLI et NANTEL, 1991). Parmi les tachykinines, c'est la SP (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) et son mode de liaison envers le récepteur NK-1 qui



ont été les plus étudiés. Les études de structure-activité sur la SP ont montré que la portion C-terminale conservée (Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) est absolument requise pour l'activité du peptide. Des études de mutagenèse dirigée sur le récepteur NK-1 ont initialement établi que les résidus Asn23, Glu24 et Phe25 du domaine N-terminal, ainsi que His108 dans le haut du TMD3 et Tyr287 dans la partie extracellulaire du TMD7 étaient impliqués dans la liaison avec la SP (FONG *et al*, 1992; HUANG *et al*, 1994). Des études de marquage par photoaffinité ont permis de préciser davantage le mode de liaison de la SP avec son récepteur, en fournissant des détails sur la proximité entre certains résidus du peptide et ceux du récepteur. Ainsi, la position 3 de la SP est à proximité du domaine N-terminal du récepteur (LI *et al*, 1995) et les positions 4 et 5 de la SP sont à proximité de Met174 dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur (LI *et al*, 2001; SACHON *et al*, 2002). La position 8, juxtaposée à la portion C-terminale conservée de la SP, est à proximité de deux résidus méthionine dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire, soit Met174 et Met181 (BOYD *et al*, 1996; KAGE *et al*, 1996). Ces résultats suggèrent que le mode de liaison de la SP implique davantage des déterminants extracellulaires du récepteur NK-1. Par contre, il n'existe actuellement aucune donnée quant au site de contact de l'extrémité C-terminale de la SP. Bien que les expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que des déterminants importants pour la liaison de cette portion du peptide pourraient se trouver dans la partie extracellulaire des TMDs du récepteur NK-1 (HUANG *et al*, 1994), cette hypothèse reste à confirmer.

### **1.2.3.2. Le récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II**

L'octapeptide angiotensine II (Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe (Ang II)) est le médiateur principal du système rénine-angiotensine (DE GASPARO *et al*, 2000). Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont les récepteurs endogènes de l'Ang II, mais c'est le récepteur AT<sub>1</sub> qui est le plus étudié, étant donné que c'est ce récepteur qui est responsable de la grande majorité des effets connus de l'Ang II. En effet, le récepteur AT<sub>1</sub> est une cible pharmacologique d'une importance considérable. Le losartan et ses dérivés -sartans, qui sont des antagonistes non-peptidiques, sont parmi les médicaments pour l'hypertension les plus prescrits.

Initialement, des études utilisant différents analogues de l'Ang II en combinaison avec la mutagénèse dirigée du récepteur AT<sub>1</sub> ont permis l'identification de déterminants moléculaires importants pour la liaison de l'Ang II. Ainsi, on a pu formuler l'hypothèse selon lequel le groupement carboxylate en C-terminal du peptide, de même que les chaînes latérales des résidus Arg<sup>2</sup>, Tyr<sup>4</sup> et His<sup>6</sup> sont cruciaux pour la liaison et pour l'activité de l'Ang II (HSIEH et MARSHALL, 1986). Le remplacement des résidus Tyr<sup>4</sup> et Phe<sup>8</sup> de l'Ang II par des résidus aliphatiques génère des composés antagonistes. Plus précisément, le groupement carboxylate en C-terminal de la Phe<sup>8</sup> formerait une liaison ionique avec la chaîne latérale du résidu Lys199<sup>(5.42)</sup> du récepteur AT<sub>1</sub> (MONNOT *et al*, 1996), alors que la chaîne latérale de la Tyr<sup>4</sup> du peptide lierait le résidu N111<sup>(3.35)</sup> du récepteur AT<sub>1</sub> (FENG *et al*, 1998) et que les chaînes latérales des résidus His<sup>6</sup> et Phe<sup>8</sup> de l'Ang II seraient à proximité des résidus His256<sup>(6.51)</sup> et Phe259<sup>(6.54)</sup> du récepteur AT<sub>1</sub> (NODA *et al*, 1995). De plus, de nombreux autres résidus du récepteur AT<sub>1</sub> seraient impliqués dans la liaison, soit les résidus Arg23, His24, Tyr26 et Ile27 du domaine N-terminal ainsi que Thr88 et

Tyr92 de la première boucle extracellulaire (COSTA-NETO *et al*, 2000; HJORTH *et al*, 1994). Des études de marquage par photoaffinité ont permis d'identifier de façon plus directe les points de contact entre l'Ang II et son récepteur AT<sub>1</sub>. Notamment, la position 1 du ligand entre en contact avec la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur AT<sub>1</sub> (LAPORTE *et al*, 1999), alors que la position 3 du ligand est à proximité du résidu Ile172 dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire (BOUCARD *et al*, 2000) et que la Phe<sup>8</sup> de l'Ang II est à proximité des résidus Phe293<sup>(7.44)</sup> et Asn294<sup>(7.45)</sup> dans le TMD7 (PERODIN *et al*, 2002). Avec une approche de marquage par photoaffinité qui exploite la préférence marquée du groupement photosensible para-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) pour le résidu méthionine (Methionine Proximity Assay (MPA)), tous les résidus qui sont dans un rayon de 8 Å de la position 8 de l'Ang II et qui sont donc situés dans la poche de liaison du récepteur AT<sub>1</sub>, ont été identifiés (CLEMENT *et al*, 2005). Parmi ces résidus, on retrouve Leu112<sup>(3.36)</sup> et Tyr113<sup>(3.37)</sup> dans le TMD3, Phe249<sup>(6.44)</sup>, Trp253<sup>(6.48)</sup>, His256<sup>(6.51)</sup> et Thr260<sup>(6.55)</sup> dans le TMD6 et Phe293<sup>(7.44)</sup>, Asn294<sup>(7.45)</sup>, Asn295<sup>(7.46)</sup>, Cys296<sup>(7.47)</sup> et Leu297<sup>(7.48)</sup> dans le TMD7 (CLEMENT *et al*, 2005). En ce qui concerne le récepteur AT<sub>1</sub>, il est donc clair que des résidus importants pour la liaison se retrouvent dans la portion supérieure des domaines transmembranaires.

### 1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des GPCRs

Afin de propager un signal vers l'intérieur de la cellule, un GPCR doit adopter une conformation active. Dans le modèle le plus simple d'activation, le ligand

agoniste stabilise une conformation active du récepteur (KENAKIN, 2002). Dans sa conformation active, le récepteur met en marche un ou des effecteurs intracellulaires responsables de la réponse cellulaire (KENAKIN, 2003). Les GPCRs possèdent tous une structure commune dictée par l'arrangement des sept TMDs dans la membrane plasmique (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Plusieurs résidus et motifs conservés pour les GPCRs de la classe A ont été impliqués dans leur processus d'activation (SMIT *et al*, 2007). L'ensemble des informations disponibles suggère que tous les GPCRs pourraient partager sensiblement le même mécanisme d'activation. En dépit de toutes les informations disponibles, il reste encore beaucoup de travail à effectuer pour déterminer les différences précises entre les conformations active et inactive des GPCRs.

### 1.3.1. État basal vs état actif

Les GPCRs, comme toutes les protéines, sont des entités dynamiques capables de transition entre de multiples conformations (KENAKIN, 2001; KENAKIN, 2003). Ces diverses conformations des récepteurs sont en équilibre dynamique avec les effecteurs intracellulaires, et les ligands extracellulaires. Le modèle ternaire cubique étendu a été formulé pour décrire l'interaction dynamique entre le récepteur, son ligand et sa protéine G effectrice (DE LEAN *et al*, 1980).

Généralement, la forme basale d'un GPCR est la plus énergétiquement favorable en absence de ligand. La liaison d'un agoniste complet stabilise une conformation active du récepteur, ce qui augmente l'affinité du récepteur pour sa protéine G et mène à une signalisation maximale. Pour leur part, les agonistes partiels

stabilisent une conformation semi-active du récepteur, qui ne mène pas à une signalisation maximale (SEIFERT *et al*, 2001). Les agonistes inverses vont plutôt stabiliser la conformation inactive du récepteur (KENAKIN, 2004a). Enfin, les antagonistes neutres occupent le site de liaison du récepteur, mais n'ont aucune influence sur l'adoption des diverses conformations du récepteur. En fait, les antagonistes ne font que bloquer l'accès de l'agoniste au récepteur. Parce que la notion d'agoniste inverse n'a été proposée que très récemment, à la suite de la découverte de l'activité constitutive de certains récepteurs (qui peuvent adopter une conformation active en absence d'agoniste), la plupart des ligands qui avaient été initialement caractérisés comme des antagonistes sont maintenant reclassifiés comme des agonistes inverses (MILLIGAN, 2003).

La majorité des GPCRs possèdent un faible niveau d'activité constitutive (détectée en absence d'agoniste) (SEIFERT et WENZEL-SEIFERT, 2002). Dans la plupart des cas, cette faible activité n'est pas suffisante pour mener à une réponse cellulaire mesurable. Certaines mutations peuvent déstabiliser la forme inactive d'un GPCR et favoriser des conformations plus actives : ce sont les mutants constitutivement actifs (CAMs) (COTECCHIA *et al*, 2003). Plusieurs CAMs ont été répertoriés jusqu'à maintenant ([www.gpcr.org](http://www.gpcr.org)) et certains de ceux-ci causent des maladies. Par exemple, des mutants constitutivement actifs de la rhodopsine, du récepteur de la TSH, du récepteur de la LH, du récepteur de la PTH et du récepteur du  $\text{Ca}^{2+}$  sont à l'origine de la rétinopathie pigmentaire (KEEN *et al*, 1991), de l'adénome thyroïdien toxique (CORVILAIN *et al*, 2001), de la puberté précoce (ZHANG *et al*,

2005a), de la chondrodysplasie de Jensen (SCHIPANI *et al*, 1995), et de l'hypocalcémie familiale (PIDASHEVA *et al*, 2004), respectivement.

Dans des études qui visent à identifier et caractériser les mouvements qui accompagnent l'activation d'un GPCR, il est nécessaire de discriminer entre les conformations basales et actives du récepteur. Pour ce faire, deux stratégies peuvent être envisagées: 1) L'utilisation des ligands agonistes ou antagonistes appropriés pour favoriser l'état actif ou inactif du récepteur. 2) L'utilisation d'un mutant constitutivement actif comme modèle de l'état actif et d'un récepteur de type sauvage (en absence d'agoniste) comme modèle de l'état inactif.

### **1.3.2. Modèles d'activation des GPCRs : de la liaison vers l'activation**

Le mécanisme par lequel un GPCR adopte son état actif est encore très mal compris. À la fin du 19<sup>ième</sup> siècle, Emil Fischer a proposé sa célèbre analogie 'clé dans une serrure' pour visualiser la spécificité des substrats pour leur enzyme (FISCHER, 1894). L'enzyme était considérée comme une serrure rigide dans lequel le substrat, la clé, devait entrer. Dans le même ordre d'idée, un récepteur peut être considéré comme une serrure et son ligand comme une clé. Si le ligand possède un caractère agoniste, il peut tourner dans la serrure et enclencher le mécanisme, s'il possède un caractère antagoniste, il ne fait qu'obstruer la serrure sans modifier la position du mécanisme. Cette vision est maintenant beaucoup trop simpliste. Déjà il y a plus de 50 ans, Koshland a formulé le concept de 'induced fit' pour expliquer la sélectivité d'un enzyme pour son substrat (KOSHLAND, 1958). Ce modèle d'induction peut aussi s'appliquer dans le cas des récepteurs. Dans ce modèle

d'induction, l'agoniste induit un changement dans la conformation du récepteur, ce qui mène à la stabilisation d'un état actif. Un autre modèle expliquant comment l'agoniste peut activer son récepteur est le modèle de la sélection conformationnelle (conformational selection) (BOSSHARD, 2001; KENAKIN, 2003). Selon ce modèle de sélection, un ligand choisit et stabilise une conformation unique parmi toutes les conformations possibles du récepteur. Bien entendu, c'est l'activité intrinsèque d'un ligand (agoniste, antagoniste, agoniste inverse) qui va dicter la conformation stabilisée. Aujourd'hui, il est reconnu que les deux modèles ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs (GETHER et KOBILKA, 1998). En effet, une combinaison d'induction et de sélection conformationnelle semble représenter la meilleure description théorique du processus d'activation (BOSSHARD, 2001; SCHWARTZ *et al*, 2006).

### **1.3.3. Changements conformationnels impliqués dans l'activation des GPCRs**

La transition d'un GPCR de sa forme inactive vers sa forme active passe par un changement de conformation. La détermination des mouvements qui mènent à l'activation des GPCRs requiert le développement de techniques permettant de fournir des informations sur la nature des changements physiques qui surviennent pendant cette transition. Les premières études pour déterminer les changements de conformation d'un GPCR ont été effectuées avec la rhodopsine. L'idée que l'activation de la rhodopsine est accompagnée de changements conformationnels significatifs a d'abord été montrée en utilisant certaines approches biophysiques. D'une part, Lin et Sakmar ont utilisé la spectroscopie par absorbance UV sur résidu

tryptophane pour montrer un mouvement à grande échelle du TMD6 par rapport au TMD3 lors de l'activation de la rhodopsine (LIN et SAKMAR, 1996). La mutation des résidus tryptophanes à l'intérieur de ces TMDs éliminait la signature spectrale qui différenciait les formes actives et inactives de la rhodopsine dans les spectres d'absorbance UV. Dans une autre étude importante, Farrens et collaborateurs ont pris avantage des propriétés spectrales des marqueurs de spin nitroxydes pour également observer un mouvement similaire (FARRENS *et al*, 1996). Lors de cette étude, des doubles mutants cystéines de la rhodopsine qui incorporent des spins nitroxydes ont été dérivés. Lorsque les deux dipôles magnétiques ainsi introduits sont suffisamment proches, cela résulte en un élargissement de la ligne spectrale caractéristique en spectroscopie EPR. De cette façon, les mouvements relatifs entre deux acides aminés suite à l'activation de la rhodopsine peuvent être interprétés (FARRENS *et al*, 1996). Plus récemment, en utilisant la spectroscopie par résonance double électron-électron (DEER), le groupe de Hubbell a montré que lors de l'activation de la rhodopsine, la partie cytoplasmique du TMD6 s'éloigne d'une distance de 5 Å vers l'extérieur du corps du récepteur, et que les parties extracellulaires du TMD7, du TMD1 et de l'hélice 8 (au début de la queue C-terminale) font également des mouvements (ALTENBACH *et al*, 2008). Par contre, selon cette étude les résidus extracellulaires des TMD2, TMD3 et TMD4 restent fixes lors de l'activation.

Des études ont aussi été faites pour caractériser le mode d'activation des GPCRs à ligands diffusibles. Le groupe de Schwartz a détecté des changements conformationnels lors de l'activation d'un mutant du récepteur  $\beta_2$  adrénergique où un site de coordination pour le zinc avait été introduit (SCHWARTZ *et al*, 2006). Chez



ce mutant, le zinc peut fonctionner comme un agoniste non-spécifique du récepteur s'il permet de stabiliser une forme active. Ces études ont permis de déduire que les portions extracellulaires des TMD3, TMD6 et TMD7 se rapprochent les unes des autres lors de l'activation du récepteur  $\beta_2$  adrénergique. Une autre méthodologie intéressante, mise au point par le groupe de Wess, est la réticulation des ponts disulfures (disulfide cross-linking) entre deux résidus cystéines (WESS *et al*, 2008). Le principe est d'introduire deux résidus cystéine à des endroits stratégiques dans un GPCR. Suite au traitement dans des conditions oxydantes, en présence d'un agoniste ou d'un agoniste inverse, un pont disulfure est formé uniquement si les cystéines introduites sont à proximité. Ces études ont montré que la liaison de l'agoniste favorise certains changements structuraux sur le côté intracellulaire du récepteur muscarinique M3. Les mouvements détectés sont les suivants : 1) Le segment cytoplasmique du TMD6 se rapproche de celui du TMD5, 2) la portion cytoplasmique du TMD7 se rapproche du segment correspondant du TMD1 et 3) l'extrémité N-terminale de l'hélice 8 s'éloigne de la portion cytoplasmique du TMD1. Il a été proposé que l'activation du récepteur ouvre une fente sur sa surface intracellulaire, exposant ainsi des déterminants d'interaction avec la protéine G. Il est également possible d'exploiter les différences de conformation entre un récepteur à l'état basal et un récepteur constitutivement actif pour caractériser les mouvements qui surviennent lors de l'activation. Par exemple, l'approche SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method, (sera décrite plus en détails à la section 3.2.1) a été utilisée pour identifier les résidus situés dans la pochette de liaison du récepteur AT<sub>1</sub> dans sa forme basale et dans sa forme constitutivement active (avec le mutant

constitutivement actif N111G-AT<sub>1</sub>). Cette série d'études a montré que lors de l'activation du récepteur AT<sub>1</sub>, le TMD7 s'éloigne de la pochette de liaison (BOUCARD *et al*, 2003a), le TMD3 fait une légère rotation dans le sens antihoraire (MARTIN *et al*, 2004) et le TMD6 fait un mouvement de pivot (MARTIN *et al*, 2007), ce qui rapproche les résidus situés sur le côté extracellulaire vers la pochette de liaison tandis que les résidus sur le côté extracellulaire s'éloignent de la pochette.

L'ensemble des études qui se sont intéressées au processus d'activation des GPCRs permettent de dégager un certain consensus. Lors de l'activation, le côté extracellulaire des TMDs du récepteur doit se rapprocher et se refermer sur le ligand, ce qui provoque une ouverture du côté cytoplasmique du récepteur, ce qui permet l'interaction efficace avec les effecteurs (ROSENBAUM *et al*, 2007; SCHWARTZ *et al*, 2006).

#### **1.3.4. Rôle des motifs conservés dans le processus d'activation**

Chez les GPCRs de la classe A, le haut degré de conservation de certains résidus suggère qu'ils sont impliqués dans le processus d'activation, soit au niveau du maintien du récepteur dans sa forme inactive, ou bien lors de la transition du récepteur vers sa forme active (SMIT *et al*, 2007). Dans plusieurs cas, la mutation de ces résidus conservés influence la fonctionnalité du récepteur. La détermination de la structure de plusieurs GPCRs a jeté une nouvelle lumière sur le rôle que pouvaient avoir ces résidus au sein du récepteur, et a permis de suggérer certains mécanismes potentiels d'activation des GPCRs de la classe A (SMIT *et al*, 2007).

#### 1.3.4.1. Motif D/ERY

Chez les GPCRs de la classe A, le motif DRY ou ERY (D/ERY) est celui qui a été le plus étudié. Les 3 résidus qui composent ce motif sont une aspartate (une glutamate peut aussi être retrouvée) en position 3.49, une arginine en position 3.50 et une tyrosine en position 3.51. Le motif D/ERY est situé sur le coté cytoplasmique du TMD3, à l'interface de la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire.

Plusieurs études ont démontré que ce motif joue un rôle central pour la régulation de l'état conformationnel des GPCRs de la classe A (ROVATI *et al*, 2007). En effet, dans plusieurs cas, la substitution d'un des résidus de ce motif, le plus souvent aspartate, mène à l'activation constitutive des GPCRs. Par exemple, chez le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, la mutation de l'aspartate se trouvant en position 3.49 par une asparagine ou alanine mène à différents degrés d'activité constitutive (RASMUSSEN *et al*, 1999). Ces observations ont mené à la formulation de l'hypothèse de la serrure ionique (BALLESTEROS *et al*, 2001a). Dans ce modèle, Arg<sup>(3.50)</sup> est impliquée dans une interaction ionique avec Asp<sup>(3.49)</sup> adjacente ainsi qu'avec un résidu chargé en position 6.30 situé dans le TMD6. L'interaction intramoléculaire stabilisante entre ces trois résidus serait importante pour le maintien du récepteur dans sa forme inactive et cette interaction doit être brisée lors de l'activation. Une mutation à l'intérieur du motif pourrait déstabiliser l'interaction et mener à l'activité constitutive du récepteur. La structure de la rhodopsine, déterminée par cristallographie, semble appuyer cette hypothèse de la serrure ionique (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Dans cette structure, les résidus Asp<sup>(3.49)</sup> et Arg<sup>(3.50)</sup> du motif DRY sont suffisamment proches de la position 6.30 pour que l'interaction

puisse avoir lieu. Cependant, pour le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, la distance entre les positions 3.49/3.50 et 6.50 ne favorise pas cette interaction. Chez certains GPCRs, la substitution d'un résidu du motif DRY ne mène pas à l'activité constitutive (ROVATI *et al*, 2007).

D'autres groupes ont suggéré que lors de l'activation, les résidus du motif DRY sont impliqués dans une interaction directe avec la protéine G. En effet, la mutation à l'intérieur du motif conduit souvent à une forme inactivable du récepteur (PROULX *et al*, 2008a; ROVATI *et al*, 2007). La résolution récente de la forme cristalline de l'opsine (la rhodopsine en absence de rétinol) en complexe avec un fragment de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G semble appuyer cette hypothèse. Dans cette structure, le motif DRY est impliqué dans une interaction directe avec le fragment de la sous-unité  $\alpha$  (SCHEERER *et al*, 2008).

#### 1.3.4.2. Motif NPxxY

Le motif NPxxY (N<sup>7.49</sup> P<sup>7.50</sup>, x, x, Y<sup>7.52</sup>) se situe dans le TMD7. Jusqu'à maintenant, les études de mutagenèse dirigée n'ont pas permis de démasquer un rôle précis pour ce motif chez les GPCRs de la classe A. Jusqu'à maintenant, il a été rapporté que la mutation à l'intérieur du motif NPxxY produit des changements au niveau de la capacité du récepteur à coupler à la protéine G, d'activer la voie des MAPK, son degré de phosphorylation et la capacité du récepteur à être internalisé (GRIPENTROG *et al*, 2000; HE *et al*, 2001; KALATSKAYA *et al*, 2004; KRAMER *et al*, 2000; PRIOLEAU *et al*, 2002). Il a aussi été suggéré que ce motif pourrait jouer

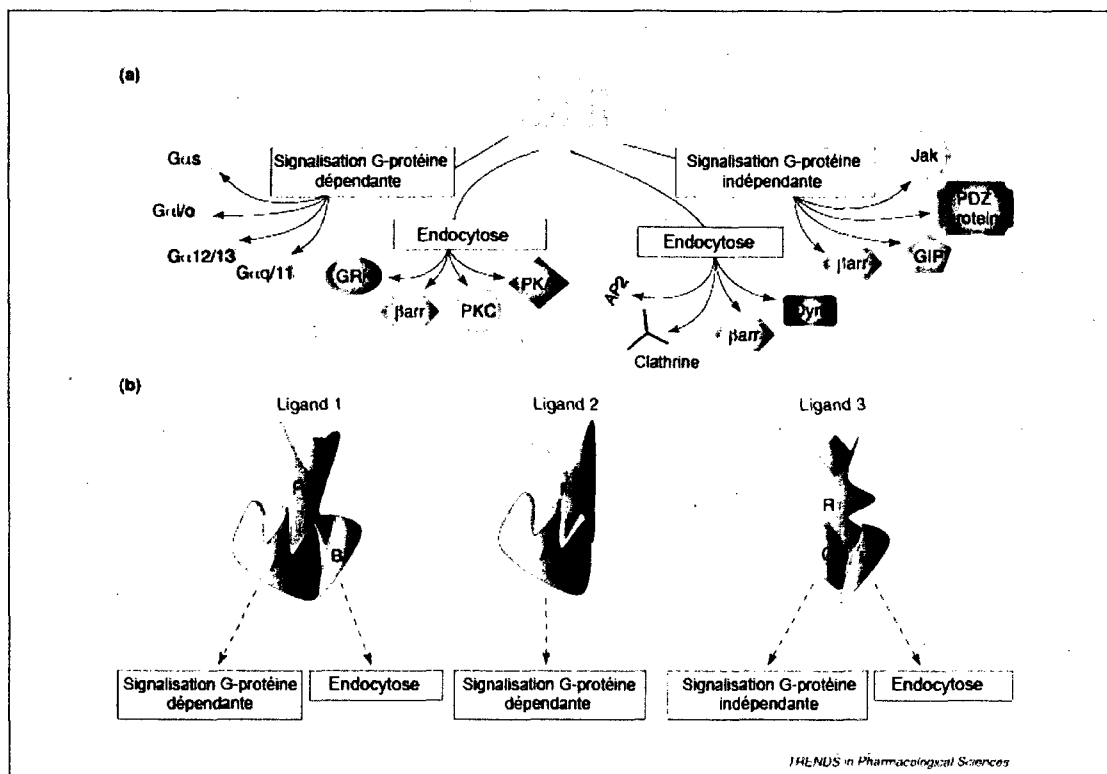
le rôle d'un interrupteur moléculaire qui serait important dans la transition du récepteur de son état basal vers son état actif (GOVAERTS *et al*, 2001; URIZAR *et al*, 2005). Selon cette hypothèse, le résidu Asn<sup>7.49</sup> est orienté vers le TMD6 dans la forme inactive et lors de l'activation, ce résidu se réoriente de façon à interagir avec D<sup>2.50</sup> du TMD2 (URIZAR *et al*, 2005).

#### 1.3.4.3. Motif CW/FLP

Le résidu P<sup>6.50</sup> fait partie du motif CW/FLP. Il est connu que la présence d'une proline à l'intérieur d'un segment alphahélical introduit une déviation dans l'hélice. Il a été proposé que cette proline puisse agir en tant que charnière moléculaire lors de l'activation des GPCRs de la classe A (SHI *et al*, 2002). Ce mécanisme est connu sous le nom de rotamer toggle switch (SCHWARTZ *et al*, 2006; SHI *et al*, 2002). Selon le modèle, des interactions intramoléculaires gardent les positions Cys<sup>(6.47)</sup> et Trp<sup>(6.48)</sup> dans une orientation qui favorise le maintien de la forme inactive. Le ligand agoniste pourrait favoriser de nouvelles interactions, en particulier avec Trp<sup>(6.48)</sup> (aussi décrite comme la 'tryptophan switch'), ce qui mènerait à un réarrangement qui modifie l'orientation de l'angle causé par Pro<sup>6.50</sup>. Un mouvement de pivot autour de cette charnière pourrait mener à un déplacement de la portion cytoplasmique du TMD6 pour l'éloigner du TMD3 et exposer des déterminants moléculaires au niveau de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire (SCHWARTZ *et al*, 2006).

### 1.3.5 Sélectivité fonctionnelle des ligands

Il est aujourd'hui bien démontré que les GPCRs peuvent activer des voies de signalisation indépendantes de la voie des protéines G. Par exemple, suite à l'activation, le récepteur peut recruter les arrestines, qui en plus de leur rôle dans la désensibilisation du récepteur, peuvent servir de protéines d'échafaudage pour mettre le récepteur en lien avec la voie des ERK1/2 (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). Ainsi, parmi les multiples conformations que peuvent adopter un GPCR, certaines favoriseraient l'interaction avec les protéines G, mais d'autres seraient plus propices à activer d'autres effecteurs. Ces conformations peuvent être stabilisées par des ligands autres que le ligand endogène du récepteur. Ce concept est appelé la sélectivité fonctionnelle des ligands ou le trafic du signal par les ligands (GALANDRIN *et al*, 2007; KENAKIN, 1995)(Figure 7). Il est non seulement important de comprendre comment un agoniste peut causer l'activation d'un GPCR par la voie classique des protéines G, mais aussi de pouvoir identifier ces déterminants spécifiques qui mènent à l'activation ou à l'inactivation des autres voies de signalisation (AUDET et BOUVIER, 2008; KENAKIN, 2004b). Avec une meilleure connaissance de ces déterminants spécifiques, il sera possible de concevoir des ligands synthétiques qui activent ou bloquent sélectivement chacune des voies de signalisation sans toucher aux autres. De tels ligands suscitent actuellement un intérêt considérable pour l'industrie pharmaceutique.



**Figure 7. Sélectivité fonctionnelle des ligands**

A) Représentation schématique des voies de signalisation que peuvent employer les GPCRs et les types d'activités qui peuvent être régulées. Ces activités incluent la modulation des voies de signalisation protéines G-dépendantes ou -indépendantes, la désensibilisation et l'endocytose. B) Représentation schématique du trafic par le ligand. Trois ligands différents peuvent promouvoir la stabilisation de trois conformations distinctes d'un récepteur et mener à des profils de signalisation différents.

Figure modifiée de Galandrin et al. (2007).

## **2. Le système urotensine II**

### **2.1. Urotensine II**

#### **2.1.1. Découverte**

En 1969, Bern et Lederis ont observé que des extraits d'urophyse du poisson *Gillichthys mirabilis* (gobie) possédaient des activités stimulatrices sur divers systèmes. L'urophyse est une structure neuroendocrine, présente uniquement chez les poissons, et qui peut s'apparenter à la neurohypophyse des mammifères. Dans une tentative de classification des effets observés, le terme 'urotensine I fut utilisé pour désigner cet agent pouvant influencer la pression sanguine, notamment en produisant une réponse hypotensive chez le rat. Par contre, cette substance pouvait causer la contraction du muscle lisse, en particulier le rectum de truite, fut nommée urotensine II (U-II) (BERN et LEDERIS, 1969). L'U-II a été isolée et sa séquence fut déterminée pour la première fois en 1980 à partir des extraits d'urophyse (PEARSON *et al*, 1980). Il s'agit d'un peptide de 12 acides aminés qui présente une homologie avec la somatostatine de part la présence d'un pont disulfure. Par la suite, l'U-II a été isolée chez de nombreuses espèces de poisson et quelques organismes inférieurs. Bien que l'U-II ait été longtemps considérée comme un 'peptide de poisson', sa détection chez la grenouille a suggéré qu'il pourrait avoir un rôle chez les espèces supérieures (CONLON *et al*, 1992). Finalement, à la fin des années 90, le gène de l'U-II fut cloné chez de nombreuses espèces dont l'humain (COULOUARN *et al*, 1999; COULOUARN *et al*, 1998). De nos jours, l'U-II est considérée comme un régulateur de divers processus physiologiques chez les mammifères et semble être impliquée,



chez l'humain, dans diverses pathophysiologies dont l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose, l'insuffisance rénale et le diabète (ONG *et al*, 2005).

### **2.1.2. Expression, maturation et localisation**

Chez l'humain, l'U-II mature est un peptide cyclique de 11 acides aminés. Tous les peptides U-II isolés jusqu'à maintenant possèdent une portion C-terminale cyclique de 6 acides aminés. Cette séquence a été strictement conservée à travers l'évolution (Tableau 1), ce qui suggère son importance pour l'activité du peptide. À l'intérieur de la portion cyclique de l'U-II se trouve le triplet WKY (Trp-Lys-Tyr), qui est une séquence aussi retrouvée chez la somatostatine (PEARSON *et al*, 1980). De nombreuses études de structure-activité ont identifié les éléments cruciaux responsables de l'activité de l'U-II (FLOHR *et al*, 2002; KINNEY *et al*, 2002; LABARRERE *et al*, 2003). La portion cyclique de l'U-II est absolument requise pour l'activité du peptide. À souligner, la présence du pont disulfure reliant les cystéines 5 et 10 ainsi que les résidus WKY à l'intérieur du cycle sont absolument nécessaires à l'activité de l'U-II (FLOHR *et al*, 2002). Par contre des substitutions à l'intérieur de la partie N-terminale non-cyclique du peptide sont bien tolérées, et c'est d'ailleurs dans cette portion que se situe la variabilité entre les espèces.

Comme la grande majorité des hormones peptidiques, l'U-II est d'abord exprimée sous forme de proprotéine, la proU-II, qui doit subir une maturation enzymatique afin de générer sa forme pleinement active (CHARTREL *et al*, 2004).

