

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**ANALYSE DES DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES DES VOIES DE  
SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR UT DE L'UROTENSINE II.**

**Par**

**CHRISTOPHE PROULX**

**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**

**25 Août 2008**

**Évaluateurs :**

**Dr Richard Leduc, département de pharmacologie**

**Dr Gaétan Guillemette, département de pharmacologie**

**Dr Guylain Boulay, département de pharmacologie**

**Dr Louis Gendron, département de physiologie et de biophysique**

**Dr Alain Fournier, Institut Armand Frappier, INRS**



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: 978-0-494-52852-5*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-52852-5*

#### 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**

## 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>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. SYSTÈME UROTENSINE II / RÉCEPTEUR UT .....</b>	<b>1</b>
1.1. Survol historique :.....	1
1.2. L'Urotensine II et l'URP: Structure et localisation .....	2
1.3. Récepteur de l'urotensine II : Structure et localisation.....	4
1.4. Signalisation intracellulaire du récepteur UT .....	7
1.4.1. Couplage aux protéines G hétérotrimériques: .....	7
1.4.2. Mécanismes signalétiques impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire .....	8
1.4.3. Signalisation du récepteur UT dans le développement de pathophysiologies du système cardiovasculaire : rôle central de la voie des MAPKs. ....	11
1.5. Actions physiologiques de l'UII. ....	12
1.5.1. Actions périphériques : .....	12
1.5.1.1. Régulation du système cardiovasculaire.....	12

1.5.1.2. Régulation du système rénal .....	14
1.5.2. Actions centrales de l'UII .....	14
<b>2. LA GRANDE FAMILLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES</b>	
<b>G (GPCRs).....</b>	<b>15</b>
2.1. Structure et classification des GPCRs .....	17
2.1.1. GPCRs de classe A .....	21
2.1.1.1. Nomenclature de Ballesteros et Weinstein .....	21
2.1.2. GPCRs de classe B .....	22
2.1.3. GPCRs de classe C .....	23
2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des GPCRs de classe A	24
2.2.1. <i>Ionic Lock</i> .....	25
2.2.2. Asparagine du motif NPxxY et D <sup>2.50</sup> .....	26
2.2.3. <i>Rotamer Toggle Switch</i> .....	26
<b>3. MÉCANISMES DE SIGNALISATION ET DE DÉSENSIBILISATION DES</b>	
<b>GPCRs.....</b>	<b>27</b>
3.1. Signalisation dépendante des protéines hétérotrimériques G .....	27
3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation et la régulation des	
GPCRs .....	29
3.2.1. Rôle central des GRKs et des arrestines .....	29
3.2.1.1. Les GRKs.....	30
3.2.1.2. Les arrestines .....	32
3.2.2. Désensibilisation, routage et signalisation indépendante des protéines G... 35	
3.2.2.1. Découplage de la protéine hétérotrimérique G .....	35

3.2.2.2. Routage intracellulaire des GPCRs.....	37
3.2.2.2.1. Voie dépendante des vésicules de clathrines .....	37
3.2.2.2.2. Voies alternatives d'internalisation .....	41
3.2.2.3. Signalisation indépendante des protéines G .....	42
<b>4. RAISONNEMENT THÉORIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....</b>	<b>45</b>
4.1. Objectif 1 : Caractériser les mécanismes d'internalisation du récepteur UT. ....	46
4.2. Objectif 2 : Déterminer le rôle du résidu conservé D97 <sup>2.50</sup> et des résidus du motif conservé ERY dans la régulation de l'activité du récepteur UT.....	46
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>48</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>49</b>
<b>Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. ....</b>	<b>49</b>
<b>Article 2.....</b>	<b>82</b>
<b>Mutational analysis of the conserved Asp<sup>2.50</sup> and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor .....</b>	<b>82</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>130</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>147</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>151</b>

## LISTE DES PUBLICATIONS

Pour cette thèse :

**Proulx, C.D.**, Simaan, M., Escher, E., Laporte, S.A., Guillemette, G., & Leduc, R. (2005). Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochemical Journal*. **385**(Pt-1): 115-123

**Proulx, C.D.**, Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp<sup>2.50</sup> and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Molecular Pharmacology*. **4**(3): 552-61

**AUTRES PUBLICATIONS**

**\*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.

Leclerc, P.C., **Proulx, C.D.**, Arguin, G. Boulanger, S., Gobeil, F.Jr., Escher, E., Leduc, R. & Guillemette, G. (2008). Ascorbic acid decreases the binding affinity of the AT1 receptor for angiotensin II. *Am. J. Hyper.* 21(1): 67-71

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

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure 1. Représentation schématique du récepteur UT.....	6
Figure 2. Résumé des voies de signalisation activées par l'UII dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales et les macrophages.....	10
Figure 3. Modèle en deux dimensions du récepteur $\beta$ 2-adrénérique illustrant les principales caractéristiques d'un GPCR appartenant à la classe A. ....	18
Figure 4. Représentation schématique des récepteurs de classe A, B et C.....	20
Figure 5. Représentation schématique des différents domaines importants des GRKs.....	31
Figure 6. Éléments structuraux clés des arrestines. ....	33
Figure 7. Modèle décrivant les changements conformationnels de l'arrestine lors de la liaison à un GPCR activé et phosphorylé. ....	34
Figure 8. Régulation du routage intracellulaire des GPCRs par les GRKs et les arrestines. ....	38
Figure 9. Modes d'activation des ERKs par les GPCRs.....	40

### Article 1

Figure 1. Internalization of $^{125}$ I-UII by UT-wt in transiently transfected COS-7 cells. ....	61
Figure 2. Intracellular trafficking of UT-GFP. ....	62
Figure 3. Functional characterization of UT receptors.....	65



Figure 4. Effect of C-terminal truncations on UT receptor internalization. ....	68
Figure 5. Co-localization of $\beta$ arrestin1 and $\beta$ arrestin2 to agonist-activated UT or Mut4S receptors.....	71
Figure 6. Effect of overexpression of $\beta$ arrestin1, $\beta$ arrestin2 and truncated $\beta$ arrestin2-381T on WT and Mut4S receptor internalization. ....	73

## Article 2

Figure 1. Schematic representation of the rat UT receptor.....	98
Figure 2. Inositol phosphate production by the wild-type and mutant receptors. ....	100
Figure 3. Effect of UT receptor mutations on MAPK activation. ....	102
Figure 4. R148 <sup>3.50</sup> mutants promote ERK1/2 activation by transactivation of EGFR.....	105
Figure 5. Agonist-dependent cell surface receptor loss of wild-