Espèces	Séquences
<b>UII</b>	
Lamproie eau mer	H Asn-Asn-Phe-Ser-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Lamproie eau douce	H Asn-Asn-Phe-Ser-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Fugu	H Thr-G y-Asn-Asn-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Skate	H Asn-Asn-Phe-Ser-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Roussette	H Asn-Asn-Phe-Ser-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Esturgeon	H G y-Ser-Thr-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson-spatule	H G y-Ser-Thr-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Goby	H Al a-G y-Thr-Al a-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson zèbre $\alpha$	H G y-G y-G y-Al a-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson zèbre $\beta$	H G y-Ser-Asn-Thr-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Sucker A	H G y-Ser-G y-Al a-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Sucker B	H G y-Ser-Asn-Thr-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe $\alpha$	H G y-G y-G y-Al a-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe $\beta 1$	H G y-G y-Asn-Thr-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe $\beta 2$	H G y-Ser-Asn-Thr-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe $\gamma$	H G y-G y-G y-Al a-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-I l e-CH
Flet	H Al a-G y-Thr-Thr-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Truite	H G y-G y-Asn-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Grenouille	H Al a-G y-Asn-Leu-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poulet	H G y-Asn-Leu-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Souris	<G n-H s-Lys-G n-H s-G y-Al a-Al a-Pro-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-I l e-CH
Rat	<G n-H s-G y-Thr-Al a-Pro-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-I l e-CH
Porc A	H G y-Pro-Thr-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Porc B	H G y-Pro-Pro-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Vache	H G y-Pro-Ser-Ser-G u Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Singe	H G u-Thr-Pro-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Humain	H G u-Thr-Pro-Asp Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
<b>URP</b>	
Poisson zèbre	H Val Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ser-G n-Asn-CH
Poulet	H Al a Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-I l e-CH
Souris	H Al a Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Rat	H Al a Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Humain	H Al a Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH

**Tableau 1. Comparaison de la séquence primaire de l'urotensine II et de l'URP provenant de diverses espèces.**

La portion conservée de l'UII et de l'URP est encadrée. Le pont disulfure est illustré en bleu.

Tableau adapté de Leprince, J. (2008)

L'enzyme responsable de la maturation de U-II n'a toujours pas été formellement identifiée mais ce clivage est probablement dû à l'activité de la proprotéine convertase PC1 ou PC2 dans la voie de sécrétion régulée des cellules endocrines et neuronales (BERGERON *et al*, 2000)(Caroline St-Pierre, mémoire de maîtrise).

L'U-II est exprimée de façon très large chez l'humain (ONG *et al*, 2005). Plusieurs études ont montré que les niveaux les plus élevés d'ARN messager du précurseur d'U-II sont retrouvés dans le système nerveux central, plus précisément au niveau de la moelle épinière et de la médulla oblongata (SUGO *et al*, 2003). L'ARNm de proU-II est aussi retrouvé à des niveaux plus faibles dans le cerveau, le cœur, les reins, le foie, l'aorte, le pancréas, la rate, l'intestin, le colon, le placenta ainsi que dans les cellules endothéliales vasculaires (MATSUSHITA *et al*, 2001; SUGO *et al*, 2003; TOTSUNE *et al*, 2003; TOTSUNE *et al*, 2001).

### **2.1.3. Urotensin II-Related Peptide (URP)**

En 2003, un peptide ayant une forte homologie avec l'U-II fut isolé du cerveau de rat par le groupe de Sugo (SUGO *et al*, 2003) et nommé U-II-Related Peptide (URP). Ce peptide, issu d'un gène différent de l'U-II et subissant sa propre maturation, est composé de la séquence cyclique conservée d'U-II (ACFWKYCV). Jusqu'à maintenant, on n'a pas trouvé de rôle précis pour ce second ligand du récepteur UT. Son expression est très large, tout comme celle de l'U-II (DUBESSY *et al*, 2008; SUGO *et al*, 2003).

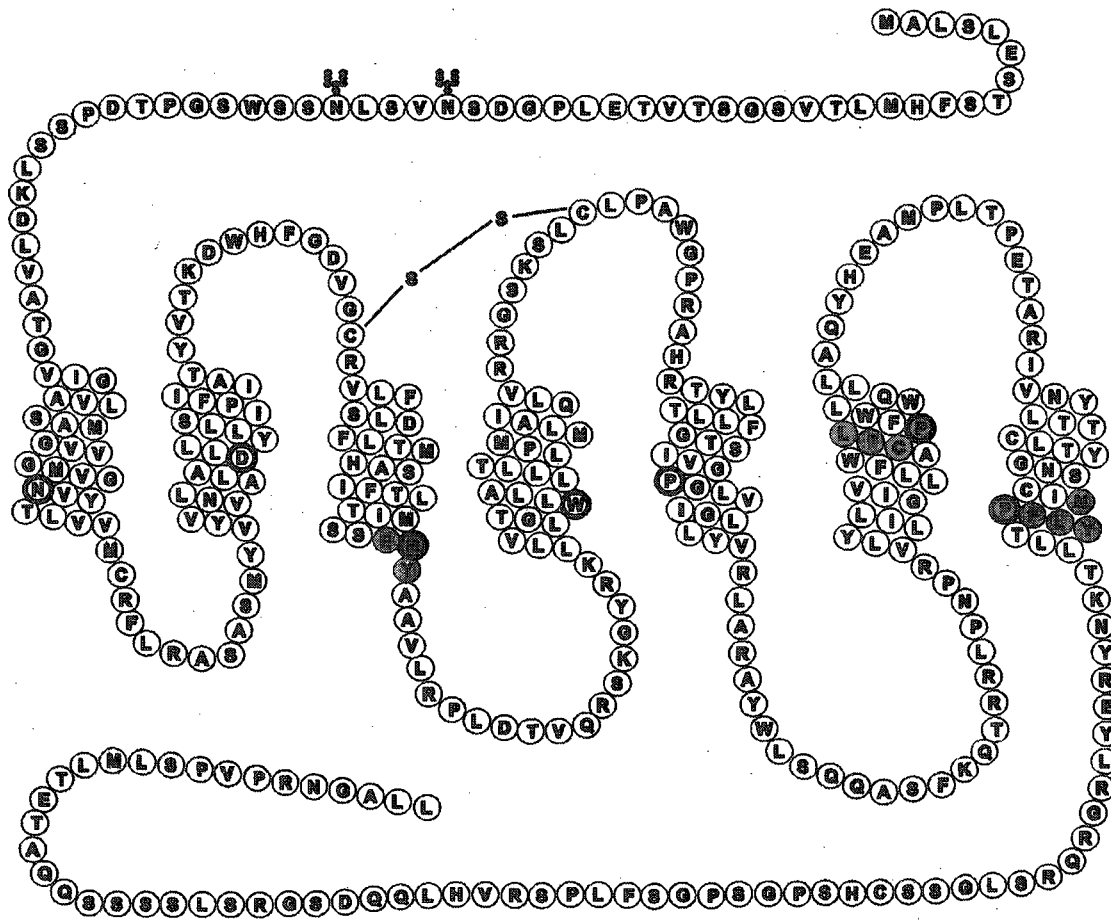
## 2.2. Récepteur de l'urotensine

### 2.2.1. Découverte

Les effets contractiles de l'U-II de poisson sur les vaisseaux et les muscles de mammifères suggéraient la présence d'un récepteur fonctionnel pour cette substance (GIBSON *et al*, 1986). En 1995, Marchese et collaborateurs ont cloné, chez le rat, plusieurs GPCRs orphelins (dont les ligands naturels ne sont pas connus), dont un récepteur qu'ils ont nommé GPR14 (MARCHESE *et al*, 1995). Il avait été noté que GPR14 possédait une homologie avec les récepteurs de la somatostatine, des opiacés et de la galanine (MARCHESE *et al*, 1995). En 1999, Ames et collaborateurs ont 'déorphelinisé' le récepteur GPR14 en montrant que l'U-II était son ligand endogène. Ils ont utilisé une approche de pharmacologie inverse, où GPR14 a été mis en présence de plus de 700 peptides connus dans le but d'observer une réponse cellulaire (AMES *et al*, 1999). Peu de temps après, trois autres groupes ont corroboré cette découverte (LIU *et al*, 1999; MORI *et al*, 1999; NOTHACKER *et al*, 1999). L'homologue humain de GPR14 a aussi été cloné (AMES *et al*, 1999). La liaison de l'U-II sur GPR14 est saturable et de haute affinité. On sait maintenant que l'U-II exerce l'ensemble de ses effets via le récepteur GPR14, qui fut subséquemment renommé récepteur UT (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2444>)

### 2.2.2. Structure

Le récepteur UT possède 386 acides aminés (Figure 8). Il fait partie de la superfamille des GPCRs à sept domaines transmembranaires de la classe A (AMES *et al*, 1999). On retrouve chez le récepteur UT plusieurs caractéristiques de la classe A, dont un domaine N-terminal relativement court, un résidu hautement conservé dans chaque domaine transmembranaire ainsi que deux cystéines conservés dans les premier et deuxième domaines extracellulaires qui forment un pont disulfure (Figure X). Le récepteur UT possède d'autres motifs caractéristiques de la classe A des GPCRs tels que le motif D/ERY à la jonction du TMD3 et de la deuxième boucle intracellulaire, le motif NPxxY situé dans le TMD7 et le motif CW/FLP dans le TMD6 (ONAN *et al*, 2004). Le récepteur UT possède 2 sites potentiels de glycosylation dans la queue N-terminale aux positions 29 et 33. Dans la portion cytoplasmique du récepteur se trouvent plusieurs résidus sérines et thréonines (ONAN *et al*, 2004), qui sont des sites putatifs de phosphorylation impliqués dans la désensibilisation du récepteur (PROULX *et al*, 2008b). Le récepteur UT a été cloné chez plusieurs espèces, dont l'humain, le singe, le rat, la souris et le chat (AMES *et al*, 1999; BEHM *et al*, 2004; ELSHOURBAGY *et al*, 2002). L'homologie entre le récepteur UT humain (hUT) et le récepteur UT de rat (rUT) est de 74%. Le récepteur UT partage une homologie de 27% avec le récepteur de la somatostatine SSTR4, cette homologie monte à 41% si on compare uniquement les domaines transmembranaires. Le récepteur UT possède également une faible homologie avec les récepteurs opioïdes  $\mu$ OR (26%),  $\delta$ OR (26%) et  $\kappa$ OR (25%) (PROULX *et al*, 2008b).



**Figure 8. Représentation schématique du récepteur UT de rat.**

Les résidus encadrés en gras sont les résidus les mieux conservés dans chacun des TMDs. Les motifs ERY, NPxxY et CW/FLP sont illustrés en rouge. Les sites de glycosylation et le pont disulfure sont également illustrés.

### **2.2.3. Localisation**

Des études d'hybridation *in situ*, d'immunocytochimie, de liaison et de RT-PCR ont montré que le récepteur UT a une distribution assez large chez l'humain (AMES *et al*, 1999). On retrouve des bon taux d'expression du récepteur au niveau du système nerveux central, soit dans plusieurs régions du cerveau et de la moelle épinière (JEGOU *et al*, 2006) mais aussi en périphérie, avec des taux d'expression élevés au niveau des muscles squelettiques, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales vasculaires, du myocarde ventriculaire, de l'hypophyse, de la thyroïde, de la glande surrénale et du cortex rénal (AMES *et al*, 1999; MAGUIRE *et al*, 2000; MAGUIRE *et al*, 2008). Cette distribution de l'expression du récepteur UT et de son ligand endogène l'U-II suggère qu'il s'agit d'un système paracrine. Par contre l'U-II possède également les caractéristiques d'une hormone circulante et pourrait réguler des systèmes tels le système cardiovasculaire d'une façon endocrine.

## **2.3. Actions physiologiques de l'U-II**

Jusqu'à maintenant, de nombreux effets attribuables à l'U-II ont été observés, tant au niveau central qu'au niveau périphérique.

### **2.3.1. Actions périphériques**

### 2.3.1.1. Rôle dans le système cardiovasculaire

Les effets de l'U-II sur le système cardiovasculaire ont suscité énormément d'intérêt depuis sa découverte. Lorsque administré chez d'autres espèces que le poisson, la vasoconstriction, ainsi que la vasodilatation dépendante de l'endothélium ont été parmi les premiers effets observés (CONLON *et al*, 1996; GIBSON *et al*, 1986). Ces études suggéraient que l'U-II et son récepteur pouvaient se retrouver chez des espèces plus évoluées que les poissons et potentiellement y jouer un rôle. Suite à l'identification du récepteur de l'U-II, Ames *et al* ont rapporté que l'U-II était le plus puissant vasoconstricteur connu, de l'ordre de 10 fois plus puissant que l'endothéline sur l'aorte de rat (AMES *et al*, 1999). De plus, le même groupe a montré que l'injection d'U-II *in vivo* chez le singe anesthésié provoque une vasoconstriction artérielle systémique qui se traduit par une augmentation de la résistance périphérique, ce qui mène à un collapsus circulatoire et entraîne la mort (AMES *et al*, 1999). Ces effets spectaculaires de l'administration d'U-II ont suscité énormément d'intérêt pour le système U-II/UT. Cependant, il a été rapidement démontré que l'U-II avait des effets très variables sur le système cardiovasculaire, non seulement d'une espèce à l'autre mais aussi entre individus d'une même espèce, d'un tissu à l'autre d'une même espèce, et paradoxalement sur un même tissu (DOUGLAS *et al*, 2000). Par exemple, bien que l'U-II produise une vasoconstriction bien décrite sur l'aorte de rat, cet effet se manifeste sur l'aorte proximale mais disparaît dans une région plus distale de cette même aorte (DOUGLAS *et al*, 2000). Par contre, les aortes de souris ne répondent pas à l'U-II (DOUGLAS *et al*, 2000). D'autres études montrent que l'injection d'U-II cause plutôt une vasodilatation sur des vaisseaux dont



l'endothélium est intact, au lieu d'une vasoconstriction (HILLIER *et al*, 2001; STIRRAT *et al*, 2001). Dans d'autres cas, la dénudation des vaisseaux de cellules endothéliales ainsi que l'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) permettent de recouvrer un effet contractile (MACLEAN *et al*, 2000; MAGUIRE *et al*, 2000). Il est tentant de spéculer que l'U-II est un médiateur physiologique important du tonus vasculaire et de la pression artérielle chez l'humain, mais son effet exact reste difficile à interpréter pour l'instant.

#### **2.3.1.2. Rôle dans le système rénal**

Le récepteur UT et l'U-II sont présents dans le rein. Le rein est une source majeure d'U-II plasmatique et urinaire chez les mammifères. La présence d'U-II dans le tubule distal rénal suggère que cette hormone pourrait jouer un rôle au niveau de la régulation du taux de filtration glomérulaire par un mécanisme de feedback tubuloglomérulaire, de façon paracrine ou endocrine (ASHTON, 2006). L'infusion d'U-II dans l'artère rénale de rat anesthésié cause des augmentations de flux sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire (SHENOUDA *et al*, 2002). Cet effet peut être bloqué par l'inhibition de la NOS (ZHANG *et al*, 2003). Le rôle précis de l'U-II dans la régulation du système rénal reste cependant à découvrir.

#### **2.3.1.3. Rôle comme chémoattractant**

Il a été montré que les cellules inflammatoires expriment à la fois l'U-II et le récepteur UT dans les lésions athérosclérotiques (BOUSETTE *et al*, 2004), ce qui

suggère un rôle pour U-II dans le système immunitaire. Le récepteur UT est exprimé chez les monocytes et il a été montré que l'U-II agit comme un facteur chémoattractif chez ces cellules (SEGAIN *et al*, 2007). Un rôle précis de l'U-II dans le système immunitaire reste à être précisé.

### **2.3.2. Actions centrales**

L'U-II et son récepteur sont retrouvés dans les neurones moteurs, la moelle épinière et le cerveau, ce qui suggère un rôle potentiel de l'U-II dans le système nerveux central. L'administration intracérébroventriculaire (ICV) d'U-II provoque une réponse pressive et mène à une tachycardie via l'activation du système nerveux sympathique (LIN *et al*, 2003a; LIN *et al*, 2003b). Chez la brebis consciente, l'administration ICV d'U-II provoque la sécrétion d'ACTH et d'adrénaline via la stimulation de l'axe médullaire hypothalamo-hypophysaire, ce qui s'accompagne d'effets chronotropes et inotropes positifs sur le cœur, d'une hausse de pression artérielle, d'une vasodilatation périphérique et d'une hyperglycémie (WATSON *et al*, 2003). Ces résultats semblent donc suggérer que l'U-II pourrait être impliquée dans les mécanismes de réponse aux stimuli d'alerte ou de stress. Chez le rat, l'injection d'U-II dans le noyau pédonculopontin tegmental (PPT), une région du cerveau impliquée dans le contrôle du sommeil paradoxal chez les mammifères, augmente l'activité des neurones cholinergiques qui altèrent les périodes de sommeil paradoxal, ce qui indique un rôle de l'U-II dans la régulation du cycle d'éveil/sommeil (HUITRON-RESENDIZ *et al*, 2005).

#### **2.4. Rôle pathophysiologique du système U-II/UT**

Chez des patients souffrant de maladies tels l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, l'hypertension systémique, l'hypertension pulmonaire et l'hypertension causée par la cirrhose du foie, l'insuffisance rénale et le diabète, les niveaux circulants d'U-II sont plus élevés que chez les individus sains (ONG *et al*, 2005). Ces observations portent à croire que l'U-II est impliquée dans ces maladies. Cependant, il reste à clarifier que l'élévation d'U-II est une cause ou une conséquence du développement de ces maladies.

#### **2.5. Analogues synthétiques de l'U-II**

Depuis l'identification du système U-II/UT et son implication potentielle dans plusieurs conditions pathophysiologiques, de nombreux laboratoires ont cherché à identifier des analogues synthétiques de l'U-II (DOUGLAS *et al*, 2004). Ce sont surtout les antagonistes du récepteur UT qui suscitent le plus d'intérêt, puisqu'ils permettent de mieux caractériser le système U-II/UT et de démasquer les rôles endogènes de l'U-II. Les études de structure-activité menées sur l'U-II ont fourni des indications sur les modifications à apporter pour obtenir une activité antagoniste. Ces études ont entre autres indiqué que des modifications au niveau de la position 8 du peptide ainsi qu'au niveau du pont disulfure en C-terminal pouvaient mener à des peptides avec une activité antagoniste. Ces informations ont permis la découverte d'agonistes partiels du récepteur UT tels le [Orn<sup>8</sup>]U-II et le [Pen<sup>5</sup>]U-II (CAMARDA *et al*, 2002; GRIECO *et al*, 2002). La combinaison de ces modifications a permis la découverte de l'urantide ([Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]U-II(4-11)), un des premiers

antagonistes spécifiques du récepteur UT (PATAACCHINI *et al*, 2003). Cet analogue peptidique bloque complètement la contraction de l'aorte de rat induite par l'U-II. Par contre, dans des systèmes d'expression hétérologues, cet analogue conserve une faible activité agoniste résiduelle (CAMARDA *et al*, 2004). Pour ce qui est des analogues non-peptidiques, Douglas et collaborateurs ont découvert le SB-706375, qui est un antagoniste spécifique du récepteur UT (DOUGLAS *et al*, 2005).

### **3. Méthodes employées pour l'identification des déterminants de liaison du récepteur UT**

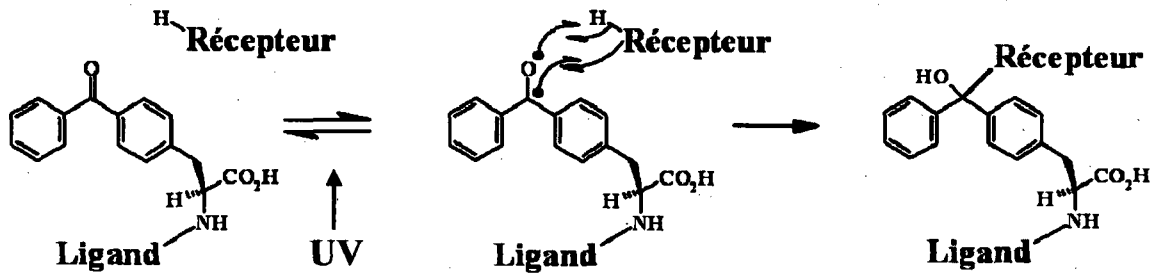
#### **3.1. Marquage par photoaffinité**

Le marquage par photoaffinité est une technique puissante qui a l'avantage de permettre l'identification directe d'une interaction entre un ligand et son récepteur. Le principe est relativement simple. L'activation d'un groupement chimique par la lumière (ayant une longueur d'onde précise) génère une espèce hautement réactive. Cet intermédiaire réagit avec une cible à proximité pour former un lien covalent irréversible et stable. On peut donc exploiter la technique pour obtenir de l'information sur ce qui se trouve dans l'environnement de l'entité photoréactive, par exemple pour caractériser la liaison entre un ligand et son récepteur. Le marquage par photoaffinité se prête particulièrement bien aux études impliquant des ligands peptidiques. Grâce à la synthèse peptidique, des analogues photosensibles peuvent être générés en insérant un acide aminé photoactivable à n'importe laquelle des

positions du peptide. Suite à la liaison entre un peptide photoactivable et son récepteur, le complexe est irradié à une longueur d'onde adéquate et le peptide forme un lien covalent avec le récepteur. Si le peptide photoactivable est aussi radioactif, on peut alors cartographier à l'aide de digestions chimiques et protéolytiques spécifiques le site d'interaction entre le ligand et récepteur. La synthèse peptidique permet de placer l'acide aminé photoactivable à n'importe quelle position dans le peptide, pour autant qu'une affinité suffisante s'exerce entre le ligand modifié et le récepteur, d'où la puissance de cette approche pour cartographier les interactions ligand-récepteur.

### **3.1.1. Utilisation du p-benzoyl-L-phenylalanine**

Le para-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) (KAUER et al, 1986) est sans contredit le résidu photosensible le plus efficace dans les études de marquage par photoaffinité (Figure 9). Le groupement benzophénone comporte des avantages importants sur les groupements photosensibles carbènes et nitrènes anciennement utilisés, tels sa disponibilité commerciale, sa stabilité et le fait qu'il ne possède pas de réactivité envers les groupements fonctionnels. De plus, de par sa nature chimique, le Bpa a la capacité de subir plusieurs cycles d'activation/inactivation après l'irradiation, et peut donc s'insérer dans sa cible avec un très haut rendement. Compte tenu de sa taille relativement faible et de son caractère aromatique l'introduction du Bpa dans un peptide est souvent bien tolérée. Par contre, le Bpa a aussi certains désavantages dont sa cinétique relativement lente. Une autre propriété intéressante du Bpa est sa



**Figure 9. La méthode de marquage par photoaffinité.**

Un ligand peptidique contenant le résidu para-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) forme un complexe de liaison stable avec le récepteur. L'activation du Bpa génère une espèce hautement réactive, qui forme un lien covalent irréversible et stable avec un domaine précis du récepteur

réactivité préférentielle pour les méthionines. Bien que cela puisse sembler à première vue un désavantage, cette propriété a été mise à profit dans une nouvelle approche nommée Methionine Proximity Assay (MPA) (CLEMENT *et al*, 2005; RIHAKOVA *et al*, 2002). Dans cette approche, une méthionine est introduite par mutagenèse dirigée à une position déterminée dans un GPCR d'intérêt et cette méthionine sert en quelque sorte d'appât pour le ligand photoactivable contenant le Bpa. Si la méthionine a été introduite à une position faisant partie de la pochette de liaison, elle réagira avec le ligand photoactivable, formant un complexe caractéristique facilement détectable par électrophorèse SDS-PAGE. L'approche MPA permet donc d'identifier les résidus faisant partie de la pochette de liaison d'un GPCR peptidique (CLEMENT *et al*, 2005).

Jusqu'à maintenant, le site de liaison de plusieurs GPCRs peptidiques a été caractérisé en utilisant des ligands contenant le Bpa. Entre autres, le récepteur V1a de la vasopressine (PHALIPOU *et al*, 1997), le récepteur de la PTH (PELLEGRINI *et al*, 1998), le récepteur NK1 de la neurokinine (ULFERS *et al*, 2002), le récepteur VPAC1 du VIP (COUVINEAU *et al*, 2006) et le récepteur CCK de la cholecystokinine (DONG *et al*, 2005b) ont été caractérisés avec cette approche. Également notre groupe de recherche a utilisé l'approche pour caractériser les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> de l'angiotensine II (BOUCARD *et al*, 2000; LAPORTE *et al*, 1999; PERODIN *et al*, 2002).

## 3.2. Substituted cysteine accessibility method (SCAM)

### 3.2.1. Principe du SCAM

L'acide aminé cystéine, de par la présence du soufre dans sa chaîne latérale, est souvent utilisée pour étudier les relations entre la structure et la fonction d'une protéine. En effet, une cystéine peut former un lien disulfure avec toute autre molécule possédant un groupement thiol libre. Cette propriété peut être exploitée pour modifier des cibles de façon covalente, ce qui a mené au développement d'agents de réticulation capables de réagir spécifiquement avec les cystéines. La cystéine est appropriée pour substituer un résidu natif dans une protéine puisque sa taille intermédiaire et sa faible propension à former des structures secondaires ne change pas la conformation globale de la protéine. Ainsi, Roberts et collaborateurs ont développé des composés de type méthaneithiosulfonates (MTS), dont la chimie hautement sélective au groupement thiol permet de modifier de façon covalente les cystéines (ROBERTS *et al*, 1986). Ces composés MTS peuvent être synthétisés de telle façon à contenir des modifications qui leur confèrent des propriétés désirées. Ainsi, on peut retrouver des réactifs MTS contenant un groupe éthylammonium chargé positivement (MTSEA) ou éthylsulfonate chargé négativement (MTSES). Ces composés peuvent alors être utilisés pour modifier des cibles contenant des cystéines pour y introduire une charge, ainsi qu'un certain encombrement stérique. Les composés MTS, qui sont chargés, possèdent la caractéristique intéressante de réagir  $10^9$  fois plus rapidement avec les cystéines présentes dans un milieu hydrophile que celles présentes dans un milieu hydrophobe. Il est possible de détecter une altération



des propriétés fonctionnelles d'une protéine donnée suite au traitement par un réactif MTS, si la cystéine ciblée est un déterminant important pour la fonctionnalité. L'approche SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method) consiste à coupler la substitution de résidus cystéines par mutagenèse dirigée dans une cible protéique à la modification covalente par des réactifs MTS. Dans un premier temps, le SCAM a été utilisé de façon ingénieuse pour caractériser les canaux ioniques (AKABAS *et al*, 1992). Les résidus qui constituent le pore du canal forment une pochette hydrophile par lequel passent les ions, leur modification par les composés MTS bloque l'accès aux ions, touchant ainsi à la fonctionnalité du canal. Un résidu cystéine peut se situer dans une cavité aqueuse et être modifié par un réactif MTS, cependant, pour être détectée, cette modification doit se répercuter sur les propriétés fonctionnelles de la protéine. En absence de modification des propriétés fonctionnelles, il y a deux explications possibles : soit la cystéine introduite n'a pas pu réagir avec le réactif MTS, soit la modification de la cystéine ne cause pas un changement détectable de la fonctionnalité de la protéine.

### **3.2.2. Utilisation du SCAM pour sonder la pochette de liaison des GPCRs**

La méthodologie du SCAM peut être utilisée pour caractériser la pochette de liaison des GPCRs de la classe A (JAVITCH *et al*, 2002) (Figure 10). Les GPCRs possèdent une cavité hydrophile au centre de la protéine, délimitée par les TMDs.



C'est à l'intérieur de cette pochette que se situe le site de liaison des ligands. Le groupe de Javitch a été le premier à utiliser l'approche SCAM pour caractériser la pochette de liaison d'un GPCR. En prenant comme modèle le récepteur D2 de la dopamine, ils ont systématiquement évalué la contribution de chaque domaine transmembranaire du récepteur pour la formation de la pochette de liaison (SHI et JAVITCH, 2002). Chaque résidu de chacun des domaines transmembranaires fut systématiquement muté un à la fois pour une cystéine et tous ces mutants ont été traités avec des réactifs MTSEA. L'altération des propriétés de liaison d'un mutant suite au traitement MTSEA servait de critère pour suggérer que la chaîne latérale de la cystéine était orientée vers la pochette de liaison. Le traitement par le MTS retarderait la liaison du récepteur par des mécanismes impliquant soit l'encombrement stérique, la répulsion électrostatique ou encore une interaction indirecte avec le récepteur. Les expériences de protection constituent un deuxième critère pour confirmer que la cystéine sensible au traitement MTSEA se trouve véritablement dans la pochette de liaison du récepteur. L'expérience de protection est basée sur l'hypothèse que la présence du ligand dans la pochette de liaison devrait ralentir la réaction d'alkylation par le MTS. L'utilisation du SCAM assume que les réactifs MTS réagissent uniquement avec des cystéines accessibles au milieu aqueux, que seuls les résidus qui tapissent le site de liaison font face au milieu aqueux et que l'alkylation de ces cystéines libres peut mener à des propriétés de liaison altérées. Depuis quelques années, notre groupe de recherche a entrepris la caractérisation de la pochette de liaison du récepteur AT<sub>1</sub> avec l'approche SCAM (BOUCARD *et al*, 2003a; MARTIN *et al*, 2004; MARTIN *et al*, 2007). L'approche SCAM a aussi été

appliquée à l'étude d'autres GPCRs tels les récepteurs aux opioïdes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  (XU *et al*, 2005; XU *et al*, 2001), le récepteur cannabinoïde CB<sub>2</sub> (ZHANG *et al*, 2005b) et le récepteur A<sub>1</sub> de l'adénosine (DAWSON et WELLS, 2001).

#### **4. Raisonnement théorique et objectif de l'étude**

Les GPCRs de la classe A sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques et représentent donc des cibles importantes pour le traitement de nombreuses maladies. Le mécanisme moléculaire impliqué dans la liaison des ligands avec les GPCRs est encore peu connu, surtout en ce qui concerne les récepteurs peptidergiques. Une meilleure compréhension des mécanismes par lequel un ligand peut reconnaître et lier son récepteur serait utile pour développer des ligands plus puissants, plus sélectifs et avec des propriétés pharmacologiques adéquates pour produire les réponses biologiques souhaitées. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'interaction de l'U-II avec son récepteur UT, nous avons utilisé deux méthodes puissantes, le marquage par photoaffinité et l'approche SCAM.

Hypothèse principale : Les hormones peptidiques interagissent avec des domaines précis et identifiables des GPCRs.

Objectif principal : Identifier les déterminants moléculaires qui contribuent à la formation de la pochette de liaison du récepteur UT

Objectif 1 : Identification de nouveaux sites de contact du récepteur UT avec un agoniste (U-II) et un agoniste partiel (urantide).

Le premier article présenté dans cette thèse décrit une caractérisation du site d'interaction du récepteur UT avec des ligands photosensibles possédant des activités intrinsèques différentes. D'une part, nous avons comparé les patrons de

photomarquage obtenus avec 4 analogues photoactivables (contenant le résidu Bpa) de l'U-II ayant des propriétés agonistes et aussi avec 2 analogues photoactivables ayant des propriétés d'agonistes partiels. D'autre part, nous avons comparé les patrons de photomarquage obtenus avec un analogue de l'U-II contenant le Bpa dans la partie cyclique de l'agoniste partiel (position 6) et avec un analogue de l'U-II contenant le Bpa à la position 6 de l'agoniste complet. Les résultats ont été publiés dans *Biochemical Journal* (HOLLERAN *et al*, 2007).

Objectif 2 : Identification, avec l'approche SCAM, des résidus du TMD6 et du TMD7 qui forment la pochette de liaison du récepteur UT.

Dans le deuxième article présenté dans cette thèse, le SCAM est utilisé pour identifier les résidus des domaines transmembranaires 6 et 7 qui forment la pochette de liaison hydrophile du récepteur UT. Les résultats ont été publiés dans *Biochemical Pharmacology* (HOLLERAN *et al*, 2009).

Objectif 3 : Proposition d'un modèle moléculaire du récepteur UT en complexe avec son ligand.

L'ensemble de mes travaux permettent de proposer un modèle moléculaire du complexe U-II/UT. Ce modèle sera utile pour générer de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans la liaison de l'UII à son récepteur et possiblement, de façon plus générale, quant à la liaison de toutes les hormones peptidiques à leurs récepteurs respectifs. L'objectif ultime de cette recherche est de développer de nouveaux ligands ayant des propriétés de signalisation désirées.

## RÉSULTATS

### Avant propos de l'article 1

#### Article 1

***Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites.***

Holleran, B.J., Beaulieu, M.E., Proulx, C.D., Lavigne, P., Escher, E. & Leduc, R.

Biochem. J. **402**: 51-61 (2007)

Statut: **Publié**

**Référence:** Holleran, B.J., Beaulieu, M.E., Proulx, C.D., Lavigne, P., Escher, E. & Leduc, R. (2007). Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochemical Journal*. **402**(1): 51-61

**Apport:** J'ai dirigé cette étude et produit toutes les manipulations de ce manuscrit à l'exception de la figure 6. J'ai rédigé la première version de ce manuscrit.

## Résumé de l'article 1

Le mécanisme par lequel un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) est activé implique des changements conformationnels suite à la liaison. Nous avons utilisé le marquage par photoaffinité pour identifier des domaines à l'intérieur des GPCRs qui font un contact avec divers ligands photosensibles dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'activation des GPCRs. Dans cette étude, une série de quatre analogues photosensibles de l'urotensine II (U-II) agonistes ([Bpa<sup>1</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>]U-II, [Bpa<sup>3</sup>]U-II et [Bpa<sup>4</sup>]U-II) ou agonistes partiels ([Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II et [Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II) ont été utilisés afin d'identifier des sites de liaison du récepteur de l'urotensine II (UT). Tous les peptides lient le récepteur UT de rat exprimé dans les cellules COS-7 avec une haute affinité. Le résidu Met288 de la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire a été identifié comme site de liaison pour les quatre peptides agonistes, ainsi que pour les agonistes partiels qui contiennent le Bpa dans les 2 premières positions. Nous avons trouvé que l'agoniste partiel contenant le Bpa dans la 6<sup>e</sup> position identifie le TMD5 comme point de contact. Ce résultat est différent de celui obtenu précédemment pour le peptide agoniste [Bpa<sup>6</sup>]U-II, qui identifie les résidus M184/M185 du TMD4. Ces résultats nous permettent de mieux cartographier la pochette de liaison du récepteur UT. De plus, nos données suggèrent que des agonistes complet et partiels peuvent induire des états d'activation différents du récepteur, qui se reflète par des changements conformationnels du récepteur à proximité de la partie cyclique des analogues U-II



## Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist and partial agonist binding sites

Brian J. Holleran, Marie-Eve Beaulieu, Christophe D. Proulx, Pierre Lavigne,

Emanuel Escher\* and Richard Leduc\*#

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

Running title: Agonist and partial agonist binding modes of the urotensin II receptor

Key words: G protein-coupled receptor, urotensin II, urantide, ligand binding, photolabelling

#To whom correspondence should be addressed: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001 12th Ave. N., Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4, Canada.

Abbreviations: U-II, urotensin II; rUT, rat urotensin II receptor; Bpa, p-benzoyl-L-phenylalanine; GPCR, G-protein coupled receptor; TM, transmembrane domain; RMSD, root mean square deviation; Pen, penicillamine.

\* These two authors contributed equally to the manuscript

## SUMMARY

The mechanism by which G protein coupled receptors (GPCRs) undergo activation is believed to involve conformational changes following agonist binding. We have used photoaffinity labelling to identify domains within GPCRs that make contact with various photoreactive ligands in order to better understand the activation mechanism. Here, a series of four agonist ([Bpa<sup>1</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>]U-II, [Bpa<sup>3</sup>]U-II and [Bpa<sup>4</sup>]U-II) and three partial agonist ([Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II and [Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II) photoreactive urotensin II (U-II) analogues were used to identify ligand binding sites on the urotensin II receptor (UT). All peptides bound the UT receptor expressed in COS-7 cells with high affinity (K<sub>d</sub> of 0.3 to 17.7 nM). Proteolytic mapping and mutational analysis led to the identification of Met<sup>288</sup> of the third extracellular loop of UT as a binding site for all four agonist peptides. Both partial agonists containing the photoreactive group in positions 1 and 2 also cross-linked to Met<sup>288</sup>. We found that photolabeling with the partial agonist containing the photoreactive group in position 6 led to the detection of transmembrane five as a binding site for that ligand. Interestingly, this differs from Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> of the fourth transmembrane domain that had previously been identified as a contact site for the full agonist [Bpa<sup>6</sup>]U-II. These results enable us to better map UT's binding pocket. Moreover, the data also suggest that while structurally-related agonists or partial agonists may dock in the same general binding pocket, conformational changes induced by various states of activation may result in slight differences in spatial proximity within the cyclic portion of U-II analogues.

## INTRODUCTION

Urotensin II (Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val, U-II) is a cyclic undecapeptide with activity on the cardiovascular and nervous system [1]. U-II was originally isolated from the urophysis of teleost fish [2] but the cDNA encoding its precursor has now been identified in many species [3, 4]. In situ hybridization and immunohistochemistry have revealed that the peptide is localized to the medulla oblongata of the brain and the spinal cord in the central nervous system, but it is also present in such tissues as adrenal glands, kidney and spleen, suggesting neurohormonal or hormonal properties [3, 5]. Although it is clear that U-II influences the physiological regulation of mammalian cardiovascular function, early reports showed conflicting results with regards to the peptide's vasoactive responses which depended on the species or tissues used [1], whilst other studies described that administration of human U-II leads to potent vasodilator and cardiostimulant responses in human tissues [6, 7]. Recently, a second peptide possessing structural similarity to U-II while having a markedly different expression pattern has been identified and termed U-II related peptide (URP) [8].

U-II is the endogenous ligand of the UT receptor, a member of family A or rhodopsin-like family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) [9]. Many features associated with this family such as a short N-terminus, a highly conserved residue in each transmembrane, presence of the D/ERY motif in the second intracellular loop, the NPxxY motif within the seventh transmembrane as well as potential serine/threonine phosphorylation sites in the cytoplasmic tail are found in UT [10]. The UT receptor is detected in the central nervous system and is widely expressed in

human tissues, including the left atrium and ventricle of the heart, smooth muscle cells of the coronary artery and aorta, as well as endothelial cells from several vascular beds [9]. Compelling evidence has implicated the U-II/UT system in the pathophysiology of hypertension, heart failure, and cardiac fibrosis and hypertrophy [1, 11].

Elucidation of the molecular mechanisms by which an agonist binds to and activates a GPCR needs to be addressed using a variety of biophysical and biochemical approaches. We have sought to probe into the interactions of U-II with UT by covalently linking U-II to its receptor with a series of photoreactive analogues containing the photoactivatable amino acid p-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa). Bpa-based photoaffinity labelling [12] has been successfully employed to identify binding sites in several peptide receptors [13-15]. Here this approach was employed in order to identify contact points using two series of analogous probes that either fully or weakly activate the UT receptor. We hypothesized that photoaffinity labelling with photoprobes having different intrinsic activities may yield different contact points. Such differences may reflect the distinct ensembles of conformations that can be stabilized by both ligands [16]. We report the specific interaction of the first four positions of the full agonist, U-II, within the 3rd extracellular loop of the receptor, more specifically at residue Met<sup>288</sup>. The first two positions of a partial U-II agonist also interact with this amino acid. However, position 6 of the partial agonist photoprobe does not appear to interact with the same binding site compared with its analogous full agonist probe [17]. This study, coupled with our previous work, has

allowed us to propose a model which defines for the first time the orientation of U-II within the rat UT receptor binding pocket.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Materials**

Bovine serum albumin (BSA), bacitracin, soybean trypsin inhibitor and cyanogen bromide (CNBr) were from Sigma. Staphylococcal V8 protease (EC 3.4.21.19), endoproteinase Arg-C (Endo Arg-C; EC 3.4.22.8), endoproteinase Lys-C (Endo Lys-C; EC 3.4.21.50), FUGENE<sup>®</sup>-6 and protease cocktail inhibitor were from Roche (Mannheim, Germany). The cDNA clone of the rat urotensin II receptor (rUT) subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3.0 was kindly provided by Dr Brian O'Dowd (Department of Pharmacology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada). DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media), FBS (Fetal bovine serum) penicillin/streptomycin and oligonucleotide primers were obtained from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, U.S.A). Human U-II was from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA). Bpa-containing U-II peptide analogues were synthesized in our laboratories using Fmoc (fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-protected amino acids and Wang resin (a p-benzyloxybenzyl alcohol resin from Novabiochem, Laufelfingen, Switzerland). Cysteine residues were protected by acetamidomethyl groups, which were removed by using mercury acetate. Disulphide-bond formation was achieved by oxidation with DMSO. The synthetic peptides were purified to homogeneity by reverse-phase HPLC. <sup>125</sup>I-U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>1</sup>]U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>2</sup>]U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>3</sup>]U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>4</sup>]U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-

Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II and <sup>125</sup>I-[Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II (specific activity 400 Ci/mmol) were prepared with IODO-GEN<sup>®</sup> (1,3,4,6-Tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycouril; Pierce Chemical Co.) as described by Fraker and Speck [18]. Briefly, 10 µl of a 1 mM peptide solution was incubated with 20 µg of IODO-GEN<sup>®</sup>, 80 µl of 100 mM borate buffer, pH 8.5, and 1mCi of Na<sup>125</sup>I for 30 min at room temperature before being purified by HPLC on a C-18 column. The specific radioactivity of the labelled peptides was determined by self-displacement and saturation-binding analysis.

### **PCR mutagenesis**

Mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics) using rUT inserted into pcDNA3.0 (Invitrogen Inc.) as a template. A set of forward and reverse oligonucleotides were constructed in order to introduce a Met→Leu mutation at position 288 of rUT to generate M288L-rUT. PCR products were re-inserted in pcDNA3.0 and mutagenesis was confirmed by nucleotide sequencing.

### **Cell culture and transfection**

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10 % (v/v) fetal-bovine serum, 100 i.u./ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using FUGENE<sup>®</sup>-6 as described by the manufacturer. Transfected cells were grown for 48 h before photoaffinity labelling and binding assays.

### **Binding Experiments**

COS-7 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were then gently scraped into washing buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>], centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C, and resuspended in binding buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % BSA, 0.01 % bacitracin]. For competition binding assays, broken cells (50-75 µg of protein) were incubated for 1 h at room temperature in binding buffer with 0.1 nM <sup>125</sup>I-U-II (400 Ci/mmol) as tracer and increasing concentrations of U-II peptide analogues in a final volume of 0.5 ml. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through GF/C filters pre-soaked for at least 1h in binding buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ-radiation counting.

### **Measurement of agonist-induced production of inositol phosphates**

Accumulation of inositol phosphates was determined essentially as described [19], with the following modification. Production of inositol phosphates was induced with 100 nM U-II or each analogue for 10 min at 37°C in buffer containing 10 mM LiCl. Inositol phosphates were sequentially eluted from the anion-exchange column by the addition of an ammonium formate/formic acid solution of increasing ionic strength. Fractions containing inositol phosphates were collected and counted for radioactivity in a liquid-scintillation counter.

### **Photoaffinity labelling**

Photoaffinity labelling was performed as previously described [13]. Transfected COS-7 cells were incubated for 1 h at room temperature in 0.5 ml of binding buffer containing the photoreactive radioligand (5 nM), in the presence (10  $\mu$ M) or absence of U-II. Cells were then washed, irradiated for 1 h at 0°C under filtered UV light in washing buffer and centrifuged. The pellet was solubilized on ice for 30 min in modified radioimmunoprecipitation buffer [m-RIPA; 50 mM Tris-Hcl (pH 8.5), 150 mM NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.25% (v/v) Deoxycholic Acid, 0.1% (w/v) SDS] containing Complete Protease Inhibitor Cocktail<sup>®</sup> (Roche Diagnostics). After centrifugation (15000 x g for 30 min at 4°C), the supernatants were kept at -80°C until further analysis.

#### **Partial Purification of the labelled complex**

Photolabelled receptors were separated by SDS/PAGE before being exposed to BioMax<sup>®</sup> MS films (Kodak). Bands corresponding to receptor-ligand complexes were cut from the gels and submitted to electroelution. Eluted proteins were then concentrated and kept at -20°C.

#### **Proteolytic and chemical digestion**

For Endo Glu-C (V8 protease) digestions, partially purified photolabelled receptors (5000 c.p.m.) were resuspended in 50  $\mu$ l of digestion buffer [100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0)] at room temperature for the indicated times. Under these conditions V8 protease cleaves at the C-terminal side of glutamate residues. When subsequent digestions were needed, products of the first digestion were run on a



16.5% (w/v) acrylamide/Tris/Tricine gel and the corresponding band was electroeluted. Eluted proteins were concentrated and submitted to subsequent digestion. For Endo Arg-C digestion, partially purified photolabelled receptors (5000 c.p.m.) were resuspended in 100  $\mu$ l of digestion buffer [100 mM Tris/HCl, pH 7.6, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA and 0.01 % SDS] and sample were incubated with Arg-C (0.5  $\mu$ g) for 16 h at 37°C. For Endo Lys-C digestion, partially purified photolabelled receptors (5000 c.p.m.) were resuspended in 50  $\mu$ l of digestion buffer [25 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA and 0.1% SDS] and samples were incubated with Lys-C (0.5  $\mu$ g) for 16 h at 25°C. For CNBr hydrolysis, partially purified photolabelled receptors (5000 c.p.m.) were resuspended in a 1:1 mixture of 10 % trifluoroacetic acid and CNBr (100 mg/ml) and incubated at room temperature, in the dark for 18 h. Reactions were terminated by adding 0.6 mL of water and the material was freeze-dried.

### **Analysis of the products of proteolysis and chemical cleavage**

The products of proteolysis and chemical cleavage were analysed by SDS-PAGE using 16.5 % (w/v) acrylamide/Tris/Tricine gels, followed by autoradiography on X-ray films (Kodak BioMax<sup>®</sup> MS) with intensifying screens. <sup>14</sup>C-Labelled low-molecular-mass protein standards (Amersham Biosciences) were used to determine apparent molecular masses.

### **Molecular modeling**

All calculations were performed on a Silicon Graphics Octane<sup>2</sup> workstation (Silicon Graphics Ins. Mountain View, CA.). The U-II derived ligands and the rUT receptor model were built using Insight II modules (Biopolymer, Homology, Discover; Accelrys, San Diego, CA, USA). The molecular models of the agonist (U-II, [Bpa<sup>1</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>]U-II, [Bpa<sup>3</sup>]U-II, [Bpa<sup>4</sup>]U-II and [Bpa<sup>6</sup>]U-II) and the partial agonist peptides ([Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II, [Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II and [Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II) were constructed in a linear form using the Biopolymer module from InsightII. Subsequently, a disulphide bond was added between residues in position 5 and 10 of each ligand. The potential energy of each peptide was minimized for 500 steps with steepest descents with a consistent valence force field [20] using the Discover module. All the minimized structures adopted the overall conformation previously reported for U-II [21]. A distance-dependent dielectric constant of 4 was used.

The theoretical structure of rUT (GenBank™ accession no. P49684) was generated by homology modeling based on the crystal structure of bovine rhodopsin (Protein Data Bank: 1L9H-A, [22] as described previously [23]. The resulting structure represents an inactive form of rUT with an overall configuration very similar to that of bovine rhodopsin (2.35 Å RMSD between the backbone atoms of the transmembrane domains).

In order to allow the incorporation of the ligand within the receptor's orthosteric cleft, a cavity had to be generated. This was accomplished by rotation of the  $\phi$  angle of Thr<sup>40</sup> from -95.69 to -23.89 (displaces the N-terminal segment outwards from the helix bundle) followed by rotation of the  $\phi$  angle of Lys<sup>247</sup> from -

133.86 to -126.66 in order to displace TM6 & TM7. Rearrangement of TM6 and TM7 following receptor activation is supported by experimental evidence [24-26]. The bonds between S-S from Cys<sup>123</sup>-Cys<sup>199</sup>, C-N from Leu<sup>186</sup>-Ala<sup>187</sup> and C-N from Ala<sup>202</sup>-Trp<sup>203</sup> were then broken, and the  $\phi$  angle of Cys<sup>199</sup> was rotated from -86.83 to 136.93, the  $\phi$  angle of Ser<sup>197</sup> from 49.67 to 92.07, the  $\psi$  angle of Lys<sup>196</sup> from -125.35 to -146.06 and the  $\psi$  angle of Arg<sup>193</sup> from -25.76 to -49.76. The broken bonds were then reformed and a potential energy minimisation was performed with transmembrane domains fixed until maximum derivative was less than 0.1. The resulting structure gives a RMSD value of 0.36 Å for TMs 1-5 backbone atoms compared with the initial model and a RMSD value of 1.96 Å for all TM backbone atoms.

The U-II modeled structure was placed in between the transmembrane domains of rUT as suggested by photolabelling results obtained with the agonist ligands. Information about ligand-receptor interactions obtained in previous photoaffinity labelling and mutagenesis experiments [17, 27] was considered along with the contact sites reported here, and used as distance restraints for the energy minimization of the U-II/rUT complex. A first minimization of the complex between U-II and rUT was performed using distance restraints ( $2 \text{ \AA} < d < 7 \text{ \AA}$ ) between the S $\delta$  atoms of photolabelled Met residues and the C $\gamma$  atom of the corresponding side chains on U-II. Explicitly, residue Glu<sup>1</sup> was kept close to residue Met<sup>288</sup>, residue Phe<sup>6</sup> was restrained to residues Met<sup>184</sup> and Met<sup>185</sup> [17], whereas Lys<sup>8</sup> was restrained to Asp<sup>130</sup> [27]. The backbone atoms of rUT transmembrane domains were held in their position during this step; the ligand, extracellular and intracellular loops were free to move and interact. The U-II/rUT complex was refined by several energy minimization

steps, until the maximum derivative was less than 0.1 kcal/mol. Molecular graphics figures were done with Pymol [28].

## RESULTS

**Binding specificity of photoreactive analogues** – Figure 1(A) shows the primary structure of U-II and the photoreactive U-II analogues used in this study. For the agonist peptides, Glu<sup>1</sup>, Thr<sup>2</sup>, Pro<sup>3</sup> and Asp<sup>4</sup> were successively replaced by Bpa to give [Bpa<sup>1</sup>]U-II (**1**), [Bpa<sup>2</sup>]U-II (**2**), [Bpa<sup>3</sup>]U-II (**3**) and [Bpa<sup>4</sup>]U-II (**4**) respectively. We also synthesized peptides based on the structure of urantide. Although urantide was originally described as an antagonist [29], recent reports have demonstrated that this peptide acts as a weak partial agonist in various cells heterologously expressing the UT receptor [30]. Residues 1, 2 and 6 were successively replaced with Bpa in a “humanized” version of the urantide peptide [Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II (**5**) to give [Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II (**6**), [Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II (**7**) and [Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II (**8**). All peptides also contain a tyrosine residue, present in the native peptide at position 9, for radioiodination.

In competitive binding assays, all analogues exhibited high affinities for UT expressed in COS-7 cells (Table 1) with the exception of **8**, which showed a slightly reduced affinity (17.7 nM). The functional properties of these analogues were then assessed by measuring the ligand-induced Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> production in COS-7 cells expressing rUT (Table 1). Incubation of the cells with either **1**, **2**, **3** or **4** caused an increase in Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> comparable with the level produced by native U-II, suggesting the full agonist nature of these analogues. All four peptides based on



**Figure 1. (A) Amino acid sequence of human urotensin II and urantide-based photoreactive analogues and (B) Two-dimensional representation of the primary structure of the rat UT receptor.**

(A) Sequences of urotensin II and synthetic photoprobes. The photoreactive para-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) residue is indicated in bold and Tyr9 is the radioiodine incorporation site. (B) Black closed circles indicate sites of hydrolysis for CNBr. Bold circles indicate recognition sites for V8 protease. Light gray closed circles indicate recognition sites for Endo Arg-C. Dark gray closed circles indicate recognition sites for Endo Lys-C. Putative sites of N-glycosylation on Asn29 and Asn33 are also indicated.

		<b>K<sub>i</sub> (nM)</b>	<b>% of 100 nM U-II response</b>
	<b>U-II</b>	<b>2.8</b>	<b>100</b>
<b>1</b>	<b>[Bpa<sup>1</sup>]-U-II</b>	<b>2.3</b>	<b>132</b>
<b>2</b>	<b>[Bpa<sup>2</sup>]-U-II</b>	<b>2.5</b>	<b>101</b>
<b>3</b>	<b>[Bpa<sup>3</sup>]-U-II</b>	<b>2.6</b>	<b>94</b>
<b>4</b>	<b>[Bpa<sup>4</sup>]-U-II</b>	<b>3.6</b>	<b>114</b>
<b>5</b>	<b>[Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]-U-II</b>	<b>4.7</b>	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>[Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]-U-II</b>	<b>0.8</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	<b>[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]-U-II</b>	<b>0.3</b>	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>[Pen<sup>5</sup> Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]-U-II</b>	<b>17.7</b>	<b>12</b>

**Table 1. Pharmacological characterization of photolabile urotensin II derivatives.**

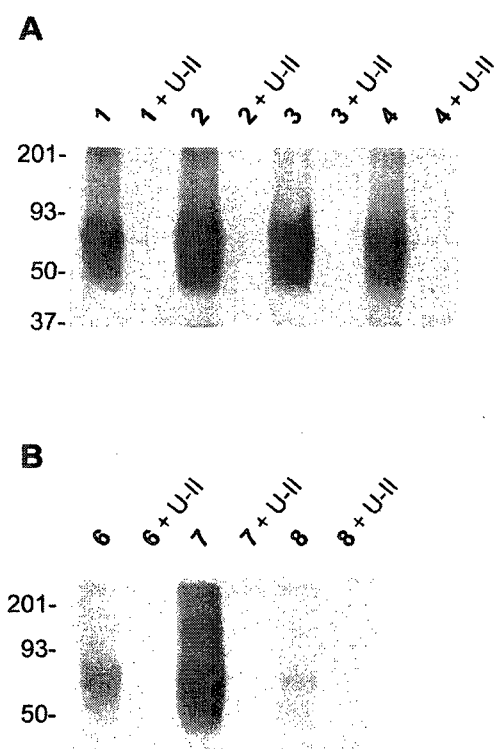
Affinities of compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 were obtained by competition binding curves of <sup>125</sup>I-U-II (0.1 nM) displaced by U-II in cell membrane preparations of COS-7 cells transiently transfected with rUT cDNA. Inositol phosphate production was measured following stimulation with 100 nM of either UII or analogues for 15 min at 37°C and as described in experimental procedures. Experiments were repeated three times, with similar results.

urantide (**5**, **6**, **7**, and **8**) elicited very weak  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  release in this assay, indicating their weak partial agonistic nature. It was therefore assumed that the structure probed by these peptides could differ from the one derived from the full agonist probed receptor structure.

**Photoaffinity labelling of rUT** - In the photoaffinity labelling experiments, all photoreactive peptides labelled a protein migrating as a 60 kDa band on SDS-PAGE (Figure 2, A and B). This adduct has been previously observed when photolabelling with  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>6</sup>]U-II [17] and corresponds to the intact glycosylated receptor. Incubation with 10 $\mu\text{M}$  U-II abolished the labelling indicating the specificity of the interaction. In order to identify the covalently modified receptor region, the labelled species were partially purified and treated with the chemical agent CNBr or specific endoproteinases, i.e. endoproteinases Glu-C (V8 protease), Arg-C or Lys-C.

**V8 protease digestion of the  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>]U-II-rUT,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>]U-II-rUT,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>3</sup>]U-II-rUT and  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>4</sup>]U-II-rUT complexes** - In an initial attempt to map the ligand-receptor contact site for agonist peptide ligands, the 60 kDa forms of  $^{125}\text{I}$ -1,  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -4 photolabelled rUT receptor complexes were partially purified (Figure 3A, lane 1) and submitted to V8 protease digestion. This enzyme cleaves on the C-terminal side of glutamate residues (Figure 1B) and the cleavage was carried out in a time course experiment over a period of 162 hours. This digestion produced a band of apparent molecular mass 17 kDa after 2 hours for each photolabelled receptor complex (Figure 3A, lane 2). One receptor domain appearing as a potential candidate



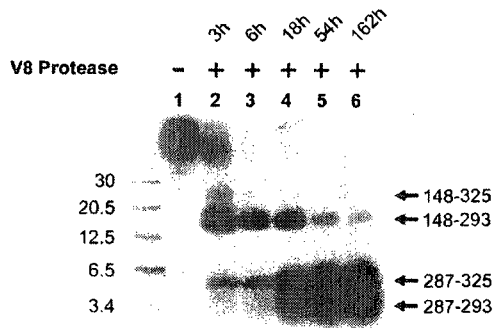


**Figure 2. Specific photoaffinity labelling of rat UT from transiently transfected COS-7 cells.**

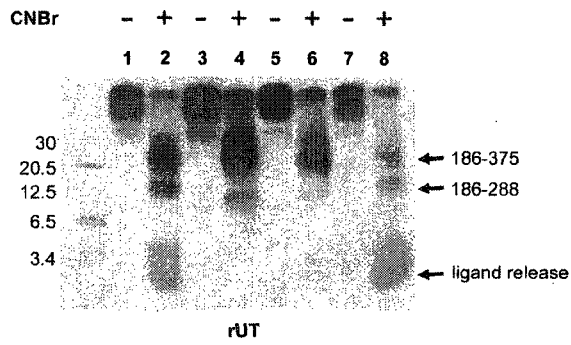
(A). COS-7 cells expressing rUT were photolabelled with  $^{125}\text{I}$ -1,  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -4. (B) COS-7 cells expressing rUT were photolabelled with  $^{125}\text{I}$ -6,  $^{125}\text{I}$ -7, and  $^{125}\text{I}$ -8.

All complexes were solubilized, denatured and submitted to SDS-PAGE on a 10% acrylamide separating gel (40  $\mu\text{g}$  of protein per lane) and terminated before exit of the migration front into the buffer. Gels were dried and subjected to autoradiography. Total labelling and labelling in the presence of  $10^{-5}\text{M}$  U-II are shown. Protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

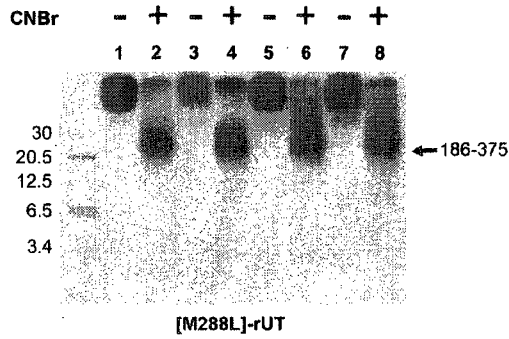
**A**



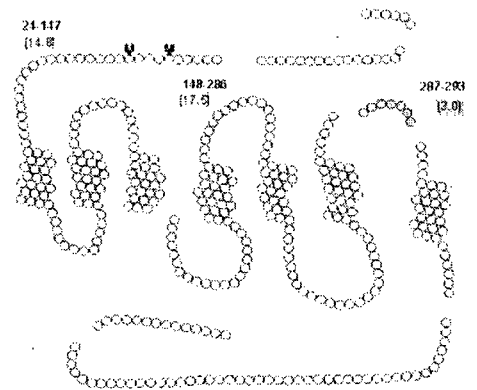
**B**



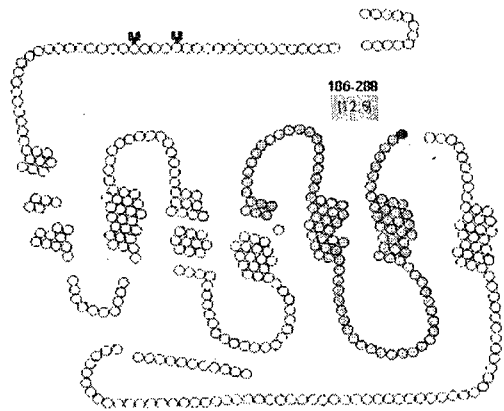
**C**



**D**



**E**



**Figure 3. Proteolytic and chemical cleavage of  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>] U-II,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>]U-II,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>3</sup>]U-II and  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>4</sup>]U-II photolabelled rUT.**

(A) Partially purified 60 kDa form of  $^{125}\text{I}$ -2 photolabelled rUT (5000 cpm) was incubated in the absence (lane 1) or the presence of V8 Protease (5  $\mu\text{g}$ ). Digestions were carried out for the indicated times at room temperature. Samples were run on a 16.5 % acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography.  $^{14}\text{C}$ -Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. The same results were obtained for  $^{125}\text{I}$ -1,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -4 photolabelled rUT complexes. These results are representative of at least three separate experiments. (B, C) Partially purified 60 kDa forms of  $^{125}\text{I}$ -1 (lanes 1, 2),  $^{125}\text{I}$ -2 (lanes 3, 4),  $^{125}\text{I}$ -3 (lanes 5, 6) and  $^{125}\text{I}$ -4 (lanes 7, 8) photolabelled rUT (B) or M288L-rUT (C) (5000 cpm) were respectively incubated in the absence (lanes 1, 3, 5, 7) or in the presence (lanes 2, 4, 6, 8) of CNBr (50 mg/ml). All digestions were carried out for 18 h at room temperature in the dark. Samples were run on a 16.5 % acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography.  $^{14}\text{C}$ -Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (D, E) Serpentine representation of the theoretical V8 protease (D) and CNBr (E) fragmentation footprints for rUT with cleavage at all potential sites. The numbers in square brackets indicate the molecular mass of the corresponding photoaffinity cross-linked fragment plus ligand. The putative contact domains, corresponding to the non-glycosylated receptor fragments 287-293 for V8 Protease and 186-288 for CNBr, are highlighted as dark grey shading. The photolabelled residue Met288 is indicated as a black closed circle.

is fragment Leu<sup>24</sup>-Glu<sup>147</sup> with a calculated molecular mass of 14.8 kDa glycosylated on Asn<sup>29</sup> and/or Asn<sup>33</sup> residues (Figure 3D). Other fragments corresponding to Arg<sup>148</sup>-Glu<sup>286</sup> or the incompletely digested Arg<sup>148</sup>-Glu<sup>293</sup> with a calculated molecular mass of 17.5 kDa (unglycosylated) are additional candidates. Further digestion of all four photolabelled receptor complexes progressively yielded a final fragment of 3 kDa (Figure 3A, lane 6). Taking into account the molecular weight of the ligand and cleavage specificity, this small fragment can only correspond to receptor fragment Ala<sup>287</sup>-Glu<sup>293</sup> of the 3<sup>rd</sup> extracellular loop for all four photoprobes (Figure 3D).

**CNBr chemical cleavage of the <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>1</sup>]U-II-rUT, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>2</sup>]U-II-rUT, <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>3</sup>]U-II-rUT and <sup>125</sup>I-[Bpa<sup>4</sup>]U-II-rUT complexes** - To further characterize the agonist-receptor contact site, the 60 kDa forms of <sup>125</sup>I-1, <sup>125</sup>I-2, <sup>125</sup>I-3 and <sup>125</sup>I-4 photolabelled rUT receptor complexes were partially purified (Figure 3B, lanes 1, 3, 5 and 7) and submitted to CNBr cleavage, which specifically cleaves at the C-terminal end of methionine residues (Figure 1B). Each agonist-receptor complex (Figure 3B, lanes 2, 4, 6 and 8) when submitted to CNBr digestion produced two bands migrating at apparent molecular weights of 22 and 12.5 kDa (Figure 3E). Due to the large size of the fragments obtained, the best candidates for attribution of these fragments are Leu<sup>186</sup>-Met<sup>288</sup> for the 12.5 kDa band and Leu<sup>186</sup>-Met<sup>376</sup> for the 22 kDa band, which corresponds to an incomplete digestion at residue Met<sup>288</sup>. In the case of <sup>125</sup>I-1 and <sup>125</sup>I-4 photolabel-rUT complexes, an additional band of 2 kDa is also produced. The presence of this 2 kDa band is consistent with ε-labelling of Met<sup>288</sup> of rUT and corresponds to the cleaved methylthiocyanate adduct of the photoligands.

Moreover, the absence of ligand release in the CNBr digestion pattern of the  $^{125}\text{I}$ -2 and  $^{125}\text{I}$ -3 photolabelled rUT complexes together with the results obtained by the V8 protease digestion suggests that both these photoprobes label on the  $\gamma$  carbon of Met<sup>288</sup>.

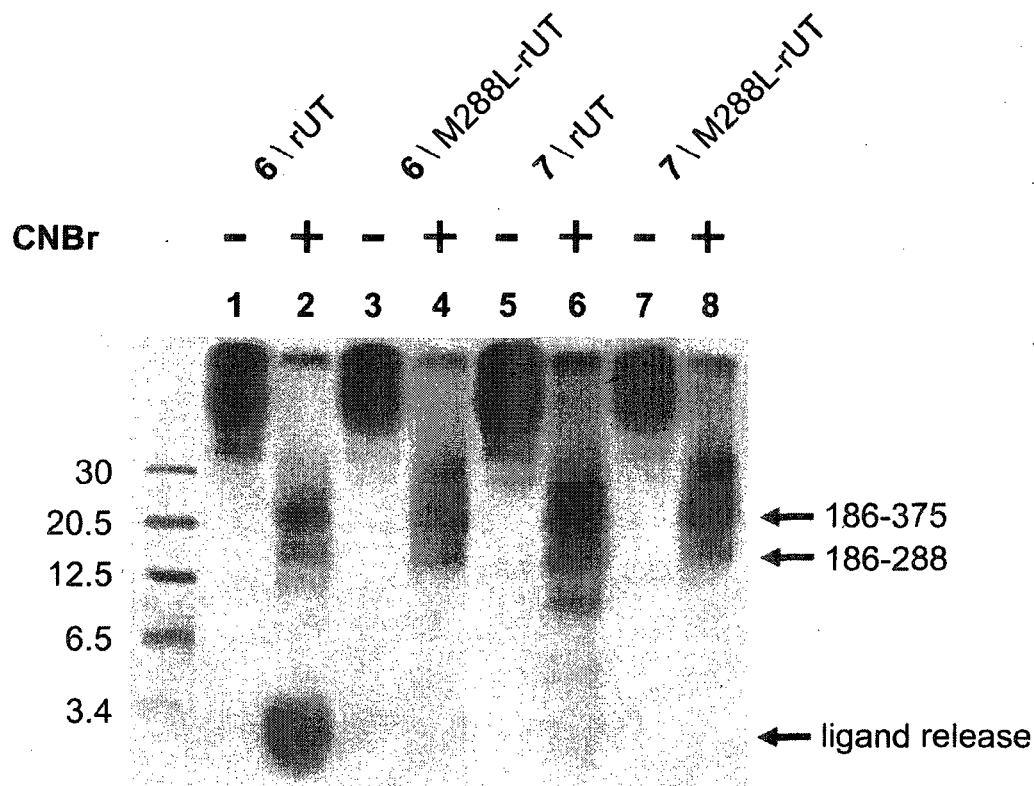
To further confirm that the first four positions of the agonist U-II are in close proximity to Met<sup>288</sup> of the third extracellular loop of rUT, we examined the effect of replacing this residue with leucine by expressing the M288L-rUT receptor mutant. Photolabelling of M288L-rUT with  $^{125}\text{I}$ -1,  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -4 was performed and each complex was partially purified (Figure 3C, lanes 1, 3, 5 and 7) and submitted to CNBr chemical cleavage. For all four probes, CNBr cleavage of the mutant photolabelled complex yielded a 22 kDa band corresponding to the receptor fragment Leu<sup>186</sup>-Met<sup>376</sup> (Figure 3C, lanes 2, 4, 6 and 8). The  $^{125}\text{I}$ -1 and  $^{125}\text{I}$ -4 photolabelled M288L-rUT mutant receptor complexes failed to show any ligand release, in contrast to the wild-type receptor. Furthermore, V8 protease cleavage of the ligand-mutant complexes yielded a fragment of 3 kDa similar to that of wild type receptor (data not shown), indicating that labelling on the mutant receptor still occurred on the Arg<sup>287</sup>-Glu<sup>293</sup> domain. Taken together, our results strongly suggest that Met<sup>288</sup> of the 3rd extracellular loop of rUT is a common contact point for all four N-terminal positions of U-II (Figure 3E).

**CNBr chemical cleavage of the  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II-rUT and  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup> Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II-rUT complexes** - In order to compare the binding mode of the full U-II agonists to that of the weak partial agonist [Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-

II, photoprobes incorporating Bpa in positions 1, 2 and 6 were used to determine peptide-receptor contact sites. Initially, the peptides  $^{125}\text{I}$ -6 and  $^{125}\text{I}$ -7 containing Bpa in the first two positions were used. The 60 kDa forms of  $^{125}\text{I}$ -6 and  $^{125}\text{I}$ -7 photolabelled receptor complexes were partially purified (Figure 4, lanes 1 and 5) and submitted to CNBr cleavage. Each ligand-receptor complex (Figure 4, lanes 2 and 6) following CNBr digestion produced two bands migrating at apparent molecular weights of 22 and 12.5 kDa, with the  $^{125}\text{I}$ -6 photolabel-receptor complex additionally producing ligand release. This CNBr digestion pattern is identical to that obtained with their full agonist counterparts  $^{125}\text{I}$ -1 and  $^{125}\text{I}$ -2, indicating that labelling for both partial agonist photoprobes also occurred on Met<sup>288</sup> of the third extracellular loop of rUT (Figure 3E). To corroborate this result, photolabelling of M288L-rUT with  $^{125}\text{I}$ -6 and  $^{125}\text{I}$ -7, was performed, both photolabelled receptor mutant complexes were partially purified (Figure 4, lanes 3 and 7) and submitted to CNBr chemical cleavage. Following this cleavage (Figure 4, lanes 4 and 8), ligand release for  $^{125}\text{I}$ -6 was completely abolished. These results indicate that labelling of the N-terminal portion of both agonist and partial agonist U-II ligands occurs on Met<sup>288</sup>.

#### **CNBr chemical cleavage of the $^{125}\text{I}$ -[Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II-rUT complex -**

We had previously shown that the full agonist [Bpa<sup>6</sup>]U-II labelled residues Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> of the fourth transmembrane domain of rUT [17]. The photoprobe [Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II incorporating Bpa in the sixth position, a weak partial agonist, was used to assess whether labelling would also occur at residues Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup>. First, the 60 kDa form of the  $^{125}\text{I}$ -8 photolabel-receptor complex was partially purified and

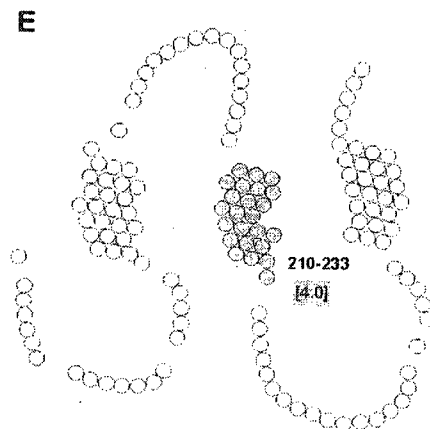
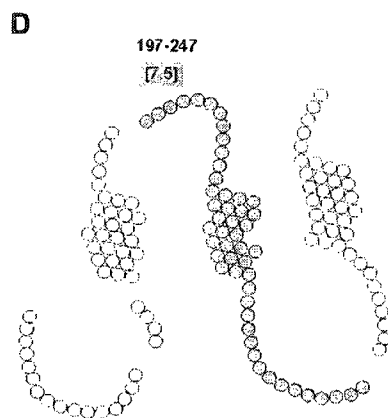
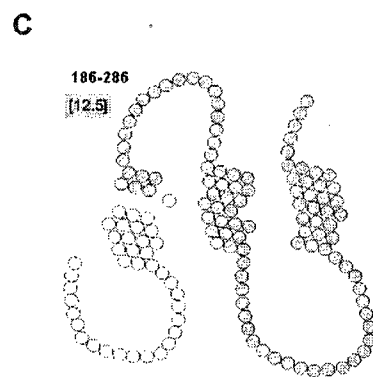
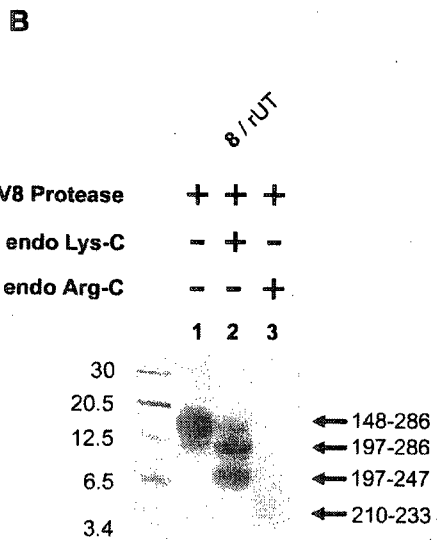
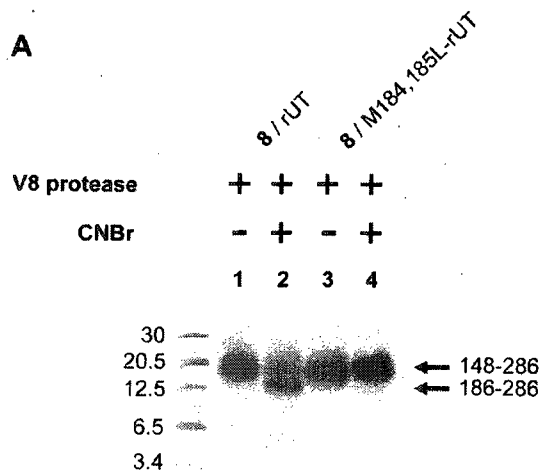


**Figure 4. CNBr cleavage of  $^{125}\text{I}$ -[Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>1</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II and  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II photolabelled rUT.**

Partially purified 60 kDa forms of  $^{125}\text{I}$ -6 and  $^{125}\text{I}$ -7 photolabelled rUT and M288L-rUT (5000 cpm) were incubated in the absence (lanes 1, 3, 5 and 7) or the presence (lanes 2, 4, 6 and 8) of CNBr (100 mg/ml) for 18 h at room temperature in the dark. Samples were run on a 16.5 % acrylamide-Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography.  $^{14}\text{C}$ -Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

digested with V8 protease. The resulting 17 kDa fragment (Figure 5A, lane 1), which corresponds to Arg<sup>148</sup>-Glu<sup>286</sup> [17], was partially purified. Cleavage of this fragment with CNBr (Figure 5A, lane 2) led to the production of a 12.5 kDa fragment, which could be attributed to the fragment Met<sup>185</sup>-Glu<sup>286</sup> (Figure 5C). More importantly, the lack of any detected ligand release (Figure 5A, lane 2) indicates that <sup>125</sup>I-8 did not cross-link to Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> as was observed for [Bpa<sup>6</sup>]U-II. To further identify the binding domain of <sup>125</sup>I-8, the 17 kDa V8 fragment (Figure 5B, lane 1) was submitted to Endo Lys-C digestion, which cleaves specifically at the C-terminal end of lysine residues (Figure 1B). Endo Lys-C digestion produced two bands migrating at apparent molecular masses of 10 kDa and 7.5 kDa (Figure 5B, lane 2). Since the 10 kDa band is progressively cleaved to give the 7.5 kDa band after prolonged digestion times (data not shown), the former is believed to originate from partial enzyme cleavage. Taking into account the region delimited by the V8 protease digestion, the only candidate for the 7.5 kDa band is the fragment Ser197-Lys247. This fragment encompasses part of extracellular loop 2, transmembrane 5 and part of intracellular loop 3 (Figure 5D). To further narrow down the domain of interaction of <sup>125</sup>I-8, the 17 kDa V8 fragment was submitted to Endo Arg-C digestion, which specifically cleaves at the C-terminal end of arginine residues (Figure 1B). This digestion produced a single band migrating at a molecular mass of 4 kDa. Taking into account the results obtained from the Lys-C digestion, the only possible candidate for this band is the fragment Thr<sup>210</sup>-Arg<sup>233</sup>, therefore localizing the labelling of <sup>125</sup>I-8 to the fifth transmembrane domain of rUT (Figure 5E).





**Figure 5. Proteolytic and chemical cleavage of the partially purified V8-protease generated fragment of  $^{125}\text{I}$ -[Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II photolabelled rUT.**

The partially purified 60 kDa form of  $^{125}\text{I}$ -8 photolabelled rUT and M184/185L-rUT (30000 cpm) were incubated in the presence of V8 Protease (1  $\mu\text{g}$ ) for at least 7 days at 37°C. The resulting 17 kDa labelled receptor fragments was then cut from the gel, electroeluted and concentrated. (A) The partially purified 17 kDa fragment was incubated in the absence or presence of 50 mg/ml CNBr for 18 h at room temperature in the dark. (B) The partially purified 17 kDa fragments were incubated in the absence (lane 1) or presence of Endo Lys-C (5 $\mu\text{g}$ ) (lane 2) or Endo Arg-C (5 $\mu\text{g}$ ) (lane 3) for 18h at 37°C. Samples were run on a 16.5 % acrylamide-Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography.  $^{14}\text{C}$ -Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (C, D, E) Serpentine representation of the idealised CNBr (C), Endo Lys-C (D) and Endo Arg-C (E) fragmentation footprints of the 17 kDa V8 protease fragment with cleavage at all potential sites. The numbers in square brackets indicate the molecular mass of the corresponding photoaffinity cross-linked fragment plus ligand. The putative contact domains, corresponding to the receptor fragments 197-247 for Endo Lys-C and 210-233 for Endo Arg-C, are highlighted as dark grey shading.

## DISCUSSION

Identifying the molecular determinants involved in the bi-molecular recognition of ligand and receptor is of great importance in order to understand the initial steps leading to receptor activation. In the present study, photoaffinity labelling was used as a strategy to probe into the interactions of U-II peptides with the rat UT receptor. This approach depends on the spatial proximity between radioactive photoligands and receptor domains to form a covalent conjugate that is subsequently mapped to identify the interaction sites. We hypothesized that the receptor conformation stabilized by a U-II agonist might differ from a conformation stabilized by a weak partial agonist and that these changes may be detected by photoaffinity labelling. Such an approach has recently been exploited for the cholecystinin and secretin receptors [31, 32].

To allow for the most optimal comparison between both amino-terminal and carboxy-terminal positions of U-II, a humanized version of urantide containing the first four residues of human U-II was designed. Four analogues of U-II containing Bpa in the variable N-terminal part of U-II at positions 1, 2, 3 and 4 as well as three humanized urantide analogues containing Bpa in both the variable (positions 1 and 2) and cyclic (position 6) were prepared. These peptides were characterized for their capacity to recognize and activate UT and the photolabelling patterns of agonist peptides were compared to those of the partial agonists. A recent report showed that amino-terminal deletions or substitutions of U-II had little or no effect on agonistic properties or binding affinities of the peptides [33], therefore we expected that Bpa substitution within this region should be permissible. Indeed, all U-II photoligands

with Bpa in positions 1, 2, 3 and 4 demonstrated full agonist properties with high affinity for the UT receptor. Replacing positions 1, 2 and 6 in humanized urantide ([Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II) with Bpa led to the production of partial agonists as demonstrated by their capacity at producing low levels of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> which is in line with the reported partial agonist nature of urantide [30]. It is noteworthy to mention however that reports have demonstrated that urantide is a partial agonist towards heterologously expressed human UT receptor but an antagonist towards rat aorta preparations [34] thereby suggesting that differences probably arise because of the cellular or tissue preparation used. Also, previous studies from our group indicated that substituting Bpa at position 6 in the cyclic portion of U-II analogues did not greatly affect its affinity [17]. Introduction of Bpa at position 6 in the humanized urantide peptide lowered somewhat its affinity for the UT receptor when compared to humanized urantide itself (compound 5). Nevertheless, on the basis of their pharmacological properties (Table 1) and their complete displacement by the parent U-II peptide in the photolabeling experiments, it is reasonable to assume that each analogue, agonist or partial agonist, would adopt a similar orthosteric binding mode to that taken by its parent peptide.

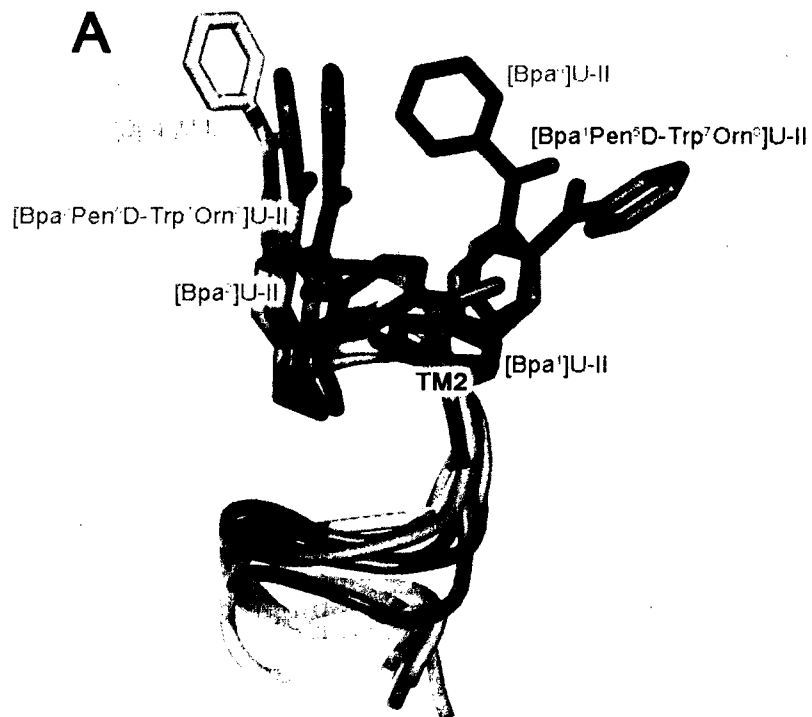
Previously, it was shown that position 6 of U-II photolabelled residues Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> of rUT and that a U-II analogue containing Bpa in position 7 failed to bind the receptor [17]. Analogues containing Bpa in position 8 and 9 of U-II also failed to bind rUT (data not shown). This is not surprising in light of structure-activity studies on U-II [33]. Our present results from enzymatic and chemical degradation of the photoligand-receptor complexes incorporating Bpa in an amino-terminal position

for both full and partial agonists have identified residue Met<sup>288</sup> of the 3<sup>rd</sup> extracellular loop as the sole contact point. It could be reasoned that the amino-terminal part of U-II analogues can weakly interact with the extracellular loops of UT; this would explain why these residues are less important for affinity and receptor activation. It is noteworthy to mention that the rat and human UT receptors share 90% sequence similarity. Interestingly, while most residues of ECL3 are conserved between rUT and hUT, the human UT receptor lacks Met<sup>288</sup> in ECL3. Because it has been shown using surface plasmon resonance that ECL3 from the human receptor specifically binds U-II [35], it is reasonable to hypothesize that the interaction mode of the N-terminus of U-II with either the rat or the human receptor will be similar.

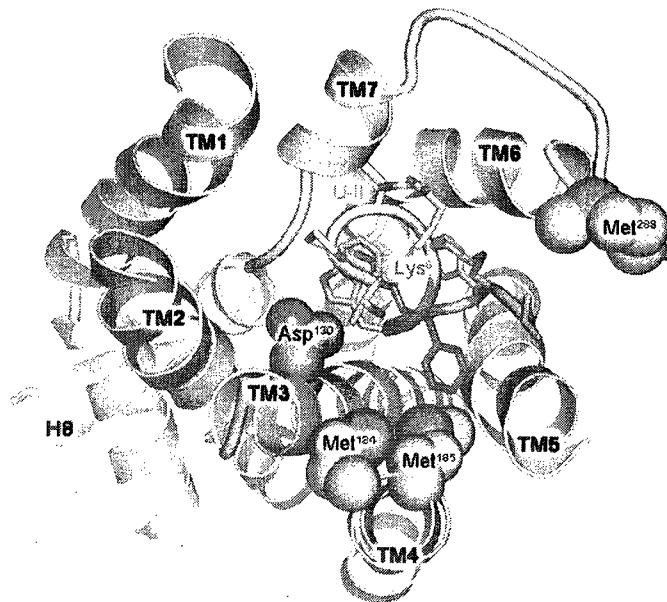
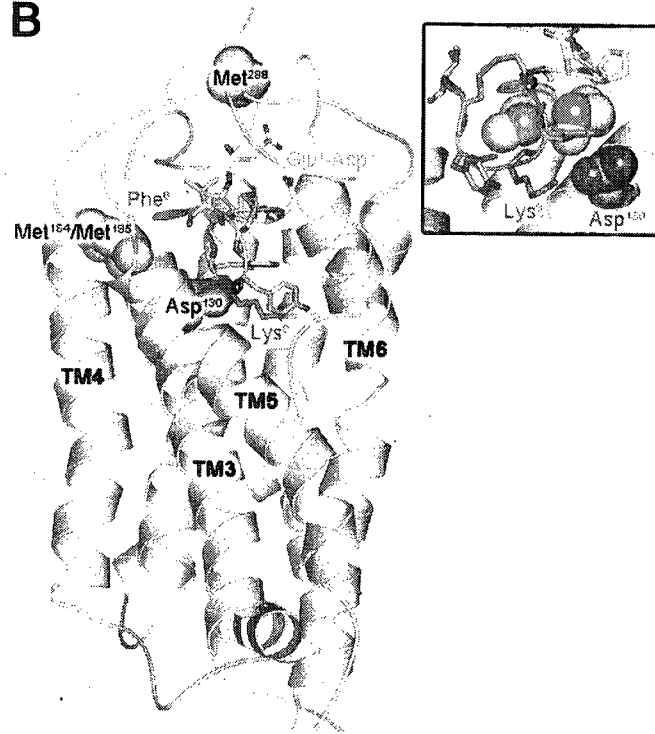
Interaction of benzophenone residues with Met residues of receptors has been widely reported [15, 36]. This type of interaction appears to be favoured since the free radical is stabilized as a charge transfer complex by the presence of the thioether moiety found in methionine. Such a complex would drive the equilibrium toward the formation of covalent products with the adjacent methyl or methylene groups. A benzophenone containing ligand could thus be attracted to Met residues located in a close proximity to the binding site but beyond the Van der Waals radius although if no Met is present, Bpa is still able to covalently link side-chains of other residues [37-39]. Photolabelling of Met residues can lead to two different labelling patterns:  $\epsilon$ -labelling which leads to ligand release following CNBr cleavage and  $\gamma$ -labelling, which does not lead to ligand release [23]. This property can be exploited to refine the mapping studies. Our results show that CNBr cleavage gives rise to ligand release for the <sup>125</sup>I-1, <sup>125</sup>I-4 and <sup>125</sup>I-6 photolabelled rUT complexes whereas ligand release is not

observed in the case of photolabelling with  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -7. CNBr cleavage of these latter complexes generates only traces of the 12.5 kDa fragment and mostly the complete 186-375 fragment of 22 kDa; this is indicative of  $\gamma$ -labelling. Our results show that the CNBr reaction is particularly difficult to drive to completion within the Met<sup>288</sup> residue region. This can be explained in two ways: firstly it has been observed that peptide bonds containing Pro residues are difficult to cleave (residue 289 is a Pro) and secondly, as reported earlier, the close proximity of ligand attachment to Met<sup>288</sup> could restrict the formation of CNBr reaction intermediates, thus preventing the reaction from proceeding optimally [40]. Such steric hindrance can be induced by label incorporation into the  $\gamma$ -methylene group of Met<sup>288</sup> and would thus demonstrate that  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -7 also interact with Met<sup>288</sup>. Exclusive  $\gamma$ -labelling of  $^{125}\text{I}$ -2,  $^{125}\text{I}$ -3 and  $^{125}\text{I}$ -7 indicates that the Bpa moiety of these peptides is in closer proximity to the Met<sup>288</sup> backbone than that of  $^{125}\text{I}$ -1,  $^{125}\text{I}$ -4 and  $^{125}\text{I}$ -6 which shows  $\epsilon$ -labelling. Molecular modeling, based on the reported U-II structure which conserved the type II'  $\beta$ -turn [21] (Figure 6A), further suggests that indeed Bpa would occupy distinct conformational spaces in the receptor's orthosteric binding pocket depending on the residue's position within either an agonist or partial agonist peptide. Although, these models cannot be seen as experimental structures, they nonetheless offer a reasonable structural framework to explain the position dependence of the photolabeling of Met<sup>288</sup>.

It is generally accepted that binding of ligands with different potencies to a given receptor should lead to the stabilisation of distinct receptor conformations [41]. We had previously found that photolabelling with a full agonist U-II peptide



B





**Figure 6. Molecular models of U-II analogues and U-II/rUT complexes.**

A) The U-II ligand structures [Bpa1Pen5D-Trp7Orn8]U-II (dark gray), [Bpa2Pen5D-Trp7Orn8]U-II (pink), [Bpa1]U-II (blue), [Bpa2]U-II (orange), [Bpa3]U-II (yellow) and [Bpa4]U-II (green) were superimposed. B) Orientation of U-II in the rUT binding pocket. The receptor backbone is shown as a light gray ribbon. The ligand U-II backbone is shown as a pink ribbon except for amino acids Glu1-Asp4 (yellow), Phe6 (green) and Lys8 (blue), which interact with residues Met288, Met184/Met185 (all Met are light orange) and Asp130 (red) of rUT respectively. The inset highlights the interaction of residue Lys8 of U-II with Asp130 of the receptor from another angle with transmembranes 1, 6 and 7 removed for clarity. Oxygen atoms are red, nitrogen atoms are blue and sulphur atoms are orange for all molecules. All structures were modeled as described in the Experimental Procedures. See also supplementary figure 1 and supplementary pdb file.

containing Bpa in position 6 led to the identification of Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> of the fourth transmembrane domain of rUT as a contact site. We now show that photolabelling with the weak partial agonist <sup>125</sup>I-8, which also incorporates Bpa in the sixth position, identified a different labelling site which was subsequently mapped to the fifth transmembrane domain. Thus, these differences may reflect changes in the conformations adopted by the receptor during the activation process and more particularly the different relative orientations adopted by TM4 and TM5 within the receptor core. We propose that during activation, TM4 may move closer to the receptor's orthosteric binding pocket and/or that TM5 may move away from the receptor's binding pocket allowing labelling of TM4 by the agonist. At this point, it is not possible to determine the exact nature or extent of these movements. Our results support the notion that full agonist and partial agonist U-II peptides bind to UT differently [35] and hence may stabilize different rUT conformations.

In order to assess the relative position the full agonist peptide in the binding pocket of rUT, we sought to model the receptor in complex with the U-II peptide. To correctly position U-II within the receptor binding pocket, distance restraints needed to be defined. A first point used was the putative ionic interaction between Lys<sup>8</sup> of U-II and Asp130<sup>(3,32)</sup> of rUT (Figure 6B, inset). In support of this interaction, position Asp122<sup>(3,32)</sup> of the somatostatin receptor subtype 2, a member of the same GPCR subfamily as UT was found to interact with Lys<sup>9</sup> of somatostatin, a peptide analogous to U-II [42]. Furthermore, substitution of Asp<sup>130</sup> with Ala in rUT totally abolished receptor binding (data not shown) and structure-activity studies of U-II consistently show that Lys<sup>8</sup> is critical to U-II binding and function [33]. Our photolabelling results

were used to define a second interaction point: an area defined as a mean position between the C $\alpha$  of residues Glu<sup>1</sup> to Asp<sup>4</sup> of U-II with Met<sup>288</sup> of rUT. A third anchoring point is position Bpa<sup>6</sup> which is in close proximity to Met<sup>184</sup>/Met<sup>185</sup> of transmembrane domain 4, which we had previously identified. Using these anchoring points, a U-II/rUT receptor complex was modeled (Figure 6B, see also movie in Supplementary Figure 1 and supplementary pdb file). Following minimisation of the complex with distance restraints defined, the structure of docked U-II has a RMSD value of 1.4 Å compared with the initial U-II structure and the rUT transmembrane domains have a RMSD value of 1.5 Å compared to the initial model. These values indicate that the structure of both ligand and receptor varied little during the docking process. In our model, the critical Trp<sup>7</sup>, Lys<sup>8</sup> and Tyr<sup>9</sup> residues which compose the pharmacophore of U-II are well oriented within a pocket formed by the extracellular side of the transmembrane domains of rUT, highlighting their importance for receptor binding and activation.

*In conclusion, our results support the hypothesis that agonist or partial agonist ligands may stabilise different receptor conformations upon binding. For the amino-terminal portion of U-II peptides, we show that binding determinants are present in ECL3 of rUT. We also show a possible contribution of TM4 and TM5 during receptor activation. Although most studies to date implicate either TM6 or TM3 movements during receptor activation [25, 26], it is increasingly becoming recognized that TM5 may play a more important role during the GPCR activation process than previously appreciated [43]. Further studies combining mutagenesis, the substituted cysteine accessibility method (SCAM) and molecular modelling should*

provide further information crucial to the development of models defining the binding pocket, and perhaps the activation mechanism of this receptor. Because of the putative role of U-II in several pathophysiologies including cardiovascular disease, the design of novel ligands could be facilitated by the knowledge brought on by these models.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Brian O'Dowd for the rUT clone and Marie-Reine Lefebvre for synthesis of the U-II analogues. We also thank Stéphane Martin and Martin Clément for helpful discussions. This work is supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and from the Heart and Stroke Foundation. This work is part of the Ph.D. thesis of B.J.H. C.D.P. is a recipient of a Heart and Stroke Foundation studentship. E.E. is the recipient of the J.C. Edwards Chair in cardiovascular research. RL is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## **REFERENCES**

1. Douglas, S. A. (2003) Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 159-167
2. Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, H., Barkley, M., Nishioka, R. S. and Bern, H. A. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5021-5024
3. Coulouarn, Y., Lihmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J. C., Conlon, J. M., Bern, H. A. and Vaudry, H. (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15803-15808

4. Coulouarn, Y., Jegou, S., Tostivint, H., Vaudry, H. and Lihmann, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett.* 457, 28-32
5. Nothacker, H. P., Wang, Z., McNeill, A. M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B., Duckles, S. P. and Civelli, O. (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell Biol.* 1, 383-385
6. Katano, Y., Ishihata, A., Aita, T., Ogaki, T. and Horie, T. (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 402, R5-7
7. MacLean, M. R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Morecroft, I. and Pollard, K. (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 130, 201-204
8. Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M. and Fujino, M. (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 860-868
9. Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M., Loudon, C. S., Foley, J. J., Sauermelch, C. F., Coatney, R. W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S. D., Stadel, J. M., Martin, J. D., Liu, W. S., Glover, G. I., Wilson, S., McNulty, D. E., Ellis, C. E., Elshourbagy, N. A., Shabon, U., Trill, J. J., Hay, D. W. and Douglas, S. A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401, 282-286
10. Proulx, C. D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S. A., Guillemette, G. and Leduc, R. (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem. J.* 385, 115-123
11. Ong, K. L., Lam, K. S. and Cheung, B. M. (2005) Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 19, 65-75

12. Dorman, G. and Prestwich, G. D. (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* 18, 64-77
13. Boucard, A. A., Wilkes, B. C., Laporte, S. A., Escher, E., Guillemette, G. and Leduc, R. (2000) Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry* 39, 9662-9670
14. Coulie, B., Matsuura, B., Dong, M., Hadac, E. M., Pinon, D. I., Feighner, S. D., Howard, A. D. and Miller, L. J. (2001) Identification of peptide ligand-binding domains within the human motilin receptor using photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 276, 35518-35522
15. Greenberg, Z., Bisello, A., Mierke, D. F., Rosenblatt, M. and Chorev, M. (2000) Mapping the bimolecular interface of the parathyroid hormone (PTH)-PTH1 receptor complex: spatial proximity between Lys(27) (of the hormone principal binding domain) and leu(261) (of the first extracellular loop) of the human PTH1 receptor. *Biochemistry* 39, 8142-8152
16. Kenakin, T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 346-354
17. Boucard, A. A., Sauve, S. S., Guillemette, G., Escher, E. and Leduc, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem. J.* 370, 829-838
18. Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857
19. Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Leduc, R. and Guillemette, G. (1999) Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* 38, 8621-8627
20. Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M. and Hagler, A. T. (1988) Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 4, 31-47
21. Carotenuto, A., Grieco, P., Campiglia, P., Novellino, E. and Rovero, P. (2004) Unraveling the active conformation of urotensin II. *J. Med. Chem.* 47, 1652-1661

22. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745
23. Clement, M., Martin, S. S., Beaulieu, M. E., Chamberland, C., Lavigne, P., Leduc, R., Guillemette, G. and Escher, E. (2005) Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay. *J. Biol. Chem.* 280, 27121-27129
24. Boucard, A. A., Roy, M., Beaulieu, M. E., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G. and Leduc, R. (2003) Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J. Biol. Chem.* 278, 36628-36636
25. Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. and Khorana, H. G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770
26. Sheikh, S. P., Zvyaga, T. A., Lichtarge, O., Sakmar, T. P. and Bourne, H. R. (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* 383, 347-350
27. Onan, D., Hannan, R. D. and Thomas, W. G. (2004) Urotensin II: the old kid in town. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 175-182
28. DeLano, W. L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. Delano Scientific, San Carlos, CA
29. Patacchini, R., Santicoli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P. and Maggi, C. A. (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1155-1158
30. Song, W., McDonald, J., Camarda, V., Calo, G., Guerrini, R., Marzola, E., Thompson, J. P., Rowbotham, D. J. and Lambert, D. G. (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 373, 148-157

31. Dong, M., Hadac, E. M., Pinon, D. I. and Miller, L. J. (2005) Differential spatial approximation between cholecystokinin residue 30 and receptor residues in active and inactive conformations. *Mol. Pharmacol.* 67, 1892-1900
32. Dong, M., Hosohata, K., Pinon, D. I., Muthukumaraswamy, N. and Miller, L. J. (2006) Differential Spatial Approximation Between Secretin and Its Receptor Residues in Active and Inactive Conformations Demonstrated by Photoaffinity Labeling. *Mol. Endocrinol.*, (in press)
33. Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S. and Fournier, A. (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 1200-1209
34. Camarda, V., Song, W., Marzola, E., Spagnol, M., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Thompson, J. P., Rowbotham, D. J., Behm, D. J., Douglas, S. A., Calo, G. and Lambert, D. G. (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 83-86
35. Boivin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Oulyadi, H., Davoust, D. and Fournier, A. (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* 45, 5993-6002
36. Mannstadt, M., Luck, M. D., Gardella, T. J. and Juppner, H. (1998) Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross-linking and mutational studies. *J. Biol. Chem.* 273, 16890-16896
37. Zang, M., Dong, M., Pinon, D. I., Ding, X. Q., Hadac, E. M., Li, Z., Lybrand, T. P. and Miller, L. J. (2003) Spatial approximation between a photolabile residue in position 13 of secretin and the amino terminus of the secretin receptor. *Mol. Pharmacol.* 63, 993-1001
38. Perodin, J., Deraet, M., Auger-Messier, M., Boucard, A. A., Rihakova, L., Beaulieu, M. E., Lavigne, P., Parent, J. L., Guillemette, G., Leduc, R. and Escher, E. (2002) Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor. *Biochemistry* 41, 14348-14356
39. Tan, Y. V., Couvineau, A., Van Rampelbergh, J. and Laburthe, M. (2003) Photoaffinity labeling demonstrates physical contact between vasoactive intestinal peptide and the N-terminal ectodomain of the human VPAC1 receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 36531-36536



40. Sachon, E., Bolbach, G., Chassaing, G., Lavielle, S. and Sagan, S. (2002) Cgamma H2 of Met174 side chain is the site of covalent attachment of a substance P analog photoactivable in position 5. *J. Biol. Chem.* 277, 50409-50414
41. Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273, 17979-17982
42. Strnad, J. and Hadcock, J. R. (1995) Identification of a critical aspartate residue in transmembrane domain three necessary for the binding of somatostatin to the somatostatin receptor SSTR2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 913-921
43. Schwartz, T. W., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. and Elling, C. E. (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 481-519

**Avant propos de l'article 2****Article 2*****Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor***

Holleran, B.J., Domazet, I., Beaulieu, M.E., Yan, L., Guillemette, G., Lavigne, P., Escher, E. & Leduc, R. (2009), *Biochemical Pharmacology* (in press)

**Statut:** Sous presse à *Biochemical Pharmacology*

**Apport:** J'ai dirigé cette étude et produit toutes les manipulations de ce manuscrit à l'exception de la Figure 8. J'ai rédigé la première version de ce manuscrit.

## Résumé de l'article 2

L'urotensine II (U-II) est le ligand endogène du récepteur de l'urotensine II (UT), un récepteur couplé aux protéines G (GPCR). Dans cet article, nous avons utilisé l'approche du SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method) pour identifier des résidus des domaines transmembranaires (TMD) six et sept du récepteur UT de rat qui contribuent à la formation de la pochette de liaison du récepteur. Chaque résidu du fragment R256<sup>(6.32)</sup>-Q283<sup>(6.59)</sup> du TMD6 et du fragment A295<sup>(7.31)</sup>-T321<sup>(7.57)</sup> du TMD7 a été muté, un à la fois, en cystéine. Chacun de ces mutants a été exprimé dans les cellules COS-7, qui ont été par la suite traitées avec le methanethiosulfonate-éthylammonium (MTSEA) chargé positivement ou le methanethiosulfonate-éthylsulfonate (MTSES) chargé négativement. Le traitement par le MTSEA inhibe la liaison du ligand <sup>125</sup>I-U-II aux mutants F268C<sup>(6.44)</sup> et W278C<sup>(6.54)</sup> du TMD6 ainsi que les mutants L298C<sup>(7.34)</sup>, T302C<sup>(7.38)</sup>, et T303C<sup>(7.39)</sup> du TMD7. Le traitement par le MTSES inhibe la liaison de deux mutants additionnels, soit L282C<sup>(6.58)</sup> du TMD6 et Y300C<sup>(7.36)</sup> du TMD7. Ces résultats suggèrent que des résidus spécifiques accessibles à l'eau sont orientés vers la pochette de liaison du récepteur UT. Cette approche nous a permis d'identifier des déterminants clés situés dans les TMD6 et TMD7 qui participent à la pochette de liaison du récepteur, nous permettant de raffiner notre modèle moléculaire du complexe U-II/UT basé par homologie.

**Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor**

Brian J. Holleran, Ivana Domazet, Marie-Eve Beaulieu, Li Ping Yan, Gaétan Guillemette, Pierre Lavigne, Emanuel Escher, and Richard Leduc#

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

Running title: TMD6 and TMD7 residues of the UT receptor binding pocket

#Corresponding author

Richard Leduc, Ph.D.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Quebec

Canada, J1H 5N4

**ABSTRACT**

Urotensin II (U-II), a cyclic undecapeptide, is the natural ligand of the urotensin II receptor (UT), a G protein-coupled receptor. In the present study, we used the substituted-cysteine accessibility method to identify specific residues in transmembrane domains (TMDs) six and seven of the rat urotensin II (U-II) receptor (rUT) that contribute to the formation of the binding pocket of the receptor. Each residue in the R256<sup>(6.32)</sup>-Q283<sup>(6.59)</sup> fragment of TMD6 and the A295<sup>(7.31)</sup>-T321<sup>(7.57)</sup> fragment of TMD7 was mutated, individually, to a cysteine. The resulting mutants were expressed in COS-7 cells, which were subsequently treated with the positively charged methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA) or the negatively charged methanethiosulfonate-ethylsulfonate (MTSES) sulfhydryl-specific alkylating agents. MTSEA treatment resulted in a significant reduction in the binding of TMD6 mutants F268C<sup>(6.44)</sup> and W278C<sup>(6.54)</sup> and TMD7 mutants L298C<sup>(7.34)</sup>, T302C<sup>(7.38)</sup>, and T303C<sup>(7.39)</sup> to <sup>125</sup>I-U-II. MTSES treatment resulted in a significant reduction in the binding of two additional mutants, namely L282C<sup>(6.58)</sup> in TMD6 and Y300C<sup>(7.36)</sup> in TMD7. These results suggest that specific residues orient themselves within the water-accessible binding pocket of the rUT receptor. This approach, which allowed us to identify key determinants in TMD6 and TMD7 that contribute to the UT receptor binding pocket, enabled us to further refine our homology-based model of how U-II interacts with its cognate receptor.

*Keywords:* Urotensin II, Urotensin II Receptor, GPCR, Substituted-cysteine accessibility method

## 1. INTRODUCTION

Urotensin II (ETPDCFWKYCV, U-II) is a cyclic undecapeptide with vasoactive, proliferative, neuronal, and chemotactic properties. U-II is the endogenous ligand of the urotensin II (UT) receptor, which is considered a pharmacological target for treating cardiovascular diseases (hypertension, heart failure, cardiac fibrosis, and hypertrophy), atherosclerosis, liver diseases, and diabetes [14, 15, 26, 28]. U-II was originally isolated from the urophysis of teleost fish [30], and the cDNA encoding its precursor has been identified in many species [9, 10]. The UT receptor is a member of family 'A' of the larger G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily [2]. Many features associated with this family such as a short N-terminus, a highly conserved residue in each transmembrane domain (TMD), a D/ERY motif in the second intracellular loop, a CW/FxP 'toggle switch' motif [32] in TMD6, a NPxxY motif in TMD7, and potential serine/threonine phosphorylation sites in the cytoplasmic tail [31] are found in the UT receptor.

The molecular mechanisms by which agonists bind to and activate GPCRs through conformational changes remain obscure. Although for many years, the only available structural model was rhodopsin [27], the structures of other GPCRs such as the  $\beta_2$  adrenergic [7],  $\beta_1$  adrenergic [34], opsin [29], and  $A_{2A}$  adenosine receptors [19] have recently been determined. These studies have enabled us to better understand how diffusible ligands can recognize and bind to GPCRs, and how TMDs

are involved in this process. For instance, the A<sub>2A</sub> adenosine structure clearly shows how both TMD6 and TMD7 play a role in the formation of the receptor's binding pocket [19].

Despite these major advances, many questions remain regarding the dynamics by which conformers shift from the ground state to an active state. A variety of biophysical and biochemical approaches are needed to help address these issues. The substituted-cysteine accessibility method (SCAM) [1, 21, 22] is an ingenious approach for systematically identifying TMD residues that contribute to the binding-site pocket of GPCRs. Consecutive residues within TMDs are mutated to cysteine, one at a time, and the mutant receptors are expressed in heterologous cells. If ligand binding to a cysteine-substituted mutant is unchanged compared to wild-type receptor, it is assumed that the structure of the mutant receptor, especially around the binding site, is similar to that of the wild-type receptor and that the substituted cysteine lies in a orientation similar to that of the residue of the wild-type receptor. In TMDs, the sulfhydryls of cysteines oriented toward the aqueous binding-site pocket should react more quickly with charged sulfhydryl reagents like methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA) and methanethiosulfonate-ethylsulfonate (MTSES) than the sulfhydryls of cysteines that face the interior of the protein or the lipid bilayer. Two criteria are used to determine whether engineered cysteines are positioned at the surface of the binding-site pocket: (i) the reaction with the MTS reagent alters binding irreversibly and (ii) the reaction is retarded by the presence of the ligand. This approach has been used by us and others to identify residues that line the surface of GPCR binding-site pockets [3, 17, 20, 24, 25, 36].

Here, we report the application of SCAM to probe TMD6 and TMD7 of the rat UT receptor.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

Bovine serum albumin (BSA) and bacitracin were from Sigma (St. Louis, MO, USA). FUGENE<sup>®</sup>-6 was from Roche (Mannheim, Germany). The sulfhydryl-specific alkylating reagents MTSEA ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ) and MTSES ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ) were from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). The cDNA clone of the rat urotensin II receptor (rUT) subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3 was kindly provided by Dr. Brian O'Dowd (Department of Pharmacology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada). DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media), FBS (fetal bovine serum), and penicillin/streptomycin were from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Oligonucleotide primers were from IDT (Coralville, IA, USA). Human U-II was from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA).  $^{125}\text{I}$ -U-II (specific activity 1000 Ci/mmol) was prepared using IODO-GEN<sup>®</sup> (1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenyl-glycoluril; Pierce Chemical Co.,) as described by Fraker and Speck [16]. Briefly, 10  $\mu\text{l}$  of a 1 mM peptide solution was incubated with 20  $\mu\text{g}$  of IODO-GEN<sup>®</sup>, 80  $\mu\text{l}$  of 100 mM borate buffer (pH 8.5), and 1 mCi of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  for 30 min at room temperature, and was then purified by HPLC on a C-18 column. The specific



radioactivity of the labelled peptide was determined by self-displacement and saturation-binding analysis.

## *2.2 PCR mutagenesis*

Mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics) using rUT inserted into pcDNA3 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as a template. A set of forward and reverse oligonucleotides were constructed to introduce cysteine mutations between R256<sup>(6.32)</sup> and Q283<sup>(6.59)</sup> for TMD6 and between A295<sup>(7.31)</sup> and Q283<sup>(7.57)</sup> for TMD7. The PCR products were re-inserted in pcDNA3 and the mutations were confirmed by nucleotide sequencing.

## *2.3 Cell culture and transfections*

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 IU/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin at 37°C. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using FUGENE<sup>®</sup>-6 as described by the manufacturer. Transfected cells were grown for 48 h before using them for the binding and SCAM assays.

## *2.4 Binding experiments*

COS-7 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were gently scraped into washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C, and resuspended in

binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, 0.01% bacitracin). Saturation binding experiments were performed by incubating broken cells (20-40 µg of protein) for 1 h at room temperature with increasing concentrations of <sup>125</sup>I-U-II (0.15-20 nM) in a final volume of 500 µl. Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM unlabeled U-II. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through GF/C filters pre-soaked for at least 1 h in binding buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated by  $\gamma$ -radiation counting. Results are presented as means  $\pm$  SD. Binding data ( $B_{max}$  and  $K_d$ ) were analyzed with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using a one-site binding hyperbola nonlinear regression analysis.

### *2.5 Treatment with MTS reagents*

MTS treatments were performed according to the procedure of Javitch et al. [21], with minor modifications. Two days after transfection, the cells, which were grown in 12-well plates, were washed with PBS and incubated for 3 min at room temperature with freshly prepared MTSEA or MTSES at the desired concentrations (typically 0.5 mM to 6 mM) in a final volume of 200 µl. The reaction was stopped by washing the cells with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Intact cells were then incubated in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM <sup>125</sup>I-U-II for 120 min at room temperature. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed with 0.1 N NaOH and the radioactivity was evaluated by  $\gamma$  counting. The percentage of fractional binding inhibition was calculated as  $[1 - (\text{specific binding after MTS-X treatment} / \text{specific binding without treatment})] \times 100$ .

### *2.6 Protection against MTS reagents by U-II*

Transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and incubated in the presence or absence of 100 nM U-II for 1 h at 16°C (to avoid internalization of receptors). Cells were washed to remove excess ligand and were treated with the MTS reagent. Cells were washed three times with ice-cold PBS and once with an acidic buffer (150 mM NaCl, 50 mM acetic acid, pH 3.0) to dissociate bound ligand. They were then incubated for 3 h at 16°C in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM <sup>125</sup>I-U-II. The percentage of protection was calculated as [(inhibition in the absence of U-II) – (inhibition in the presence of U-II)]/(inhibition in the absence of U-II) x 100.

### *2.7 Molecular modeling*

All calculations were performed on a Silicon Graphics Octane2 workstation (Silicon Graphics Ins. Mountain View, CA, U.S.A.). The U-II and rUT receptor models were built using Insight II modules (Biopolymer, Homology, Discover; Accelrys, San Diego, CA, USA). The molecular model of U-II was constructed in a linear form using the Biopolymer module from Insight II. Subsequently, a disulfide bond was added between the residues in positions 5 and 10 of the ligand. The potential energy of the peptide was minimized for 500 steps with the steepest descents and a consistent valence force field [11] using the Discover module. The minimized structure adopted the overall conformation previously reported for U-II [5]. A distance-dependent dielectric constant of 4 was used.

The theoretical structure of rUT (GenBank™ accession no. P49684) was generated by homology modeling based on the crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor (Protein Data Bank: 2RH1), as described previously [8]. The resulting structure represents an inactive form of rUT with an overall configuration very similar to that of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor (1.38 Å RMSD between C $\alpha$  of the transmembrane domains).

The U-II modeled structure was placed between the transmembrane domains of rUT, as suggested by the photolabeling results obtained with agonist ligands [4, 18]. These results were used as distance restraints for the energy minimization of the U-II/rUT complex. A first minimization of the complex between U-II and rUT was performed using distance restraints ( $2 \text{ \AA} < d < 7 \text{ \AA}$ ) between the S $\delta$  atoms of the photolabeled Met residues and the C $\gamma$  atom of the corresponding side chains on U-II. More specifically, residue Glu1 was restrained to Met288 [18], residue Phe6 was restrained to Met184 and Met185 [4], and Lys8 was restrained to Asp130 [23]. The backbone atoms of the rUT transmembrane domains were held in their positions during this step. The ligand and the extracellular and intracellular loops were free to move and interact. The U-II/rUT complex was refined by several energy minimization steps until the maximum derivative was less than 0.1 kcal/mol. Molecular graphics figures were generated using Pymol [13].

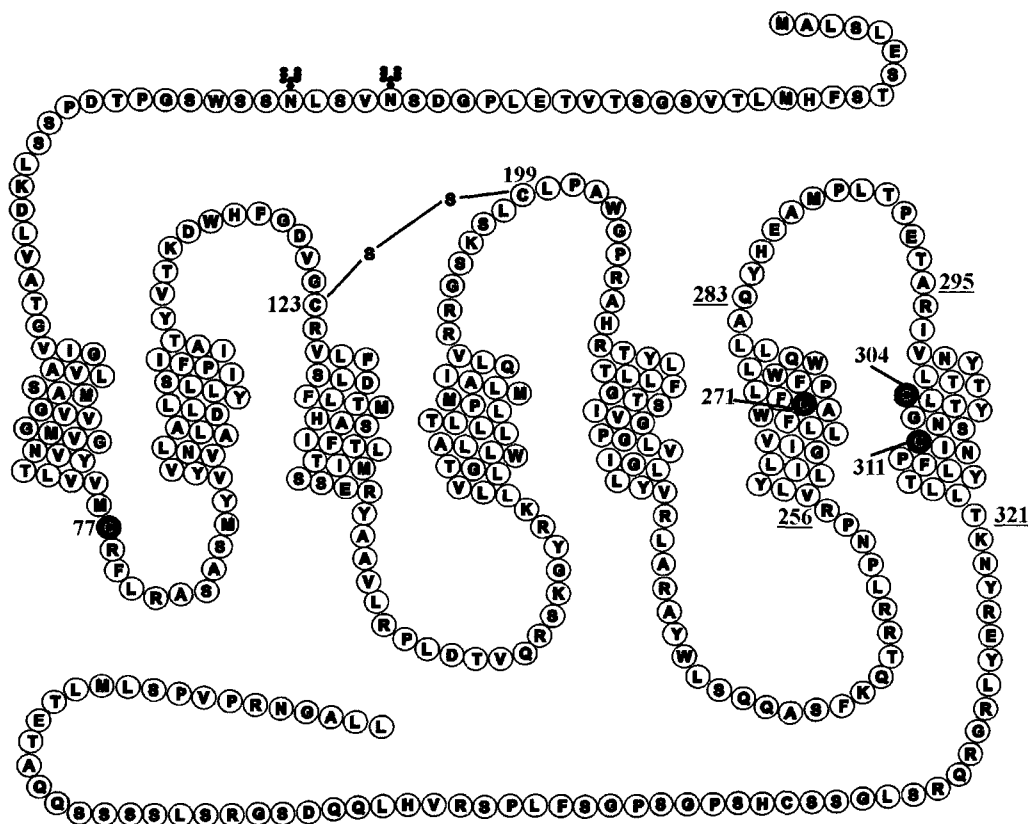
### **3. RESULTS**

#### *3.1 Binding properties of mutant receptors with cysteines in TMD6 and TMD7*

To identify residues in TMD6 and TMD7 that face the binding-site pocket of the rUT receptor, we mutated 27 consecutive residues between R256<sup>(6.32)</sup> and Q283<sup>(6.59)</sup> of TMD6 and 26 consecutive residues between A295<sup>(7.31)</sup> and Q283<sup>(7.57)</sup> of TMD7 to cysteine, one at a time (Fig. 1). Each mutant receptor was transiently expressed in COS-7 cells. To assess the conservation of the overall conformation of these receptors after the substitutions, the pharmacological parameters of the equilibrium binding of the radiolabeled ligand <sup>125</sup>I-U-II ( $K_d$  and  $B_{max}$ ) were determined (Tables 1 and 2). Most mutant receptors exhibited high binding affinity for <sup>125</sup>I-U-II, similar to that of the wild-type UT receptor. TMD6 mutants L267C<sup>(6.43)</sup>, P274C<sup>(6.50)</sup>, F275C<sup>(6.51)</sup>, Q279C<sup>(6.55)</sup>, and L281C<sup>(6.57)</sup>, and TMD7 mutants N299C<sup>(7.35)</sup>, P314C<sup>(7.50)</sup>, L316C<sup>(7.52)</sup>, and L319C<sup>(7.55)</sup> did not demonstrate any detectable binding activity and were not used for the SCAM analyses.

### *3.2 Effect of extracellularly added MTSEA on the binding properties of TMD6 and TMD7 mutant receptors*

To verify whether the reporter cysteines introduced into either TMD6 or TMD7 were oriented toward the binding pocket, cells expressing the UT mutant receptors were treated with 0.5 mM to 2 mM MTSEA for 3 min. We first verified whether the wild-type UT receptor, which contains six endogenous cysteines (Fig. 1), was sensitive to MTSEA treatment and found that the various concentrations had very little effect (no more than a 10% reduction at high concentrations) on the binding properties of the wild-type UT receptor. This indicated that the endogenous cysteines made a relatively small contribution to the formation of the binding-site pocket of UT



**Figure 1. Schematic representation of the rat UT receptor.**

The numbers indicate the positions of cysteines and other residues in the receptor.

The grey closed circles represent cysteines that are thought to be linked via disulfide

bridges, and the black closed circles represent cysteines whose side chains do not

form a disulfide bridge. Mutated TMD6 residues are located between Lys256<sup>(6.32)</sup> and

Leu283<sup>(6.59)</sup> inclusively. Mutated TMD7 residues / located between Lys295<sup>(7.31)</sup> and

Leu321<sup>(7.57)</sup> inclusively. Putative Asn-glycosylation sites (N4, N176, N188) are

indicated.

**Table 1. Binding properties of U-II to Cysteine-Substituted rUT TMD6 Mutant****Receptors**

	<b>K<sub>d</sub> (nM)</b>	<b>B<sub>max</sub> (pmol / mg protein)</b>	<b>n</b>
<b>rUT</b>	<b>3.1 ± 0.5</b>	<b>30.6 ± 7.4</b>	<b>6</b>
<b>Q283C</b>	<b>1.6 ± 1.4</b>	<b>21.9 ± 17.4</b>	<b>3</b>
<b>A282C</b>	<b>3.0 ± 0.3</b>	<b>23.5 ± 7.28</b>	<b>4</b>
<b>L280C</b>	<b>2.5 ± 1.2</b>	<b>2.5 ± 0.4</b>	<b>3</b>
<b>W278C</b>	<b>4.8 ± 0.4</b>	<b>15.3 ± 5.9</b>	<b>3</b>
<b>L277C</b>	<b>3.2 ± 0.4</b>	<b>21.8 ± 8.7</b>	<b>3</b>
<b>W276C</b>	<b>2.7 ± 0.8</b>	<b>2.51 ± 0.2</b>	<b>3</b>
<b>L273C</b>	<b>3.9 ± 1.5</b>	<b>20.8 ± 5.4</b>	<b>3</b>
<b>F272C</b>	<b>10.6 ± 3.0</b>	<b>15.9 ± 10.2</b>	<b>3</b>
<b>A270C</b>	<b>2.6 ± 0.4</b>	<b>17.0 ± 5.9</b>	<b>3</b>
<b>W269C</b>	<b>0.9 ± 0.2</b>	<b>5.5 ± 4.1</b>	<b>3</b>
<b>F268C</b>	<b>4.5 ± 1.0</b>	<b>0.6 ± 0.3</b>	<b>3</b>
<b>L266C</b>	<b>3.3 ± 0.4</b>	<b>28.4 ± 4.0</b>	<b>3</b>
<b>V265C</b>	<b>2.3 ± 0.8</b>	<b>15.5 ± 6.9</b>	<b>3</b>
<b>I264C</b>	<b>2.2 ± 0.3</b>	<b>17.6 ± 4.5</b>	<b>3</b>
<b>G263C</b>	<b>5.1 ± 2.2</b>	<b>23.0 ± 10.6</b>	<b>3</b>
<b>L262C</b>	<b>1.0 ± 0.4</b>	<b>4.7 ± 3.5</b>	<b>3</b>
<b>I261C</b>	<b>0.6 ± 0.3</b>	<b>5.2 ± 2.1</b>	<b>3</b>
<b>L260C</b>	<b>4.4 ± 1.1</b>	<b>29.9 ± 10.4</b>	<b>3</b>
<b>Y259C</b>	<b>3.4 ± 1.2</b>	<b>26.1 ± 4.8</b>	<b>3</b>
<b>L258C</b>	<b>3.1 ± 1.4</b>	<b>24.2 ± 3.7</b>	<b>3</b>
<b>V257C</b>	<b>3.0 ± 0.8</b>	<b>23.2 ± 8.6</b>	<b>3</b>
<b>R256C</b>	<b>3.3 ± 0.8</b>	<b>15.6 ± 10.5</b>	<b>3</b>

Cells transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Experimental Procedure. Binding affinities (K<sub>d</sub>) and maximal binding capacities (B<sub>max</sub>) are expressed as the means ± SD of values obtained in *n* independent experiments performed in duplicate. Mutants L267C, P274C, F275C, Q279C, and L281C did not exhibit any detectable binding.

**Table 2. Binding properties of U-II to Cysteine-Substituted rUT TMD7 Mutant****Receptors**

	<b>K<sub>d</sub> (nM)</b>	<b>B<sub>max</sub> (pmol / mg protein)</b>	<b>n</b>
<b>rUT</b>	<b>3.1 ± 0.5</b>	<b>30.6 ± 7.4</b>	<b>6</b>
<b>A295C</b>	<b>7.0 ± 2.8</b>	<b>27.2 ± 3.0</b>	<b>3</b>
<b>R296C</b>	<b>5.3 ± 1.6</b>	<b>27.4 ± 18.2</b>	<b>3</b>
<b>I297C</b>	<b>5.5 ± 0.6</b>	<b>28.6 ± 4.2</b>	<b>3</b>
<b>V298C</b>	<b>4.2 ± 2.0</b>	<b>11.4 ± 9.7</b>	<b>3</b>
<b>Y300C</b>	<b>8.1 ± 5.2</b>	<b>43.8 ± 2.6</b>	<b>3</b>
<b>L301C</b>	<b>4.0 ± 1.1</b>	<b>37.8 ± 2.5</b>	<b>3</b>
<b>T302C</b>	<b>7.0 ± 2.4</b>	<b>34.4 ± 2.0</b>	<b>3</b>
<b>T303C</b>	<b>3.1 ± 0.9</b>	<b>25.6 ± 12.0</b>	<b>3</b>
<b>L305C</b>	<b>3.5 ± 0.5</b>	<b>21.3 ± 3.2</b>	<b>3</b>
<b>T306C</b>	<b>3.6 ± 0.4</b>	<b>48.3 ± 1.9</b>	<b>3</b>
<b>Y307C</b>	<b>6.1 ± 3.5</b>	<b>10.3 ± 4.3</b>	<b>3</b>
<b>G308C</b>	<b>2.2 ± 1.0</b>	<b>5.0 ± 4.9</b>	<b>3</b>
<b>N309C</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>17.9 ± 0.7</b>	<b>3</b>
<b>S310C</b>	<b>4.5 ± 1.0</b>	<b>36.7 ± 9.9</b>	<b>3</b>
<b>I312C</b>	<b>4.8 ± 1.8</b>	<b>41.0 ± 9.3</b>	<b>3</b>
<b>N313C</b>	<b>1.9 ± 0.7</b>	<b>7.3 ± 5.5</b>	<b>3</b>
<b>F315C</b>	<b>3.9 ± 0.5</b>	<b>42.9 ± 3.1</b>	<b>3</b>
<b>Y317C</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>12.4 ± 1.3</b>	<b>3</b>
<b>T318C</b>	<b>14.7 ± 2.2</b>	<b>28.2 ± 1.3</b>	<b>3</b>
<b>L320C</b>	<b>0.9 ± 0.2</b>	<b>16.6 ± 0.8</b>	<b>3</b>
<b>T321C</b>	<b>4.7 ± 1.1</b>	<b>26.3 ± 1.9</b>	<b>3</b>

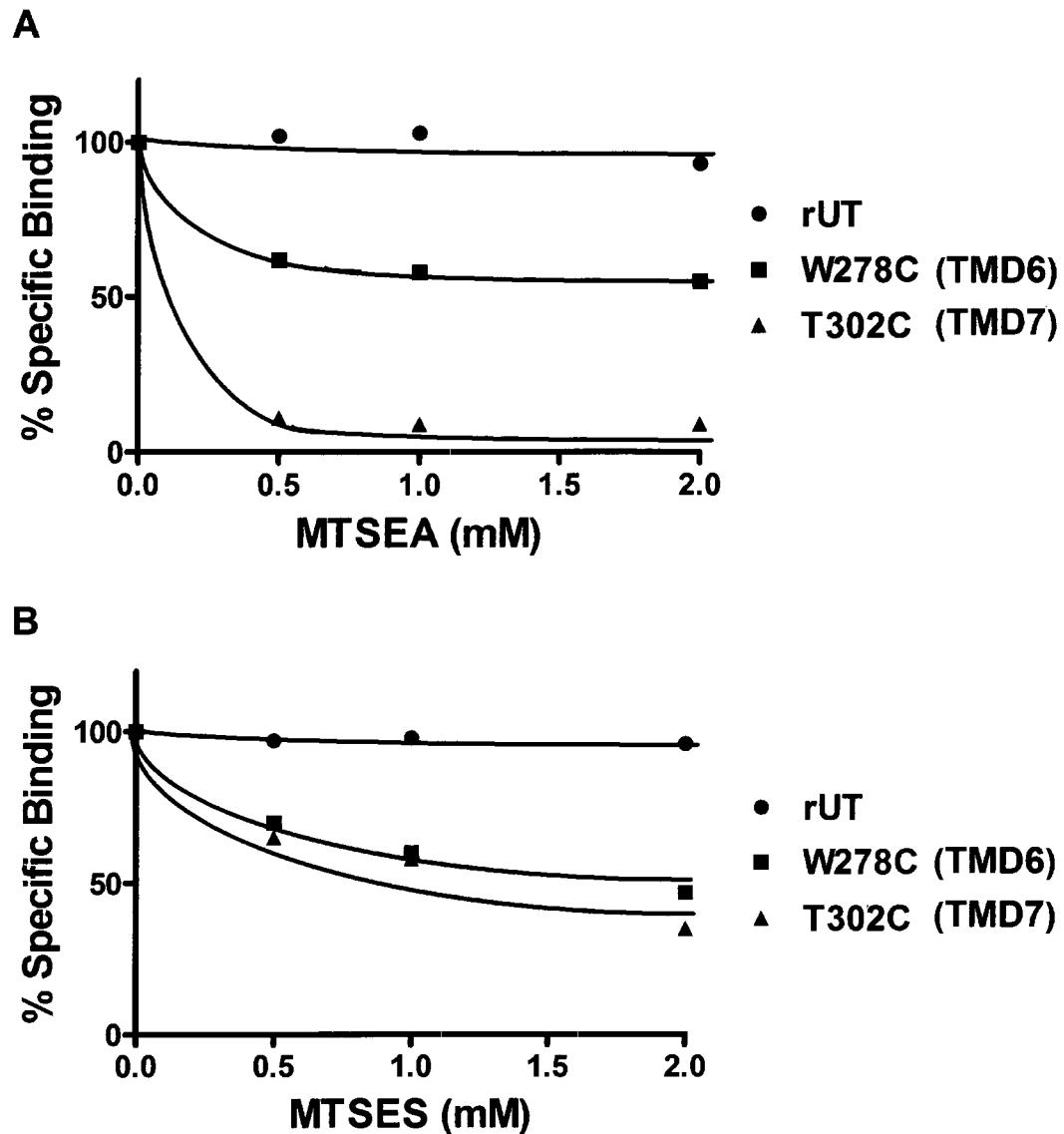
Cells transfected with the appropriate receptor were assayed as described in the Experimental Procedure. Binding affinities (K<sub>d</sub>) and maximal binding capacities (B<sub>max</sub>) are expressed as the means ± SD of values obtained in *n* independent experiments performed in duplicate. Mutants N299C, N314C, L316C, and L319C did not exhibit any detectable binding.



(Fig. 2A). For TMD6 mutants, figure 3 shows that treatment with 0.5 mM MTSEA strongly inhibited the U-II binding properties of mutant W278C<sup>(6.54)</sup> (binding inhibition of 56%). At 2 mM MTSEA, the binding properties of another mutant, F268C<sup>(6.44)</sup>, was significantly inhibited (binding inhibition of 38%). For TMD7 mutants, figure 4 shows that treatment with 0.5 mM MTSEA strongly inhibited the U-II binding properties of three mutants: V298C<sup>(7.34)</sup> (binding inhibition of 45%), T302C<sup>(7.38)</sup> (binding inhibition of 73%), and T303C<sup>(7.39)</sup> (binding inhibition of 69%). The binding properties of all other TMD6 or TMD7 mutant receptors were not significantly affected by MTSEA treatment.

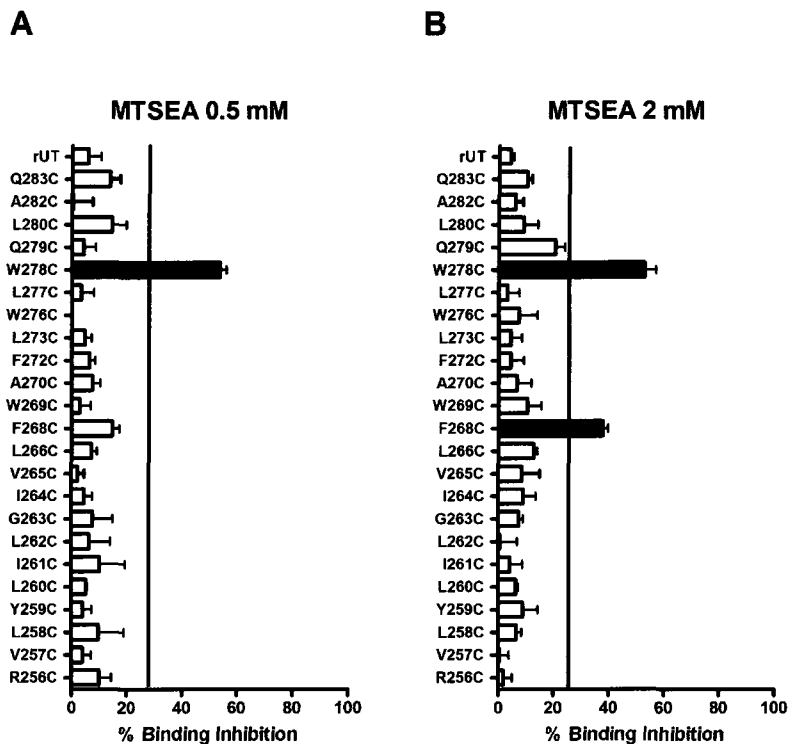
### *3.3 Effect of extracellularly added MTSES on the binding properties of TMD6 and TMD7 mutant receptors*

Alkylation with MTS reagents may hamper the binding of the ligand in a mechanism involving steric hindrance, electrostatic repulsion, or a combination of both. As an alternative method to the use of a positively charged MTS compound (MTSEA), we treated each mutant receptor with the negatively charged alkylating agent MTSES for 3 min. MTSES had very little effect on the binding properties of the wild-type UT receptor (no more than a 5% reduction at high concentrations) (Fig. 2B). For TMD6, similar to the effects observed with MTSEA, treatment with 2 mM MTSES (Fig. 5) inhibited the binding properties of TMD6 mutants F268C<sup>(6.44)</sup> (binding inhibition of 23%) and W278C<sup>(6.54)</sup> (binding inhibition of 51%). Interestingly, MTSES treatment led to the significant inhibition in binding properties of an additional mutant receptor, namely A282C<sup>(6.58)</sup> (binding inhibition of 37%) not affected by MTSEA treatment.



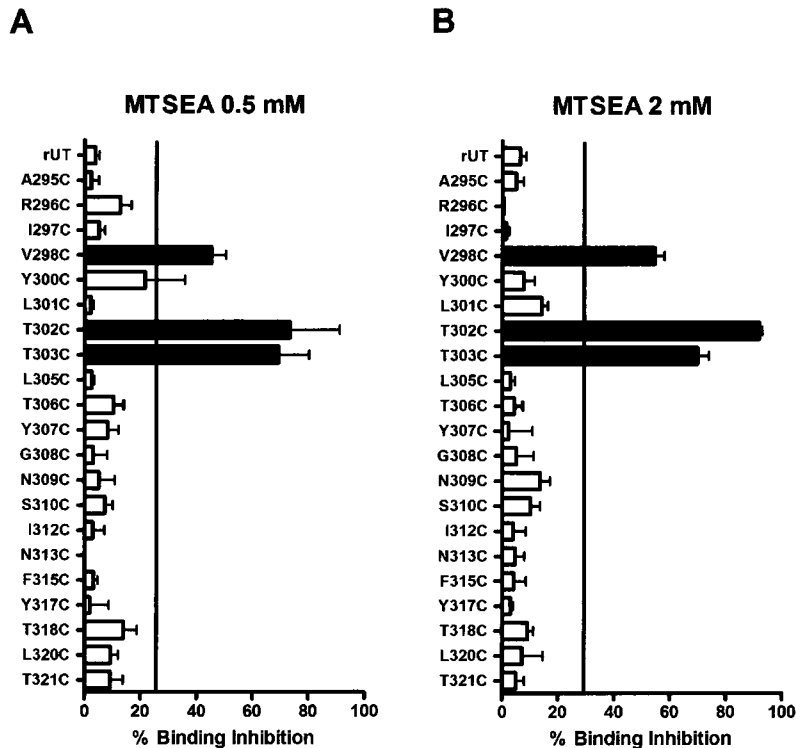
**Figure 2. Effect of MTS on the wild-type receptor and sensitive reporter cysteine-bearing mutant receptors.**

Intact COS-7 cells transiently expressing the rUT, W278C, and T302C receptors were incubated with MTSEA (A) or MTSES (B) in a final volume of 0.2 ml at room temperature for 3 min. The reaction was stopped by dilution in ice-cold PBS. The intact cells were then incubated with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II for 120 min at room temperature. The results are representative of three independent experiments.



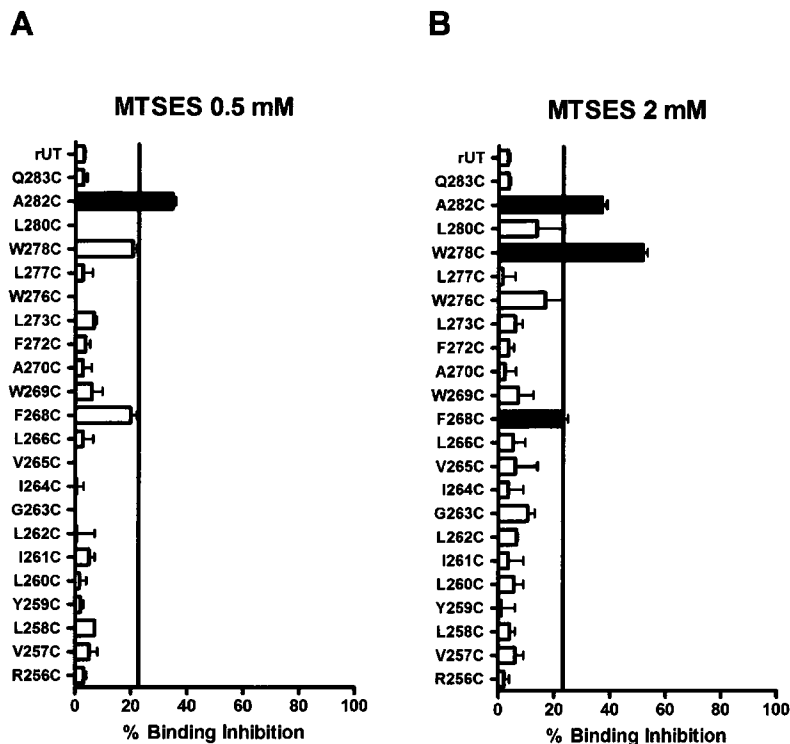
**Figure 3. Effects of MTSEA on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD6.**

Intact COS-7 cells transiently expressing wild-type or TMD6 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 120 min at room temperature with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.



**Figure 4. Effect of MTSEA on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD7.**

Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TMD7 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 120 min at room temperature with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants. It was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to that of the wild type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.



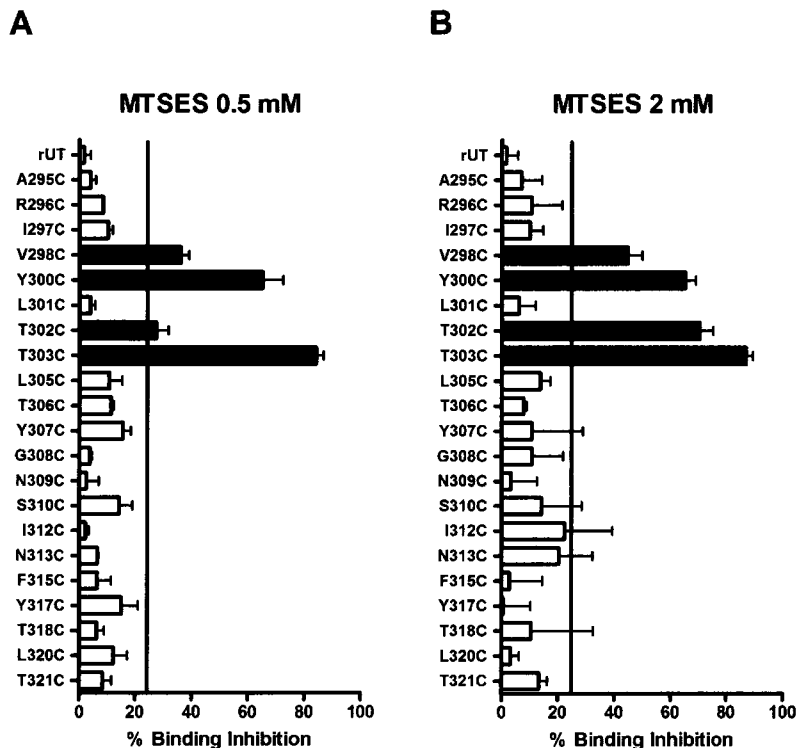
**Figure 5. Effects of MTSES on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD6.**

Intact COS-7 cells transiently expressing wild-type or TMD6 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with freshly prepared 0.5 mM MTSES (A) or 2 mM MTSES (B). The intact cells were then incubated for 120 min at room temperature with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSES treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSES treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.

For TMD7, mutants V298C<sup>(7.34)</sup> (binding inhibition of 45%), T302C<sup>(7.38)</sup> (binding inhibition of 70%) and T303C<sup>(7.39)</sup> (binding inhibition of 87%) were also robustly inhibited by treatment with 2 mM MTSES (Fig. 6). Again an additional mutant receptor not detected with MTSEA, Y300C<sup>(7.36)</sup>, was significantly inhibited (binding inhibition of 65%) when treated with 0.5 mM MTSES (as well as 2 mM MTSES). The binding properties of all other mutant receptors were not significantly affected by MTSES treatment.

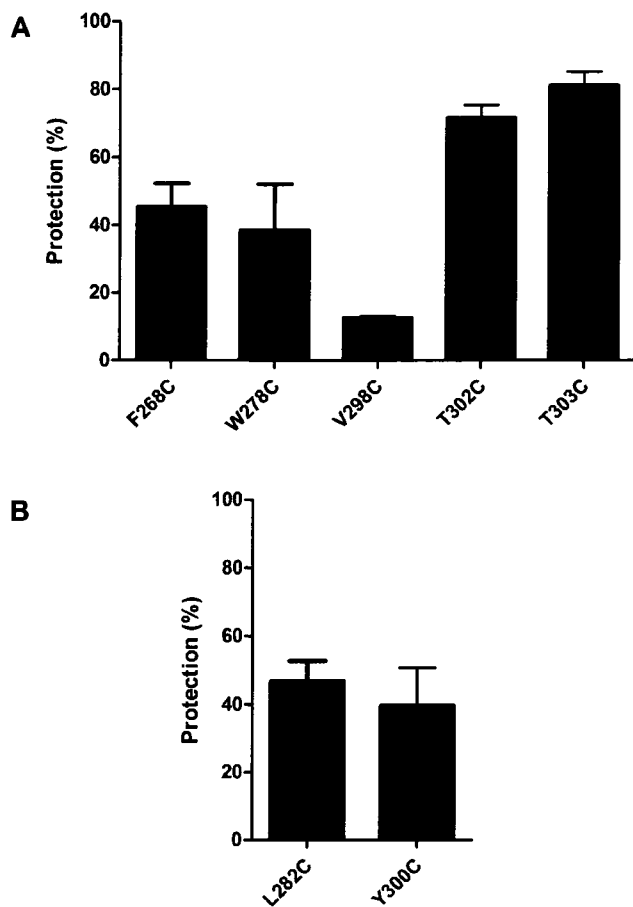
#### *3.4 Protection against MTS reagents by a pretreatment with U-II*

To confirm that reporter cysteines accessible to MTSEA or MTSES were indeed located within the binding pocket of the UT receptor, mutants were incubated with the competitive ligand, U-II, prior to MTS treatment. Cells were then washed with an acid buffer to dissociate the bound ligand, and the receptors were assayed for binding with the radiolabeled competitive ligand. Pre-incubation with the ligand protected mutant receptors F268C<sup>(6.44)</sup>, W278C<sup>(6.54)</sup>, T302C<sup>(7.38)</sup>, and T303C<sup>(7.39)</sup> from the inhibitory effect of MTSEA, with protection levels ranging from 38% to 81% (Fig. 7A), but only provided 13% protection for mutant V298C<sup>(7.34)</sup>. Pre-incubation with U-II protected mutant receptors A282C<sup>(6.58)</sup> and T300C<sup>(7.36)</sup> from the inhibitory effect of MTSES, with protection levels of 47% and 40%, respectively (Fig. 7B). It should be noted that the pre-incubation with U-II also protected mutants F268C<sup>(6.44)</sup>, W278C<sup>(6.54)</sup>, V298C<sup>(7.34)</sup>, and T302C<sup>(7.38)</sup>, and T303C<sup>(7.39)</sup> from the effects of MTSES (data not shown).



**Figure 6. Effect of MTSES on UT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TMD7.**

Intact COS-7 cells transiently expressing wild-type or TMD7 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSES (A) or 2 mM MTSES (B). The intact cells were then incubated for 120 min at room temperature with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants. It was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to that of the wild-type receptor after MTSES treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSES treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.



**Figure 7. UT protection of MTSEA-sensitive receptor mutants.**

Intact COS-7 cells transiently expressing the indicated MTSEA-sensitive (A) or MTSES-sensitive (B) mutant rUT receptors were pre-incubated for 1 h at 16°C in the absence or presence of 100nM U-II. The cells were then incubated for 3 min at 16°C in the continued absence or presence of U-II with optimal MTSEA or MTSES concentrations to achieve maximal binding inhibition of each receptor. The MTS reagent concentrations were as follows: 2.0 mM for mutants L268C and W278C, 0.5 mM for mutants A282C, L298C, Y300C, T302C and T303C. The cells were then washed with ice-cold PBS and incubated for 3 h at 16°C with 0.05 nM  $^{125}\text{I}$ -U-II. The degree of protection was calculated as described in Materials and Methods. Bars represent the mean  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.



#### 4. DISCUSSION

The rationale of this study, which relied on SCAM analyses, was to gain an insight into the orientation of TMD6 and TMD7 residues of the UT receptor by identifying residues accessible to MTS reagents within its binding-site pocket. Since water-accessible ionized thiolates react 109 faster than un-ionized thiols [22], only water-accessible cysteines should be alkylated by MTS reagents. Ligand binding is likely hampered by MTS compounds via mechanisms involving steric hindrance, electrostatic repulsion, or indirect interaction. The tracer peptide used in our study was the full-length agonist of the wild-type UT receptor since we felt that it would enable us to identify determinants that might otherwise be missed with smaller peptide or non-peptide UT ligands.

The rat U-II receptor has six endogenous cysteines, two of which are thought to be involved in the putative disulfide bridge linking ECL1 and ECL2. Of the four remaining endogenous cysteines, one is located in TMD6 (C271<sup>(6,47)</sup>) and two are located in TMD7 (C304<sup>(7,40)</sup> and C311<sup>(7,47)</sup>). The wild-type UT receptor is insensitive to both MTSEA and MTSES at concentrations up to 6 mM (Fig. 2 and data not shown). This suggests that endogenous cysteines are not alkylated by MTS reagents or that alkylation does not affect ligand binding. Our approach of adding the MTS reagent to whole adherent cells expressing the UT receptor essentially exposed only the extracellular, ligand-accessible side of the receptor.

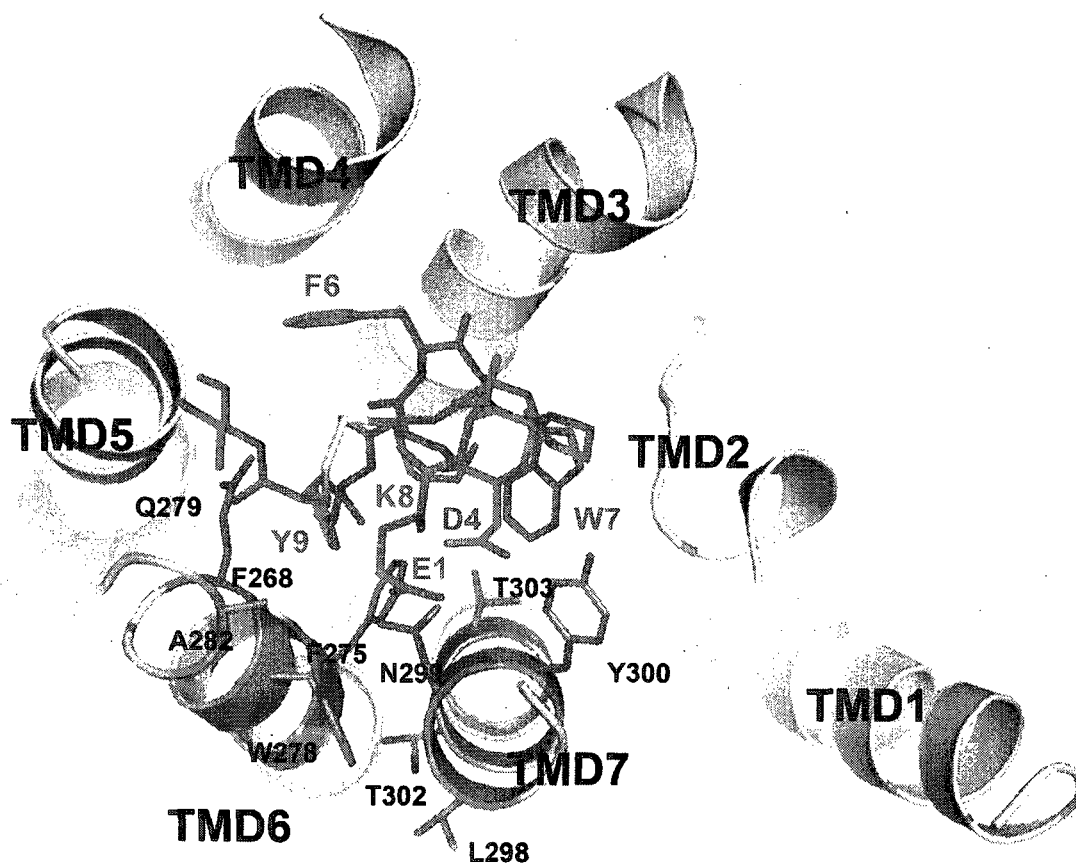
Using MTSEA and MTSES, we identified three sensitive residues in TMD6, two at the top of the domain (W278<sup>(6.54)</sup> and A282<sup>(6.58)</sup>) and one in the middle portion of the domain (F268<sup>(6.44)</sup>). Residue A282<sup>(6.58)</sup> was sensitive to negatively charged MTSES but not to positively charged MTSEA. This would be due to an electrostatic repulsion effect caused by the proximity of a negatively charged determinant in the vicinity of A282<sup>(6.58)</sup>, which would be located either in the receptor, thus affecting local receptor conformation, or in the ligand, thus affecting binding. We also demonstrated that L267C<sup>(6.43)</sup>, P274C<sup>(6.50)</sup>, F275C<sup>(6.51)</sup>, Q279C<sup>(6.55)</sup>, and L281C<sup>(6.57)</sup> lost their ability to bind U-II. Since position 6.50 is the structurally critical proline residue of TMD6, the loss of binding by the P274C<sup>(6.50)</sup> mutant was not surprising. Positions 6.51 and 6.55 are critical binding-site residues in a number of GPCRs [7, 19, 27, 34].

We identified four sensitive residues (L298<sup>(7.34)</sup>, Y300<sup>(7.36)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup>, and T303<sup>(7.39)</sup>) in TMD7 that are proximal to the extracellular side of the TMD. Unlike other receptors that we and others have studied using the SCAM approach, we were unable to detect sensitive residues deeper in TMD7 than T303<sup>(7.39)</sup> [3, 17, 35]. Y300<sup>(7.36)</sup> was sensitive to MTSES but not MTSEA, which again suggests that a negatively charged determinant is present in the vicinity of this residue. We also showed that N299C<sup>(7.35)</sup>, P314C<sup>(7.50)</sup>, L316C<sup>(7.52)</sup>, and L319C<sup>(7.55)</sup> lost their ability to bind U-II. Residues P314<sup>(7.50)</sup> and L316<sup>(7.52)</sup> are part of the well-conserved NPxxY motif of TMD7 that is thought to participate in a network of interactions that either maintains the receptor in an inactive state or helps stabilize the active state [33]. With

the exception of the L298C<sup>(7.34)</sup> mutant, the competitive U-II ligand protected all mutants tested in the protection assay, supporting the notion that these sensitive amino acids are located in the binding pocket. L298C<sup>(7.34)</sup> was poorly protected by U-II, suggesting that alkylation of this residue inhibits binding via a mechanism involving an indirect interaction with the receptor.

To assess the relative positions of the residues identified in the binding pocket of rUT, we modeled the U-II/rUT receptor complex by homology with the  $\beta$ 2 adrenergic receptor crystal structure [7]. The complex was modeled using the distance restraints determined in previous photolabeling studies [4, 18] to correctly position U-II in the receptor binding pocket (Figure 8). When the complex was minimized with defined distance restraints, the structure of docked U-II had an RMSD (backbone atoms) value of 2.4 Å compared with the initial U-II structure, while the rUT transmembrane domains had an RMSD (backbone atoms) value of 0.6 Å compared the initial model, indicating that the structures of both the ligand and the receptor had changed very little during the docking process. In our model, the residues making up the pharmacophore of U-II (W7, K8 and Y9) were well oriented in a binding pocket formed by the transmembrane domains of rUT.

The model in figure 8 shows that residue F268<sup>(6.44)</sup> is well positioned toward the interior of the transmembrane bundle and is deep inside the pocket relative to the other MTS-sensitive residues. In rhodopsin, the analogous F261<sup>(6.44)</sup> residue contacts the retinal ligand [27], whereas mutation of F282<sup>(6.44)</sup> of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor



**Figure 8. Molecular model of rUT receptor.**

An extracellular view of the seven TMDs of the rUT receptor based on the model described for the  $\beta 2$  adrenergic receptor (CHEREZOV *et al*, 2007). The water-accessible crevice forming the binding pocket is suggested to be located between TMDs 1, 2, 3, 5, 6, and 7. In the ground state, constraining intramolecular interactions help maintain the receptor in a basal state where functional coupling with the G-protein is kept to a minimum. The U-II ligand is shown in green. MTS positive residues F268<sup>(6.44)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup>, A282<sup>(6.58)</sup>, L298<sup>(7.34)</sup>, Y300<sup>(7.36)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup>, and T303<sup>(7.39)</sup> are indicated in blue. Residues F275<sup>(6.51)</sup>, Q279<sup>(6.55)</sup>, and N299<sup>(7.35)</sup>, where cysteine substitution caused loss of binding, are indicated in red. The conserved 'toggle switch' residue F272<sup>(6.48)</sup> is shown in yellow.

results in various degrees of constitutive activity [6], indicating that position 6.44 is also important for activation. SCAM analyses [25] and Methionine Proximity Assays [8] have shown that residue F249<sup>(6.44)</sup> is located in the binding pocket of the AT<sub>1</sub> receptor. This position in class A GPCRs F268<sup>(6.44)</sup> is located one helical turn below residue F272<sup>(6.48)</sup>, the hypothesized ‘rotamer toggle switch’ in the CW/FLP motif [32]. F272<sup>(6.48)</sup> was not detected as an MTS sensitive residue using SCAM, but affinity of U-II towards the F272C<sup>(6.48)</sup> mutant was slightly reduced when compared to wild-type UT receptor (Table 1).

The model also reveals that residue W278<sup>(6.54)</sup> is proximal to the MTS-sensitive residues A282<sup>(6.58)</sup>, V298<sup>(7.34)</sup>, and T302<sup>(7.38)</sup>. SCAM studies have shown that this position in the D2 receptor [17] and the  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  opioid receptors [36] are also sensitive to MTS. Our model also shows that A282<sup>(6.58)</sup> is positioned toward the helical bundle and is in close proximity to residues W278<sup>(6.54)</sup> and N299<sup>(7.35)</sup>. Residues F275 and Q279 are located in the binding pocket, even though we were unable to obtain SCAM sensitivity due to the lack of binding of the F275C<sup>(6.51)</sup> and Q279C<sup>(6.55)</sup> mutant receptors to U-II. Residue F275<sup>(6.51)</sup> is in close proximity to the critical residues W7, K8, and Y9 of U-II. There is a similar interaction between position 6.51 and the ligand in rhodopsin and the  $\beta$ 2 adrenergic receptor [7, 27]. Residue Q279<sup>(6.55)</sup> is proximal to Y9 of U-II, and analogous interactions can be found in the  $\beta$ 1 adrenergic and A<sub>2A</sub> adenosine receptors [19, 34]. It is thus likely that residues F275C<sup>(6.51)</sup> and Q279C<sup>(6.55)</sup> are located in the binding pocket of the UT receptor.

As for the MTS-sensitive residues in TMD7, our model shows that MTSES-sensitive residue Y300<sup>(7.36)</sup> faces the binding pocket. This residue is located one helical turn above residue T303<sup>(7.39)</sup> and may be involved in  $\pi$  stacking or hydrogen bonding with W7 of U-II. Furthermore, residue T302<sup>(7.38)</sup> is oriented toward TMD6 and is in proximity to residues F275<sup>(6.51)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup>, and V298<sup>(7.34)</sup>. Studies on the D2 receptor using the SCAM approach [17] and on the A1 adenosine receptor [12] have shown that this position faces the binding pocket of the respective receptors. The model also directs residue T303<sup>(7.39)</sup> toward the binding pocket and places it close to residues F275<sup>(6.51)</sup> and Y300<sup>(7.36)</sup>. Residue T303<sup>(7.39)</sup> is in close proximity to the pharmacophoric residues W7 and K8 of U-II, which is in agreement with SCAM studies of the D2 [17], the A1 adenosine, and the  $\kappa$  and  $\delta$  opioid [35] receptors showing that position 7.39 faces the binding pocket of these GPCRs. Moreover, the crystal structure of the A2A adenosine receptor has revealed that I274<sup>(7.39)</sup> interacts directly with ZM241385, an A2A/A2B antagonist [19]. While the N299C<sup>(7.35)</sup> mutant receptor was unable to bind U-II and could not be used for SCAM studies, the model shows N299<sup>(7.35)</sup> to be facing the helix bundle, enabling it to lie in close proximity to W278<sup>(6.54)</sup> and residues W7 and K9 of U-II. In both the  $\beta$ 2 adrenergic and A2A crystal structures, this position interacts with the cognate ligands of the receptors [7, 19].

It should be noted that several SCAM-positive residues, residues F268<sup>(6.44)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup> and T303<sup>(7.39)</sup>, show  $k_d$  values unchanged from the wild-type UT receptor. At first glance, this would suggest that introduction of cysteine residues at these

positions does not disturb the structure of the receptor. Upon inspection of the molecular model, we note that the cysteine side-chains at these positions are within the binding site (Fig. 8) and hence fully accessible for alkylation, thereby affecting the binding of the ligand. Hence, it is the alkylation with the MTS reagents and presence in the binding pocket, not the nature of the side chain, which would reduce binding.

Our results indicate that the V298C<sup>(7.34)</sup> mutant is MTSEA sensitive and that pre-incubating this mutant with U-II prior to the MTS treatment did not have a protective effect. In our model, even though V298<sup>(7.34)</sup> faces the exterior of the helix bundle, the residue is in close proximity to other MTSEA-sensitive residues such as W278<sup>(6.54)</sup> and T302<sup>(7.38)</sup>. One explanation for the sensitivity of V298<sup>(7.34)</sup> to MTSEA is that it is involved in a network of interactions that are critical for receptor stability and ligand recognition. This network may involve other proximal MTS-sensitive residues such as W278<sup>(6.54)</sup>, A282<sup>(6.58)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup>, and N299<sup>(7.35)</sup> and could be destabilized following MTSEA or MTSES treatment of the V298C<sup>(7.34)</sup> mutant. Lastly, the binding inhibition observed for the A282C<sup>(6.58)</sup> and Y300C<sup>(7.36)</sup> following MTSES treatment may be due to charge repulsion between the negatively charged alkylated cysteines and the side chains of either E1 or D4 originating from the U-II ligand.

In conclusion, we identify specific residues in TMD6 and TMD7 that participate in the formation of the binding pocket of the UT receptor. Our results suggest that the UT binding pocket shares many similarities with those of previously

described class A GPCRs. The model generated from our results also indicates that residue W278<sup>(6.54)</sup> may be a focal point of interactions involving many of the residues identified in the present study. This network of interactions may be a distinctive feature of the UT binding pocket.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. R.L. is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. E.E. is recipient of the J.C. Edwards Chair in Cardiovascular Research.



**REFERENCES**

- [1] Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 1992;258:307-10.
- [2] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282-6.
- [3] Boucard AA, Roy M, Beaulieu ME, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, et al. Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J Biol Chem* 2003;278:36628-36.
- [4] Boucard AA, Sauve SS, Guillemette G, Escher E, Leduc R. Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem J* 2003;370:829-38.
- [5] Carotenuto A, Grieco P, Campiglia P, Novellino E, Rovero P. Unraveling the active conformation of urotensin II. *J Med Chem* 2004;47:1652-61.
- [6] Chen S, Lin F, Xu M, Riek RP, Novotny J, Graham RM. Mutation of a single TMVI residue, Phe(282), in the beta(2)-adrenergic receptor results in structurally distinct activated receptor conformations. *Biochemistry* 2002;41:6045-53.
- [7] Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007;318:1258-65.
- [8] Clement M, Martin SS, Beaulieu ME, Chamberland C, Lavigne P, Leduc R, et al. Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay. *J Biol Chem* 2005;280:27121-9.
- [9] Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihmann I. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 1999;457:28-32.
- [10] Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15803-8.
- [11] Dauber-Osguthorpe P, Roberts VA, Osguthorpe DJ, Wolff J, Genest M, Hagler AT. Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 1988;4:31-47.
- [12] Dawson ES, Wells JN. Determination of amino acid residues that are accessible from the ligand binding crevice in the seventh transmembrane-spanning region of the human A(1) adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 2001;59:1187-95.
- [13] DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA: Delano Scientific; 2002.
- [14] Desai N, Sajjad J, Frishman WH. Urotensin II: a new pharmacologic target in the treatment of cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 2008;16:142-53.
- [15] Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:159-67.

- [16] Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-57.
- [17] Fu D, Ballesteros JA, Weinstein H, Chen J, Javitch JA. Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 1996;35:11278-85.
- [18] Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E, Leduc R. Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* 2007;402:51-61.
- [19] Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, et al. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* 2008.
- [20] Javitch JA, Ballesteros JA, Weinstein H, Chen J. A cluster of aromatic residues in the sixth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor is accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 1998;37:998-1006.
- [21] Javitch JA, Li X, Kaback J, Karlin A. A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10355-9.
- [22] Javitch JA, Shi L, Liapakis G. Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol* 2002;343:137-56.
- [23] Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, et al. Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002;41:2940-4.
- [24] Martin SS, Boucard AA, Clement M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. Analysis of the third transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 2004;279:51415-23.
- [25] Martin SS, Holleran BJ, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method. *Mol Pharmacol* 2007;72:182-90.
- [26] Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:65-75.
- [27] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739-45.
- [28] Papadopoulos P, Bousette N, Giaid A. Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* 2008;29:764-9.
- [29] Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 2008;454:183-7.
- [30] Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS, et al. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:5021-4.
- [31] Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 2008;29:691-9.

- [32] Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:481-519.
- [33] Smit MJ, Vischer HF, Bakker RA, Jongejan A, Timmerman H, Pardo L, et al. Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:53-87.
- [34] Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2008;454:486-91.
- [35] Xu W, Campillo M, Pardo L, Kim de Riel J, Liu-Chen LY. The seventh transmembrane domains of the delta and kappa opioid receptors have different accessibility patterns and interhelical interactions. *Biochemistry* 2005;44:16014-25.
- [36] Xu W, Li J, Chen C, Huang P, Weinstein H, Javitch JA, et al. Comparison of the amino acid residues in the sixth transmembrane domains accessible in the binding-site crevices of mu, delta, and kappa opioid receptors. *Biochemistry* 2001;40:8018-29.

## DISCUSSION

Les GPCRs représentent la plus importante famille de protéines exprimées chez l'humain avec quelques 900 membres (FREDRIKSSON et SCHIOTH, 2005). De ceux-ci, les GPCRs de la classe A forment la plus importante sous-famille de GPCRs, avec près de 300 membres. ([www.iupharbb.org/receptorList/results.php](http://www.iupharbb.org/receptorList/results.php)). Ces récepteurs lient et sont activés par une grande diversité de ligands de tailles différentes, allant du proton H<sup>+</sup> jusqu'aux grosses glycoprotéines. Ils sont aussi responsables d'un grand nombre de processus biologiques importants pour maintenir l'homéostasie générale de l'organisme et leur dysfonctionnement peut mener à plusieurs maladies (SMIT *et al*, 2007). Par conséquent, les GPCRs forment des cibles thérapeutiques importantes alors que plus de 25% des médicaments sur le marché ciblent les GPCRs de classe A (OVERINGTON *et al*, 2006). Les maladies du système cardiovasculaire sont parmi les causes principales de mortalité dans le monde occidental. Les GPCRs impliqués dans ce système sont donc considérés comme des cibles d'intervention importantes. Conséquemment, l'identification des déterminants moléculaires impliqués dans la reconnaissance bi-moléculaire entre ligand et récepteur fait donc l'objet d'études majeures.

Il est maintenant établi que l'urotensine II peut jouer un rôle dans la régulation physiologique du système cardiovasculaire chez les mammifères, y compris chez l'humain (DOUGLAS *et al*, 2004). Aussi, de nombreuses études montrent l'implication du système U-II dans le développement de pathophysiologies chez l'humain, incluant celles qui touchent le système cardiovasculaire (ONG *et al*, 2005). Ces observations ont donc conduit plusieurs groupes de recherche, dont le nôtre, à

s'intéresser au système U-II/UT. Une meilleure compréhension des mécanismes par lequel l'U-II peut reconnaître et lier son récepteur UT serait utile pour développer des ligands plus puissants, plus sélectifs et avec des propriétés pharmacologiques adéquates pour une intervention plus ciblée lors de dysfonctionnements liés au système U-II/UT.

Au cours de mes études doctorales, j'ai caractérisé la pochette de liaison du récepteur UT, dans le but de mieux comprendre son mécanisme de liaison et d'activation et pour établir un schéma d'interaction hormone-récepteur pour les GPCRs à ligand peptidique. La façon la plus directe pour atteindre cet objectif est de déterminer la structure tridimensionnelle du récepteur UT en complexe avec l'U-II par cristallographie et diffraction aux rayons X. Une telle structure permettrait de directement visualiser les points de contacts entre ligand et récepteur et pourrait amener de l'information sur les bases structurales de l'activation du récepteur. Cependant, il est encore très difficile techniquement d'obtenir des quantités suffisantes de récepteur pur et dans un état stable pour permettre la cristallisation. Ainsi la cristallisation n'est pas à la portée de la plupart des laboratoires travaillant à la caractérisation des GPCRs. Jusqu'à tout récemment, la seule structure disponible d'un GPCR était celle de la rhodopsine. Dans les dernières années, d'énormes progrès ont été réalisés dans ce domaine, ce qui a mené à la publication de nouvelles structures de GPCRs, dont les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques, l'opsine et le récepteur  $A_{2A}$  de l'adénosine (CHEREZOV *et al*, 2007; JAAKOLA *et al*, 2008; WARNE *et al*, 2008). Malgré ces avancées, il faut encore envisager des moyens

alternatifs pour obtenir de l'information pertinente sur la nature des déterminants impliqués dans la liaison et l'activation des GPCRs.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le marquage par photoaffinité pour sonder les interactions entre des analogues photosensibles de l'U-II et le récepteur UT de rat (rUT). Pour caractériser la pochette de liaison du récepteur rUT le plus complètement possible, nous avons initialement synthétisé une série d'analogues où le Bpa a été incorporé à toutes les positions du peptide U-II. Chacun de ces analogues a d'abord été testé pour sa capacité à lier le récepteur rUT. Comme on pouvait s'y attendre, la plupart des analogues qui contenaient le Bpa dans la partie C-terminale cyclique du peptide perdaient leur affinité pour le récepteur rUT et ne pouvaient être utilisés pour le marquage par photoaffinité. Une exception était l'analogue [Bpa<sup>6</sup>]U-II, qui fut utilisé dans une première étude de marquage par photoaffinité pour établir un premier point de contact entre la position 6 de l'U-II et Met288 situé dans la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur rUT (BOUCARD *et al*, 2003b). Les analogues contenant le Bpa dans les quatre premières positions de la portion N-terminale du peptide ont également conservé leur propriété de liaison au récepteur et ont tous démontré des propriétés d'agoniste complet, ce qui est en accord avec les études de structure-activité du peptide U-II (BRKOVIC *et al*, 2003; KINNEY *et al*, 2002).

Nous avons formulé l'hypothèse qu'un peptide U-II photoactivable agoniste devrait stabiliser une conformation du récepteur rUT qui est différente de celle stabilisée par un antagoniste ou un faible agoniste partiel. Suite au photomarquage du récepteur rUT avec ces analogues qui possèdent des activités intrinsèques différentes, des différences dans les patrons de photomarquage indiqueraient des différences de

conformation du récepteur. Une telle approche a été récemment utilisée pour caractériser les récepteurs CCK de la cholecystokinine et de la sécrétine (DONG *et al*, 2005a; DONG *et al*, 2006). Nous avons donc comparé les patrons de photomarquage obtenus en utilisant une série d'analogues photosensibles agonistes basée sur la séquence d'U-II native avec les patrons obtenus à partir d'agonistes partiels faibles basés sur la séquence de l'antagoniste urantide (PATACCHINI *et al*, 2003). Pour comparer les deux séries d'analogues, en particulier au niveau de la portion N-terminale, nous avons conçu une version humanisée de l'urantide qui contient les quatre premiers résidus de l'U-II humaine. Trois analogues de l'urantide humanisé contenant le Bpa dans la portion variable (positions 1 et 2) ainsi que cyclique (position 6) ont été synthétisés. L'administration de ces analogues cause une faible élévation du niveau d'IP<sub>3</sub> chez les cellules exprimant le récepteur UT, ce qui démontre que ce sont tous des agonistes partiels faibles. L'urantide a été initialement caractérisé comme un antagoniste dans des préparations d'aorte de rat (PATACCHINI *et al*, 2003). Par contre, il a été montré que l'urantide est un agoniste partiel pour le récepteur UT exprimé dans des systèmes hétérologues (CAMARDA *et al*, 2004). Les différences d'activité sont donc probablement dues à la provenance du tissu ou de la préparation membranaire exprimant le récepteur. Notre étude de photomarquage précédente a indiqué que la substitution de la phénylalanine par le Bpa au niveau de la position 6 de l'U-II ne modifie pas l'affinité de l'analogue pour le récepteur (BOUCARD *et al*, 2003b). L'analogue basé sur l'urantide humanisé contenant le Bpa en position 6 montrait une légère baisse d'affinité en comparaison avec l'U-II, mais l'affinité était suffisamment élevée pour justifier l'utilisation de

l'analogue dans notre étude de marquage par photoaffinité. Tous les analogues radioactifs photomarquent le récepteur de façon spécifique, étant donné que le marquage peut être inhibé en présence d'une forte quantité d'U-II native. Sur cette base, il est raisonnable de supposer que chaque analogue, qu'il soit agoniste complet ou partiel, adopte un mode de liaison orthostérique similaire à celui du peptide qui lui est apparenté.

À la suite de clivages chimiques et enzymatiques de complexes photomarqués obtenus à partir d'analogues qui incorporent le Bpa dans des positions N-terminales, nous avons identifié le résidu Met288 de la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire comme seul point de contact, autant pour les agonistes complets que les agonistes partiels. Bien que les études de structure-activité suggèrent que les résidus de cette portion du ligand sont moins importants pour l'affinité et l'activation du récepteur, nos résultats suggèrent que la portion N-terminale des analogues d'U-II est tout de même à proximité de la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur UT. En appui à nos résultats, Boivin et al. (2006) ont démontré de façon complémentaire par des études de résonance de plasmon de surface ainsi que par la spectroscopie RMN que la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur UT humain lie spécifiquement U-II (BOIVIN *et al*, 2006; BOIVIN *et al*, 2008). L'interaction des résidus benzophénone avec les résidus méthionine est souvent rapportée (BISELLO *et al*, 1998; BOUCARD *et al*, 2003b; KAGE *et al*, 1996). Ce type d'interaction semble être favorisé puisque le radical libre généré suite à l'activation de la benzophénone est stabilisé par un complexe de transfert de charge en présence du groupement thioester retrouvé chez la méthionine. Un tel complexe pousse l'équilibre vers la formation de produits covalents avec les



groupements méthyl ou méthylène adjacents. Un analogue qui contient une benzophénone pourrait alors être attiré vers les résidus méthionines situés à 8 Å du site de liaison (CLEMENT *et al*, 2005). À l'extérieur du rayon de Van der Waals, le Bpa pourrait tout de même se lier de façon covalente aux chaînes latérales d'autres résidus si une méthionine ne se trouve pas dans son environnement immédiat. Le photomarquage d'un résidu méthionine peut mener à deux patrons de marquage différents : le marquage  $\epsilon$  qui mène au relâchement de ligand suite au clivage par le CNBr et le marquage  $\gamma$ , qui ne mène pas au relâchement de ligand et où la méthionine n'est pas clivée du côté C-terminal (SACHON *et al*, 2002). Nos résultats montrent que le clivage CNBr donne lieu au relâchement de ligand pour les complexes de photomarquage  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>]U-II/rUT,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>4</sup>]U-II/rUT et  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II/rUT tandis que le relâchement de ligand n'est pas observé dans le cas des complexes photomarqués  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>]U-II/rUT,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>3</sup>]U-II/rUT et  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II/rUT. Nos résultats montrent que la réaction par le CNBr est difficile à compléter dans la région de Met288, ce qui peut être expliqué de deux façons. D'une part, il a été observé que des liens peptidiques contenant un résidu proline sont difficiles à cliver (le résidu 289 est une proline), d'autre part la proximité de l'attachement du ligand au résidu Met288 pourrait restreindre la formation des intermédiaires de réaction CNBr, ce qui empêcherait la réaction de procéder de façon optimale (SACHON *et al*, 2002). Un tel encombrement stérique peut être induit par l'incorporation du ligand photosensible dans le groupement  $\gamma$ -méthylène de Met288 ce qui suggère que les analogues  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>]U-II,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>3</sup>]U-II et  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II interagissent directement avec ce résidu. Le marquage  $\epsilon$  des analogues

$^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>]U-II,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>4</sup>]U-II et  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II indique que le groupement Bpa de ces peptides est plus proche de l'extrémité du résidu Met288 et n'occupent pas nécessairement le même espace conformationnel que le groupement Bpa des analogues  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>]U-II,  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>3</sup>]U-II et  $^{125}\text{I}$ -[Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II. En effet, le modelage moléculaire des divers analogues basé sur la structure rapportée d'U-II semble appuyer cette hypothèse. Ces modèles, bien qu'ils ne représentent pas des structures expérimentales, montrent que le Bpa peut occuper un espace conformationnel distinct à l'intérieur de la pochette de liaison orthostérique, qui dépend de sa position à l'intérieur du peptide agoniste ou agoniste partiel.

Il est accepté de façon générale que la liaison de ligands avec des activités intrinsèques différentes envers un récepteur donné vont stabiliser des conformations distinctes (GETHER et KOBILKA, 1998). Nous avons montré dans notre précédente étude de marquage par photoaffinité que la position 6 du peptide agoniste complet est à proximité des résidus Met184 et Met185 du TMD4 (BOUCARD *et al*, 2003b). Dans la présente étude, le photomarquage avec un analogue agoniste partiel qui contient également le Bpa à la sixième position identifie un site de contact différent de l'agoniste complet. Il a été montré que le contact se situe dans un fragment du récepteur qui comprend le TMD5. Cette différence dans le patron de photomarquage pourrait refléter des différences dans les conformations qu'adopte le récepteur suite à l'activation et plus particulièrement les différentes orientations relatives qu'adoptent les TMD4 et TMD5 dans la pochette de liaison. Ainsi, suite à l'activation, le TMD4 pourrait se rapprocher de la pochette de liaison et/ou le TMD5 pourrait s'en éloigner, permettant ainsi le photomarquage du TMD4. Actuellement, nos résultats ne nous

permettent pas de déterminer la nature exacte ou l'étendue de ces mouvements. Nos résultats appuient la notion que le mode de liaison des peptides U-II agonistes complets et partiels est différent et que la liaison de ces analogues mène à la stabilisation de deux différentes conformations du récepteur.

Notre première étude de marquage par photoaffinité nous avait permis de déterminer un premier point de contact entre U-II et rUT (BOUCARD *et al*, 2003b), mais ne permettait pas d'orienter le ligand dans la pochette de liaison du récepteur. Grâce à cette deuxième étude (HOLLERAN *et al*, 2007), il était maintenant possible d'évaluer la position relative de l'agoniste complet à l'intérieur de la pochette de liaison du récepteur rUT. Pour ce faire, nous avons construit un modèle moléculaire de la structure tridimensionnelle du récepteur UT sous sa forme liée à U-II. Afin de positionner correctement U-II à l'intérieur de la pochette de liaison, nous avons défini trois contraintes de distance. Une première contrainte est l'interaction ionique putative entre Lys<sup>8</sup> de l'U-II et le résidu Asp130<sup>(3.32)</sup> du récepteur rUT. En appui à cette interaction, la position Asp122<sup>(3.32)</sup> du récepteur de la somatostatine sstr2, un membre de la même sous-famille de GPCR que UT, interagit avec Lys<sup>9</sup> de la somatostatine, un peptide analogue à U-II (STRNAD et HADCOCK, 1995). De plus, la substitution du résidu Asp130<sup>(3.32)</sup> par une alanine dans le récepteur abolit complètement la liaison à U-II (PROULX *et al*, 2008a) alors que les études de structure-activité portant sur U-II montrent que Lys<sup>8</sup> est un résidu critique pour la liaison et la fonction de U-II (BRKOVIC *et al*, 2003). Nos résultats de photomarquage ont été utilisés pour définir un 2<sup>e</sup> point d'ancrage : une surface correspondant à la position moyenne entre les Ca des résidus Glu<sup>1</sup> à Asp<sup>4</sup> de l'U-II

avec Met288 du récepteur rUT. Un 3<sup>e</sup> point d'ancrage est la position 6 de l'U-II qui est à proximité des résidus Met184/Met185 du TMD4, identifiés dans notre étude précédente. Un premier modèle du récepteur rUT en complexe avec U-II à été produit en tenant compte de ces points d'ancrage, basé sur l'homologie avec la structure de la rhodopsine. Dans ce modèle, les résidus Trp<sup>7</sup>, Lys<sup>8</sup> and Tyr<sup>9</sup>, qui sont critiques pour la liaison et l'activité du peptide U-II, sont situés dans une pochette définie par les portions extracellulaires des TMDs du récepteur, et la portion N-terminale du peptide est plutôt située à proximité des régions extracellulaires du récepteur, en particulier la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire.

Pour rajouter à notre étude de photomarquage et afin de raffiner notre modèle moléculaire, nous avons utilisé l'approche SCAM pour caractériser la pochette de liaison du récepteur rUT. Notre étude de photomarquage a identifié le résidu Met288 de la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire de rUT comme point de contact avec la portion N-terminale de l'U-II. Étant donné que cette boucle fait le lien entre les TMD6 et TMD7 du récepteur, ce sont ces domaines transmembranaires qui ont été ciblés pour l'étude de SCAM. Il faut mentionner que plusieurs autres preuves expérimentales montrent également que ces deux TMDs sont impliqués dans le processus de liaison des GPCRs de la classe A (BOUCARD *et al*, 2003a; CHEREZOV *et al*, 2007; JAAKOLA *et al*, 2008; MARTIN *et al*, 2007).

Le récepteur rUT possède six cystéines endogènes. Parmi ces cystéines, deux sont impliquées dans le pont disulfure putatif conservé reliant le haut du TMD3 avec la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire. Ces deux cystéines ne sont probablement pas disponibles pour l'alkylation par les réactifs MTS. Des quatre cystéines restantes, une est située

dans le TMD6 (C271<sup>(6.47)</sup>), deux sont situées dans le TMD7 (C304<sup>(7.40)</sup> et C311<sup>(7.47)</sup>) et la quatrième cystéine est située dans la première boucle intracellulaire du récepteur (C77). Avant de procéder à la substitution systématique par des cystéines à l'intérieur du récepteur de type sauvage, il fallait s'assurer que l'alkylation des cystéines endogènes n'aurait pas d'effet sur la liaison du peptide U-II. Le récepteur rUT de type sauvage est insensible au traitement des réactifs MTS à des concentrations allant jusqu'à 6 mM, autant pour le MTSEA que le MTSES. Ce résultat suggère que les cystéines endogènes ne sont pas alkylées par les réactifs MTS ou bien que leur alkylation n'a pas d'incidence sur les propriétés de liaison du peptide U-II. Pour exclure la possibilité que les réactifs MTS puissent alkyler une cystéine à partir du côté intracellulaire du récepteur, nous avons pris l'approche de traiter des cellules intactes, où seul le côté extracellulaire du récepteur est accessible au traitement par les réactifs MTS.

Avant de procéder aux expériences de SCAM, nous avons d'abord évalué la capacité de chacun des mutants à lier l'U-II. Si un mutant conserve ses propriétés de liaison, il est raisonnable de supposer que celui-ci est bien exprimé à la surface cellulaire et que la chaîne latérale de la cystéine substituée est orientée sensiblement de la même façon que le résidu natif. Dans le cas contraire, il est possible que la mutation ait touché soit à la stabilité de la structure globale du récepteur, ou bien que le résidu muté soit directement impliqué dans la liaison avec le ligand. Pour le TMD6, nous avons montré que les mutants L267C<sup>(6.43)</sup>, P274C<sup>(6.50)</sup>, F275C<sup>(6.51)</sup>, Q279C<sup>(6.55)</sup>, and L281C<sup>(6.57)</sup> perdent leur capacité de lier le peptide U-II. Puisque la position 6.50 est la proline critique pour la structure globale du TMD6, la perte de liaison du

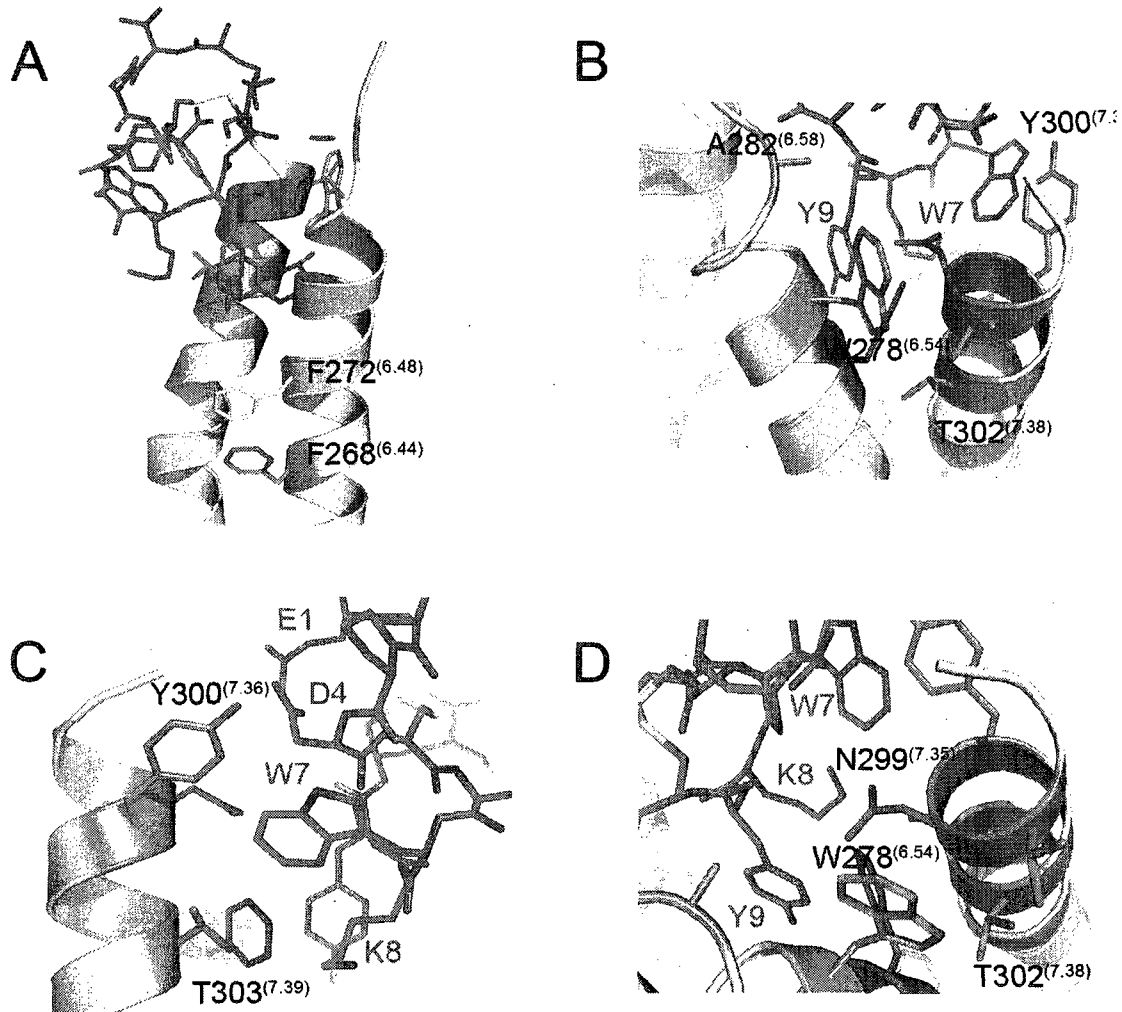
mutant P274C<sup>(6.50)</sup> est probablement due à une instabilité structurale du récepteur. Chez les GPCRs dont la structure a été déterminée, les positions 6.51 et 6.55 sont critiques pour la liaison (CHEREZOV *et al*, 2007; JAAKOLA *et al*, 2008; PALCZEWSKI *et al*, 2000; WARNE *et al*, 2008). Pour le TMD7, les résidus N299C<sup>(7.35)</sup>, P314C<sup>(7.50)</sup>, L316C<sup>(7.52)</sup>, et L319C<sup>(7.55)</sup> ont perdu leur capacité à lier le peptide U-II. Les résidus P314C<sup>(7.50)</sup> et L316C<sup>(7.52)</sup> font partie du motif conservé NPxxY. La mutation à l'intérieur de ce motif hautement conservé pourrait déstabiliser le récepteur (voir section 1.3.4.2).

En utilisant à la fois le MTSEA et le MTSES, nous avons identifié trois résidus sensibles dans le TMD6. Deux résidus sont situés sur le coté extracellulaire du TMD (W278<sup>(6.54)</sup> et A282<sup>(6.58)</sup>) et un dans la portion médiane (F268<sup>(6.44)</sup>). Nous avons également identifié quatre résidus sensibles au traitement MTS situés dans le TMD7 (L298<sup>(7.34)</sup>, Y300<sup>(7.36)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup> et T303<sup>(7.39)</sup>). Ces résidus se trouvent tous sur le coté extracellulaire du TMD7. Les résidus A282<sup>(6.58)</sup> et Y300<sup>(7.36)</sup> sont sensibles au MTSES chargé négativement mais non au MTSEA chargé positivement. Ce résultat peut être expliqué par un phénomène de répulsion électrostatique occasionné par la proximité d'un déterminant chargé négativement dans l'environnement de A282<sup>(6.58)</sup>. Ce déterminant pourrait avoir comme origine le récepteur, ce qui aurait une influence sur sa conformation locale, ou bien le ligand, touchant ainsi directement à la liaison. À l'exception du mutant L298C<sup>(7.34)</sup>, le ligand compétitif U-II protège tous les mutants sensibles contre l'effet des réactifs MTS, ce qui confirme qu'il sont tous orientés vers la pochette de liaison. Le résidu L298C<sup>(7.34)</sup> est faiblement protégé par U-II, ce qui

suggère que l'alkylation de ce mutant inhibe la liaison de U-II par un mécanisme impliquant une interaction indirecte avec le récepteur.

Pour évaluer la position relative des résidus identifiés comme étant dans la pochette de liaison et pour raffiner le modèle moléculaire obtenu suite à l'étude de marquage par photoaffinité, nous avons construit un nouveau modèle du complexe U-II/rUT qui incorpore les données obtenues par le SCAM. De plus, ce nouveau modèle est basé sur l'homologie avec la structure du récepteur  $\beta 2$  adrénergique, nouvellement disponible. Il est probable que cette structure est plus représentative de la structure du récepteur UT puisque le récepteur  $\beta 2$  adrénergique lie un ligand diffusible. Nous avons utilisé les mêmes contraintes obtenues à partir l'étude de photomarquage pour placer l'U-II à l'intérieur de la pochette de liaison du récepteur.

Nous avons utilisé notre modèle pour examiner la position relative et l'orientation de tous les résidus sensibles au réactif MTS à l'intérieur de la pochette de liaison et de façon générale, notre modèle supporte bien nos données expérimentales (Figure 11). En effet, tous les résidus sensibles sont bien orientés vers le corps du récepteur à l'exception du résidu V298<sup>(7,34)</sup> (Ce résidu sera discuté plus loin) et la plupart de ces résidus semblent aussi être en contact avec le ligand. Le modèle montre que le résidu F268<sup>(6,44)</sup> se trouve profondément dans la pochette de liaison relativement aux autres résidus sensibles au MTS (Figure 11, A). Chez la rhodopsine, le résidu analogue F261<sup>(6,44)</sup> est aussi en contact direct avec le rétinale (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Également, la mutation du résidu F282<sup>(6,44)</sup> du récepteur  $\beta 2$  adrénergique entraîne de niveaux d'activité constitutive variant en fonction de



### Figure 11. Modèle moléculaire du récepteur rUT

Représentations de la pochette de liaison du récepteur rUT. (A) Vue du côté. (B) Environnement des résidus W278<sup>(6.54)</sup> et T302<sup>(7.38)</sup>. (C) Environnement des résidus Y300<sup>(7.36)</sup> et T303<sup>(7.39)</sup>. (D) Environnement du résidu N299<sup>(7.35)</sup>. Le ligand est indiqué en vert. Les résidus sensibles au traitement MTS sont indiqués en bleu. Les résidus où la mutation par une cystéine cause une perte de liaison sont indiqués en rouge. Le résidu F272<sup>(6.48)</sup> qui fait partie du motif 'toggle switch' est indiqué en jaune.



l'acide aminé substituant, ce qui indique que cette position est également importante pour l'activation (CHEN *et al*, 2002). Des études de SCAM et de MPA sur le récepteur AT<sub>1</sub> ont aussi montré que cette position est orientée vers la pochette de liaison (CLEMENT *et al*, 2005; MARTIN *et al*, 2007). Il est à noter que le résidu F268<sup>(6.44)</sup> est situé un tour d'hélice au dessous du résidu F272<sup>(6.48)</sup>, qui correspond au 'rotamer toggle switch' dans le motif CW/FLP (Figure 11, A). Bien que nous n'ayons pas identifié ce résidu avec l'approche SCAM, le mutant F272C<sup>(6.48)</sup> montre tout de même une affinité réduite envers l'U-II. Le modèle montre aussi que le résidu W278<sup>(6.54)</sup> est situé à proximité de plusieurs autres résidus sensibles tels que A282<sup>(6.58)</sup>, V298<sup>(7.34)</sup> et T302<sup>(7.38)</sup> tandis que le résidu A282<sup>(6.58)</sup> est à proximité des résidus W278<sup>(6.54)</sup> et N299<sup>(7.35)</sup> (Figure 11, B). Des études de SCAM sur les récepteurs D2 ainsi que sur les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  opioïdes ont également montré que ces 2 positions sont sensibles aux réactifs MTS (JAVITCH *et al*, 1998; XU *et al*, 2001). Pour ce qui est des résidus sensibles au MTS se trouvant dans le TMD7, le modèle montre que le résidu Y300<sup>(7.36)</sup> est situé un tour d'hélice au dessus du résidu T303<sup>(7.39)</sup> et pourrait être impliqué dans une interaction  $\pi$  ou un pont hydrogène avec la position W7 du ligand (Figure 11, C). De plus, le résidu T302<sup>(7.38)</sup> est orienté vers le TMD6 et est à proximité des résidus F275<sup>(6.51)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup> et V298<sup>(7.34)</sup> (Figure 11, B et D). Des études de SCAM sur les récepteurs D2 de la dopamine et le récepteur A1 de l'adénosine ont aussi montré que cette position fait face à la pochette de liaison (DAWSON et WELLS, 2001; FU *et al*, 1996). Dans le modèle, le résidu T303<sup>(7.39)</sup> est orienté vers la pochette de liaison et est à proximité des résidus F275<sup>(6.51)</sup> and Y300<sup>(7.36)</sup>, ainsi que les résidus W7 et K8 de l'U-II (Figure 11, C). Des études de

SCAM sur les récepteurs D2 de la dopamine, A1 de l'adénosine et les récepteurs  $\kappa$  et  $\delta$  opioïdes montrent également que la position 7.39 fait face à la pochette de liaison. De plus, la structure du récepteur A<sub>2A</sub> de l'adénosine obtenue par cristallographie montre que le résidu I274<sup>(7.39)</sup> a une interaction directe avec le ligand antagoniste ZM241385 (JAAKOLA *et al*, 2008).

Nous avons montré que les mutants F275C<sup>(6.51)</sup>, Q279C<sup>(6.55)</sup> et N299C<sup>(7.35)</sup> n'ont aucune liaison envers l'U-II et n'ont donc pu être utilisés dans les études de SCAM. Dans le modèle, les résidus F275<sup>(6.51)</sup>, Q279<sup>(6.55)</sup> et N299<sup>(7.35)</sup> sont tout de même face à la pochette de liaison. Le résidu F275<sup>(6.51)</sup> est très proche des résidus critiques W7, K8, and Y9 de la partie cyclique de l'U-II et une interaction similaire chez la rhodopsine et le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique est retrouvée (CHEREZOV *et al*, 2007; PALCZEWSKI *et al*, 2000). Le résidu Q279C<sup>(6.55)</sup> est à proximité de Y9 de l'U-II, et une interaction semblable entre ligand et récepteur est mise en évidence dans les structures des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergique and A<sub>2A</sub> de l'adénosine (JAAKOLA *et al*, 2008; WARNE *et al*, 2008). Le résidu N299<sup>(7.35)</sup> fait face à la pochette de liaison et est à proximité de W278<sup>(6.54)</sup> ainsi que les résidus W7 et K9 de l'U-II (Figure 11, D). Les structures des récepteurs  $\beta$ 2 adrénergique and A<sub>2A</sub> de l'adénosine montrent que cette position interagit directement avec leur ligand respectif (CHEREZOV *et al*, 2007; JAAKOLA *et al*, 2008). Il est donc pertinent de proposer que les résidus F275<sup>(6.51)</sup>, Q279<sup>(6.55)</sup> et N299<sup>(7.35)</sup> sont également impliqués dans la liaison de l'U-II.

Plusieurs mutants identifiés par SCAM, par exemple les résidus F268<sup>(6.44)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup> et T303<sup>(7.39)</sup>, possèdent une affinité comparable à celle du récepteur de type

sauvage. À première vue, ce résultat suggère que l'introduction d'une cystéine à ces positions ne perturbe pas la structure globale du récepteur. Par contre, on pourrait s'attendre à ce que la mutation d'un résidu situé dans la pochette de liaison, donc susceptible d'interagir avec le ligand, devrait mener à une baisse d'affinité. Lors de l'examen du modèle moléculaire, on peut constater que les chaînes latérales de ces résidus sont orientées vers la pochette de liaison, donc sont accessibles pour l'alkylation par le MTS. Ainsi, c'est l'alkylation par le réactif MTS de la cystéine accessible, non la nature de la chaîne latérale, qui est responsable de l'inhibition de la liaison.

Nos résultats indiquent que le mutant V298C<sup>(7.34)</sup> est sensible au traitement par les réactifs MTS, mais lors des essais de protection, le ligand U-II n'a pas d'effet protecteur. Dans notre modèle, même si le résidu n'est pas orienté vers la pochette de liaison, il est néanmoins à proximité de plusieurs autres résidus sensibles, soit les résidus W278<sup>(6.54)</sup> et T302<sup>(7.38)</sup>. Une explication possible de la sensibilité de ce mutant au traitement est qu'il est impliqué dans un réseau d'interactions qui est critique pour la reconnaissance du ligand et/ou la stabilité du récepteur. Ce réseau pourrait inclure d'autres résidus sensibles au MTS tels que W278<sup>(6.54)</sup>, A282<sup>(6.58)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup> et N299<sup>(7.35)</sup>, et ce réseau pourrait être déstabilisé lorsque le mutant V298C<sup>(7.34)</sup> est traité avec le MTSEA ou le MTSES.

Les mutants A282C<sup>(6.58)</sup> et Y300C<sup>(7.36)</sup> sont sensibles au traitement par le MTSES mais non par le MTSEA. Le modèle montre que ces deux résidus sont à proximité de deux déterminants chargés négativement, soit les résidus E1 et D4 du ligand (Figure 11, C). Ainsi, l'inhibition pourrait être due à un effet de répulsion de

charge entre les cystéines alkylées et les chaînes latérales de ces deux résidus, qui n'a pas lieu lorsque le MTSEA est utilisé.

## CONCLUSIONS

Au cours de mes études, j'ai montré que les analogues agonistes [Bpa<sup>1</sup>]U-II, [Bpa<sup>2</sup>]U-II, [Bpa<sup>3</sup>]U-II et [Bpa<sup>4</sup>]U-II, et les analogues agonistes partiels faibles [Bpa<sup>1</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II et [Bpa<sup>2</sup>Pen<sup>5</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II photomarquent tous le résidu Met288 situé dans la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur rUT. Pour sa part, l'analogue agoniste partiel faible [Pen<sup>5</sup>Bpa<sup>6</sup>D-Trp<sup>7</sup>Orn<sup>8</sup>]U-II photomarque une région du récepteur correspondant au TMD5. Ce résultat diffère de celui obtenu précédemment lors du photomarquage du récepteur avec le peptide agoniste [Bpa<sup>6</sup>]U-II, qui avait identifié le TMD4 comme point de contact. Ce dernier résultat supporte l'hypothèse que des ligands agonistes ou agonistes partiels stabilisent des conformations différentes et suggère une contribution potentielle des TMD4 et TMD5 dans le processus d'activation du récepteur UT. Bien que la plupart des études impliquent plutôt des mouvements des TMDs 3 et 6 lors de l'activation pour les GPCRs de la classe A (FARRENS *et al*, 1996), il est maintenant de plus en plus accepté que d'autres TMDs peuvent participer au processus, dont le TMD5 (SCHWARTZ *et al*, 2006).

Grâce à l'approche SCAM, nous avons montré que les résidus F268<sup>(6.44)</sup>, W278<sup>(6.54)</sup> et A282<sup>(6.58)</sup> du TMD6 et les résidus L298<sup>(7.34)</sup>, Y300<sup>(7.36)</sup>, T302<sup>(7.38)</sup>, et T303<sup>(7.39)</sup> du TMD7 sont exposés à la cavité hydrophile du récepteur UT. La majorité de ces résidus sont à des positions qui font aussi partie de la pochette de liaison d'autres GPCRs de la classe A, ce qui renforce l'idée que les GPCRs de la classe A partagent des déterminants moléculaires importants pour la liaison. Il est intéressant

de noter que majorité de ces résidus sensibles sont à proximité les uns des autres, et sont aussi à proximité des résidus-clés W7, K8 et Y9 du ligand U-II. Cette observation permet de proposer l'hypothèse que, chez le récepteur UT, il pourrait exister un réseau d'interactions intramoléculaires dont le point focal pourrait être le résidu W278<sup>(6.54)</sup>. Un tel réseau n'a jamais été observé pour un autre GPCR et pourrait être unique au récepteur UT.

L'ensemble de nos résultats permet de proposer un modèle moléculaire du complexe rUT/U-II. Ce modèle suggère que la portion C-terminale du ligand, qui est cruciale pour l'activité du peptide, est en contact avec le haut des TMDs du récepteur tandis que la portion N-terminale, moins cruciale, interagit avec les régions extracellulaires du récepteur. Ainsi, l'U-II adopte un mode de liaison qui ressemble beaucoup à celui des autres GPCRs de classe A pour des peptides. Il est important de mentionner que le modèle a été construit à partir de contraintes qui ont été déterminées avec des analogues agonistes de l'U-II. Puisque le modèle moléculaire est basé sur une structure inactive d'un GPCR, il n'est pas clair si ce modèle est représentatif d'un état actif ou d'un état inactif du récepteur UT. Néanmoins, ce modèle peut tout de même être utilisé pour l'interprétation de nos données expérimentales et pour proposer de nouvelles hypothèses quant au mode de liaison du peptide U-II. Ces hypothèses devront évidemment être vérifiées par la suite avec des expériences appropriées. Ces expériences pourraient inclure d'autres approches pour caractériser la pochette de liaison du récepteur, telles la création d'un site de chélation pour le zinc par mutagenèse dirigée du récepteur utilisée dans le laboratoire de Schwartz ou bien la technique de réticulation de deux cystéines adjacentes utilisée

dans le laboratoire de Wess. En plus d'identifier les résidus qui sont situés dans la poche de liaison du récepteur, ces approches ont aussi l'avantage de fournir de l'information sur les mouvements conformationnels des TMDs qui surviennent suite à la liaison, ce qui permet davantage de caractériser le processus d'activation.

Tant que la structure du récepteur UT qui provient d'un cristal ne sera pas disponible, des méthodes biochimiques alternatives continueront d'être utiles pour la caractérisation de la poche de liaison du récepteur. Ces méthodes mèneront à une meilleure compréhension des changements structuraux qui décrivent les divers états fonctionnels des GPCRs en général ainsi que les mécanismes de reconnaissance hormone-récepteur pour les GPCRs à ligand peptidique.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche, les Drs Richard Leduc et Emanuel Escher, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires au cours de mon doctorat. Merci de vos conseils et de votre confiance.

Je voudrais aussi remercier tous les collègues présents et passés rencontrés au cours des années, ainsi qu'à tous les membres du département de pharmacologie. Merci à Martin, Dany, Jason, Philip, Marie-Reine, Antoine, François, Stéphane, Jean-Michel, Patrice, Pascal, Mannix et Antony. Un merci spécial à Christophe, avec qui j'ai partagé le projet urotensine-II, pour les discussions enrichissantes et toujours pertinentes.

Un merci aux Drs Marceau, Lehoux et Boulay pour avoir accepté de participer à l'évaluation de cette thèse.

Un gros merci à mes parents, Walter et Suzanne, pour m'avoir toujours encouragé tout au long de mes études.

Enfin, je voudrais remercier ma petite famille, Thomas et Marie-Josée, pour toutes les petites joies de la vie.



## BIBLIOGRAPHIE

- AKABAS, M. H., STAUFFER, D. A., XU, M. et KARLIN, A. (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258: 307-10
- ALTENBACH, C., KUSNETZOW, A. K., ERNST, O. P., HOFMANN, K. P. et HUBBELL, W. L. (2008) High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7439-44
- AMES, R. S., SARAU, H. M., CHAMBERS, J. K., WILLETTE, R. N., AIYAR, N. V., *et al.* (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401: 282-6
- ASHTON, N. (2006) Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int* 70: 624-9
- AUDET, M. et BOUVIER, M. (2008) Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure. *Nat Chem Biol* 4: 397-403
- BALLESTEROS, J. A., JENSEN, A. D., LIAPAKIS, G., RASMUSSEN, S. G., SHI, L., *et al.* (2001a) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276: 29171-7
- BALLESTEROS, J. A., SHI, L. et JAVITCH, J. A. (2001b) Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol Pharmacol* 60: 1-19
- BALLESTEROS, J. A. et WEINSTEIN, H. 1995. *Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors*. San Diego, CA: Academic Press. 366-428 pp.
- BEHM, D. J., DOE, C. P., JOHNS, D. G., MANISCALCO, K., STANKUS, G. P., *et al.* (2004) Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 274-80
- BERGERON, F., LEDUC, R. et DAY, R. (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* 24: 1-22
- BERN, H. A. et LEDERIS, K. (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J Endocrinol* 45: Suppl:xi-xii
- BISELLO, A., ADAMS, A. E., MIERKE, D. F., PELLEGRINI, M., ROSENBLATT, M., *et al.* (1998) Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies. *J Biol Chem* 273: 22498-505
- BOCKAERT, J. et PIN, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18: 1723-9
- BOIVIN, S., GUILHAUDIS, L., MILAZZO, I., OULYADI, H., DAVOUST, D. et FOURNIER, A. (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural

- domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* 45: 5993-6002
- BOIVIN, S., SEGALAS-MILAZZO, I., GUILHAUDIS, L., OULYADI, H., FOURNIER, A. et DAVOUST, D. (2008) Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II. *Peptides* 29: 700-10
- BOSSHARD, H. R. (2001) Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol Sci* 16: 171-3
- BOUCARD, A. A., ROY, M., BEAULIEU, M. E., LAVIGNE, P., ESCHER, E., *et al.* (2003a) Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J Biol Chem* 278: 36628-36
- BOUCARD, A. A., SAUVE, S. S., GUILLEMETTE, G., ESCHER, E. et LEDUC, R. (2003b) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem J* 370: 829-38
- BOUCARD, A. A., WILKES, B. C., LAPORTE, S. A., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2000) Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry* 39: 9662-70
- BOUSETTE, N., PATEL, L., DOUGLAS, S. A., OHLSTEIN, E. H. et GIAID, A. (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176: 117-23
- BOYD, N. D., KAGE, R., DUMAS, J. J., KRAUSE, J. E. et LEEMAN, S. E. (1996) The peptide binding site of the substance P (NK-1) receptor localized by a photoreactive analogue of substance P: presence of a disulfide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 433-7
- BRKOVIC, A., HATTENBERGER, A., KOSTENIS, E., KLABUNDE, T., FLOHR, S., *et al.* (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 1200-9
- CAMARDA, V., GUERRINI, R., KOSTENIS, E., RIZZI, A., CALO, G., *et al.* (2002) A new ligand for the urotensin II receptor. *Br J Pharmacol* 137: 311-4
- CAMARDA, V., SONG, W., MARZOLA, E., SPAGNOL, M., GUERRINI, R., *et al.* (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur J Pharmacol* 498: 83-6
- CHARTREL, N., LEPRINCE, J., DUJARDIN, C., CHATENET, D., TOLLEMER, H., *et al.* (2004) Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *J Neurochem* 91: 110-8
- CHEN, S., LIN, F., XU, M., RIEK, R. P., NOVOTNY, J. et GRAHAM, R. M. (2002) Mutation of a single TMVI residue, Phe(282), in the beta(2)-adrenergic receptor results in structurally distinct activated receptor conformations. *Biochemistry* 41: 6045-53
- CHEREZOV, V., ROSENBAUM, D. M., HANSON, M. A., RASMUSSEN, S. G., THIAN, F. S., *et al.* (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-65

- CLEMENT, M., MARTIN, S. S., BEAULIEU, M. E., CHAMBERLAND, C., LAVIGNE, P., *et al.* (2005) Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay. *J Biol Chem* 280: 27121-9
- CONLON, J. M., O'HARTE, F., SMITH, D. D., TONON, M. C. et VAUDRY, H. (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 578-83
- CONLON, J. M., YANO, K., WAUGH, D. et HAZON, N. (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J Exp Zool* 275: 226-38
- CORVILAIN, B., VAN SANDE, J., DUMONT, J. E. et VASSART, G. (2001) Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55: 143-58
- COSTA-NETO, C. M., MIYAKAWA, A. A., OLIVEIRA, L., HJORTH, S. A., SCHWARTZ, T. W. et PAIVA, A. C. (2000) Mutational analysis of the interaction of the N- and C-terminal ends of angiotensin II with the rat AT(1A) receptor. *Br J Pharmacol* 130: 1263-8
- COTECCHIA, S., FANELLI, F. et COSTA, T. (2003) Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action. *Assay Drug Dev Technol* 1: 311-6
- COULOUARN, Y., JEGOU, S., TOSTIVINT, H., VAUDRY, H. et LIHRMANN, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 457: 28-32
- COULOUARN, Y., LIHRMANN, I., JEGOU, S., ANOUAR, Y., TOSTIVINT, H., *et al.* (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15803-8
- COUVINEAU, A., TAN, Y. V., CERAUDO, E., LACAPERRE, J. J., MURAIL, S., *et al.* (2006) The human VPAC1 receptor: identification of the N-terminal ectodomain as a major VIP-binding site by photoaffinity labeling and 3D modeling. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 205-9
- DAWSON, E. S. et WELLS, J. N. (2001) Determination of amino acid residues that are accessible from the ligand binding crevice in the seventh transmembrane-spanning region of the human A(1) adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 59: 1187-95
- DE GASPARO, M., CATT, K. J., INAGAMI, T., WRIGHT, J. W. et UNGER, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-72
- DE LEAN, A., STADEL, J. M. et LEFKOWITZ, R. J. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-17
- DONG, M., HADAC, E. M., PINON, D. I. et MILLER, L. J. (2005a) Differential spatial approximation between cholecystokinin residue 30 and receptor residues in active and inactive conformations. *Mol Pharmacol* 67: 1892-900
- DONG, M., HOSOHATA, K., PINON, D. I., MUTHUKUMARASWAMY, N. et MILLER, L. J. (2006) Differential spatial approximation between secretin and

- its receptor residues in active and inactive conformations demonstrated by photoaffinity labeling. *Mol Endocrinol* 20: 1688-98
- DONG, M., LIU, G., PINON, D. I. et MILLER, L. J. (2005b) Differential docking of high-affinity peptide ligands to type A and B cholecystikinin receptors demonstrated by photoaffinity labeling. *Biochemistry* 44: 6693-700
- DOUGLAS, S. A., BEHM, D. J., AIYAR, N. V., NASELSKY, D., DISA, J., *et al.* (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: in vitro pharmacological characterization of SB-706375. *Br J Pharmacol* 145: 620-35
- DOUGLAS, S. A., DHANAK, D. et JOHNS, D. G. (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 25: 76-85
- DOUGLAS, S. A., SULPIZIO, A. C., PIERCY, V., SARAU, H. M., AMES, R. S., *et al.* (2000) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 131: 1262-74
- DUBESSY, C., CARTIER, D., LECTEZ, B., BUCHARLES, C., CHARTREL, N., *et al.* (2008) Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *J Neurochem* 107: 361-74
- ELSHOURBAGY, N. A., DOUGLAS, S. A., SHABON, U., HARRISON, S., DUDDY, G., *et al.* (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol* 136: 9-22
- FARRENS, D. L., ALTENBACH, C., YANG, K., HUBBELL, W. L. et KHORANA, H. G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274: 768-70
- FENG, Y. H., MIURA, S., HUSAIN, A. et KARNIK, S. S. (1998) Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111). *Biochemistry* 37: 15791-8
- FISCHER, E. (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges* 27: 2984-93
- FLOHR, S., KURZ, M., KOSTENIS, E., BRKOVICH, A., FOURNIER, A. et KLABUNDE, T. (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* 45: 1799-805
- FONG, T. M., YU, H., HUANG, R. R. et STRADER, C. D. (1992) The extracellular domain of the neurokinin-1 receptor is required for high-affinity binding of peptides. *Biochemistry* 31: 11806-11
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. et SCHIOTH, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-72
- FREDRIKSSON, R. et SCHIOTH, H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67: 1414-25

- FU, D., BALLESTEROS, J. A., WEINSTEIN, H., CHEN, J. et JAVITCH, J. A. (1996) Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 35: 11278-85
- GALANDRIN, S., OLIGNY-LONGPRE, G. et BOUVIER, M. (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28: 423-30
- GETHER, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21: 90-113
- GETHER, U. et KOBILKA, B. K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273: 17979-82
- GIBSON, A., WALLACE, P. et BERN, H. A. (1986) Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *Gen Comp Endocrinol* 64: 435-9
- GOVAERTS, C., LEFORT, A., COSTAGLIOLA, S., WODAK, S. J., BALLESTEROS, J. A., et al. (2001) A conserved Asn in transmembrane helix 7 is an on/off switch in the activation of the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 276: 22991-9
- GRIECO, P., CAROTENUTO, A., CAMPIGLIA, P., ZAMPELLI, E., PATACCHINI, R., et al. (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J Med Chem* 45: 4391-4
- GRIPENTROG, J. M., JESAITIS, A. J. et MIETTINEN, H. M. (2000) A single amino acid substitution (N297A) in the conserved NPXXY sequence of the human N-formyl peptide receptor results in inhibition of desensitization and endocytosis, and a dose-dependent shift in p42/44 mitogen-activated protein kinase activation and chemotaxis. *Biochem J* 352 Pt 2: 399-407
- HE, R., BROWNING, D. D. et YE, R. D. (2001) Differential roles of the NPXXY motif in formyl peptide receptor signaling. *J Immunol* 166: 4099-105
- HILLIER, C., BERRY, C., PETRIE, M. C., O'DWYER, P. J., HAMILTON, C., et al. (2001) Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. *Circulation* 103: 1378-81
- HJORTH, S. A., SCHAMBYE, H. T., GREENLEE, W. J. et SCHWARTZ, T. W. (1994) Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT1 receptor. *J Biol Chem* 269: 30953-9
- HOLLERAN, B. J., BEAULIEU, M. E., PROULX, C. D., LAVIGNE, P., ESCHER, E. et LEDUC, R. (2007) Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* 402: 51-61
- HOLLERAN, B. J., DOMAZET, I., BEAULIEU, M. E., YAN, L. P., GUILLEMETTE, G., et al. (2009) Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem Pharmacol* 77: 1374-82
- HSIEH, K. H. et MARSHALL, G. R. (1986) Role of the C-terminal carboxylate in angiotensin II activity: alcohol, ketone, and ester analogues of angiotensin II. *J Med Chem* 29: 1968-71
- HUANG, R. R., YU, H., STRADER, C. D. et FONG, T. M. (1994) Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* 33: 3007-13

- HUITRON-RESENDIZ, S., KRISTENSEN, M. P., SANCHEZ-ALAVEZ, M., CLARK, S. D., GRUPKE, S. L., *et al.* (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* 25: 5465-74
- JAAKOLA, V. P., GRIFFITH, M. T., HANSON, M. A., CHEREZOV, V., CHIEN, E. Y., *et al.* (2008) The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science*
- JAVITCH, J. A., BALLESTEROS, J. A., WEINSTEIN, H. et CHEN, J. (1998) A cluster of aromatic residues in the sixth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor is accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 37: 998-1006
- JAVITCH, J. A., SHI, L. et LIAPAKIS, G. (2002) Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol* 343: 137-56
- JEGOU, S., CARTIER, D., DUBESSY, C., GONZALEZ, B. J., CHATENET, D., *et al.* (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 495: 21-36
- JONES, K. A., BOROWSKY, B., TAMM, J. A., CRAIG, D. A., DURKIN, M. M., *et al.* (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396: 674-9
- KAGE, R., LEEMAN, S. E., KRAUSE, J. E., COSTELLO, C. E. et BOYD, N. D. (1996) Identification of methionine as the site of covalent attachment of a p-benzoyl-phenylalanine-containing analogue of substance P on the substance P (NK-1) receptor. *J Biol Chem* 271: 25797-800
- KALATSKAYA, I., SCHUSSLER, S., BLAUKAT, A., MULLER-ESTERL, W., JOCHUM, M., *et al.* (2004) Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 279: 31268-76
- KAUER, J. C., ERICKSON-VIITANEN, S., WOLFE, H. R., JR. et DEGRADO, W. F. (1986) p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* 261: 10695-700
- KEEN, T. J., INGLEHEARN, C. F., LESTER, D. H., BASHIR, R., JAY, M., *et al.* (1991) Autosomal dominant retinitis pigmentosa: four new mutations in rhodopsin, one of them in the retinal attachment site. *Genomics* 11: 199-205
- KENAKIN, T. (1995) Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16: 232-8
- KENAKIN, T. (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *Faseb J* 15: 598-611
- KENAKIN, T. (2002) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 349-79
- KENAKIN, T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24: 346-54
- KENAKIN, T. (2004a) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65: 2-11

- KENAKIN, T. (2004b) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25: 186-92
- KINNEY, W. A., ALMOND JR, H. R., QI, J., SMITH, C. E., SANTULLI, R. J., *et al.* (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 2940-4
- KOSHLAND, D. E. (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44: 98-104
- KRAMER, H. K., ANDRIA, M. L., KUSHNER, S. A., ESPOSITO, D. H., HILLER, J. M. *et al.* (2000) Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation. *Brain Res Mol Brain Res* 79: 55-66
- LABARRERE, P., CHATENET, D., LEPRINCE, J., MARIONNEAU, C., LOIRAND, G., *et al.* (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 77-88
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- LAPORTE, S. A., BOUCARD, A. A., SERVANT, G., GUILLEMETTE, G., LEDUC, R. *et al.* (1999) Determination of peptide contact points in the human angiotensin II type I receptor (AT1) with photosensitive analogs of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 13: 578-86
- LEFKOWITZ, R. J. *et al.* (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512-7
- LI, H., MACDONALD, D. M., HRONOWSKI, X., COSTELLO, C. E., LEEMAN, S. E. *et al.* (2001) Further definition of the substance P (SP)/neurokinin-1 receptor complex. MET-174 is the site of photoinsertion p-benzoylphenylalanine<sup>4</sup> SP. *J Biol Chem* 276: 10589-93
- LI, Y. M., MARNERAKIS, M., STIMSON, E. R. *et al.* (1995) Mapping peptide-binding domains of the substance P (NK-1) receptor from P388D1 cells with photolabile agonists. *J Biol Chem* 270: 1213-20
- LIAPAKIS, G., BALLESTEROS, J. A., PAPACHRISTOU, S., CHAN, W. C., CHEN, X. *et al.* (2000) The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 275: 37779-88
- LIN, S. W. *et al.* (1996) Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry* 35: 11149-59
- LIN, Y., TSUCHIHASHI, T., MATSUMURA, K., ABE, I. *et al.* (2003a) Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens* 21: 159-65
- LIN, Y., TSUCHIHASHI, T., MATSUMURA, K., FUKUHARA, M., OHYA, Y., *et al.* (2003b) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 26: 839-45

- LIU, Q., PONG, S. S., ZENG, Z., ZHANG, Q., HOWARD, A. D., *et al.* (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 174-8
- MACLEAN, M. R., ALEXANDER, D., STIRRAT, A., GALLAGHER, M., DOUGLAS, S. A., *et al.* (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 130: 201-4
- MAGUIRE, J. J., KUC, R. E. et DAVENPORT, A. P. (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 131: 441-6
- MAGUIRE, J. J., KUC, R. E., KLEINZ, M. J. et DAVENPORT, A. P. (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* 29: 735-42
- MARCHESE, A., HEIBER, M., NGUYEN, T., HENG, H. H., SALDIVIA, V. R., *et al.* (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 29: 335-44
- MARTIN, S. S., BOUCARD, A. A., CLEMENT, M., ESCHER, E., LEDUC, R. et GUILLEMETTE, G. (2004) Analysis of the third transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 279: 51415-23
- MARTIN, S. S., HOLLERAN, B. J., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2007) Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method. *Mol Pharmacol* 72: 182-90
- MATSUSHITA, M., SHICHIRI, M., IMAI, T., IWASHINA, M., TANAKA, H., *et al.* (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* 19: 2185-90
- MILLIGAN, G. (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64: 1271-6
- MONNOT, C., BIHOREAU, C., CONCHON, S., CURNOW, K. M., CORVOL, P. et CLAUSER, E. (1996) Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J Biol Chem* 271: 1507-13
- MORI, M., SUGO, T., ABE, M., SHIMOMURA, Y., KURIHARA, M., *et al.* (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 265: 123-9
- NODA, K., SAAD, Y. et KARNIK, S. S. (1995) Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. *J Biol Chem* 270: 28511-4
- NOTHACKER, H. P., WANG, Z., MCNEILL, A. M., SAITO, Y., MERTEN, S., *et al.* (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1: 383-5
- OLDHAM, W. M. et HAMM, H. E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60-71



- ONAN, D., HANNAN, R. D. et THOMAS, W. G. (2004) Urotensin II: the old kid in town. *Trends Endocrinol Metab* 15: 175-82
- ONG, K. L., LAM, K. S. et CHEUNG, B. M. (2005) Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 19: 65-75
- OVERINGTON, J. P., AL-LAZIKANI, B. et HOPKINS, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5: 993-6
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., et al. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-45
- PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P., GIULIANI, S., GRIECO, P., NOVELLINO, E., et al. (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 140: 1155-8
- PEARSON, D., SHIVELY, J. E., CLARK, B. R., GESCHWIND, II, BARKLEY, M., et al. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5021-4
- PELLEGRINI, M., BISELLO, A., ROSENBLATT, M., CHOREV, M. et MIERKE, D. F. (1998) Binding domain of human parathyroid hormone receptor: from conformation to function. *Biochemistry* 37: 12737-43
- PERODIN, J., DERAET, M., AUGER-MESSIER, M., BOUCARD, A. A., RIHAKOVA, L., et al. (2002) Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor. *Biochemistry* 41: 14348-56
- PHALIPOU, S., COTTE, N., CARNAZZI, E., SEYER, R., MAHE, E., et al. (1997) Mapping peptide-binding domains of the human V1a vasopressin receptor with a photoactivatable linear peptide antagonist. *J Biol Chem* 272: 26536-44
- PIDASHEVA, S., D'SOUZA-LI, L., CANAFF, L., COLE, D. E. et HENDY, G. N. (2004) CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 24: 107-11
- PIN, J. P., GALVEZ, T. et PREZEAU, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-54
- PRIOLEAU, C., VISIERS, I., EBERSOLE, B. J., WEINSTEIN, H. et SEALFON, S. C. (2002) Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT2C receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations. *J Biol Chem* 277: 36577-84
- PROULX, C. D., HOLLERAN, B. J., BOUCARD, A. A., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2008a) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol Pharmacol* 74: 552-61
- PROULX, C. D., HOLLERAN, B. J., LAVIGNE, P., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2008b) Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 29: 691-9
- RASMUSSEN, S. G., CHOI, H. J., ROSENBAUM, D. M., KOBILKA, T. S., THIAN, F. S., et al. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450: 383-7

- RASMUSSEN, S. G., JENSEN, A. D., LIAPAKIS, G., GHANOUNI, P., JAVITCH, J. A. et GETHER, U. (1999) Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol* 56: 175-84
- REGOLI, D. et NANTEL, F. (1991) Pharmacology of neurokinin receptors. *Biopolymers* 31: 777-83
- RIHAKOVA, L., DERAET, M., AUGER-MESSIER, M., PERODIN, J., BOUCARD, A. A., et al. (2002) Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction. *J Recept Signal Transduct Res* 22: 297-313
- ROBERTS, D. D., LEWIS, S. D., BALLOU, D. P., OLSON, S. T. et SHAFER, J. A. (1986) Reactivity of small thiolate anions and cysteine-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry* 25: 5595-601
- ROMANO, C., YANG, W. L. et O'MALLEY, K. L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271: 28612-6
- ROSENBAUM, D. M., CHEREZOV, V., HANSON, M. A., RASMUSSEN, S. G., THIAN, F. S., et al. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318: 1266-73
- ROVATI, G. E., CAPRA, V. et NEUBIG, R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 71: 959-64
- SACHON, E., BOLBACH, G., CHASSAING, G., LAVIELLE, S. et SAGAN, S. (2002) Cgamma H2 of Met174 side chain is the site of covalent attachment of a substance P analog photoactivable in position 5. *J Biol Chem* 277: 50409-14
- SCHEERER, P., PARK, J. H., HILDEBRAND, P. W., KIM, Y. J., KRAUSS, N., et al. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455: 497-502
- SCHIPANI, E., KRUSE, K. et JUPPNER, H. (1995) A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 268: 98-100
- SCHWARTZ, T. W., FRIMURER, T. M., HOLST, B., ROSENKILDE, M. M. et ELLING, C. E. (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 481-519
- SEGAIN, J. P., ROLLI-DERKINDEREN, M., GERVOIS, N., RAINGEARD DE LA BLETIERE, D., LOIRAND, G. et PACAUD, P. (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* 179: 901-9
- SEIFERT, R. et WENZEL-SEIFERT, K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366: 381-416
- SEIFERT, R., WENZEL-SEIFERT, K., GETHER, U. et KOBILKA, B. K. (2001) Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1218-26

- SHENOUDA, A., DOUGLAS, S. A., OHLSTEIN, E. H. et GIAID, A. (2002) Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J Histochem Cytochem* 50: 885-9
- SHI, L. et JAVITCH, J. A. (2002) The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 437-67
- SHI, L., LIAPAKIS, G., XU, R., GUARNIERI, F., BALLESTEROS, J. A. et JAVITCH, J. A. (2002) Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 277: 40989-96
- SMIT, M. J., VISCHER, H. F., BAKKER, R. A., JONGEJAN, A., TIMMERMAN, H., et al. (2007) Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 53-87
- STIRRAT, A., GALLAGHER, M., DOUGLAS, S. A., OHLSTEIN, E. H., BERRY, C., et al. (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H925-8
- STRADER, C. D., SIGAL, I. S. et DIXON, R. A. (1989) Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 3: 1825-32
- STRNAD, J. et HADCOCK, J. R. (1995) Identification of a critical aspartate residue in transmembrane domain three necessary for the binding of somatostatin to the somatostatin receptor SSTR2. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 913-21
- SUGO, T., MURAKAMI, Y., SHIMOMURA, Y., HARADA, M., ABE, M., et al. (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 860-8
- TOTSUNE, K., TAKAHASHI, K., ARIHARA, Z., SONE, M., ITO, S. et MURAKAMI, O. (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 104: 1-5
- TOTSUNE, K., TAKAHASHI, K., ARIHARA, Z., SONE, M., SATOH, F., et al. (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* 358: 810-1
- ULFERS, A. L., PISERCHIO, A. et MIERKE, D. F. (2002) Extracellular domains of the neurokinin-1 receptor: structural characterization and interactions with substance P. *Biopolymers* 66: 339-49
- URIZAR, E., CLAEYSEN, S., DEUPI, X., GOVAERTS, C., COSTAGLIOLA, S., et al. (2005) An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 280: 17135-41
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51
- WARNE, T., SERRANO-VEGA, M. J., BAKER, J. G., MOUKHAMETZIANOV, R., EDWARDS, P. C., et al. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454: 486-91
- WATSON, A. M., LAMBERT, G. W., SMITH, K. J. et MAY, C. N. (2003) Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* 42: 373-9

- WESS, J., HAN, S. J., KIM, S. K., JACOBSON, K. A. et LI, J. H. (2008) Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 29: 616-25
- WIELAND, K., ZUURMOND, H. M., KRASEL, C., IJZERMAN, A. P. et LOHSE, M. J. (1996) Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9276-81
- XU, W., CAMPILLO, M., PARDO, L., KIM DE RIEL, J. et LIU-CHEN, L. Y. (2005) The seventh transmembrane domains of the delta and kappa opioid receptors have different accessibility patterns and interhelical interactions. *Biochemistry* 44: 16014-25
- XU, W., LI, J., CHEN, C., HUANG, P., WEINSTEIN, H., *et al.* (2001) Comparison of the amino acid residues in the sixth transmembrane domains accessible in the binding-site crevices of mu, delta, and kappa opioid receptors. *Biochemistry* 40: 8018-29
- ZHANG, A. Y., CHEN, Y. F., ZHANG, D. X., YI, F. X., QI, J., *et al.* (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F792-8
- ZHANG, M., MIZRACHI, D., FANELLI, F. et SEGALOFF, D. L. (2005a) The formation of a salt bridge between helices 3 and 6 is responsible for the constitutive activity and lack of hormone responsiveness of the naturally occurring L457R mutation of the human lutropin receptor. *J Biol Chem* 280: 26169-76
- ZHANG, R., HURST, D. P., BARNETT-NORRIS, J., REGGIO, P. H. et SONG, Z. H. (2005b) Cysteine 2.59(89) in the second transmembrane domain of human CB2 receptor is accessible within the ligand binding crevice: evidence for possible CB2 deviation from a rhodopsin template. *Mol Pharmacol* 68: 69-83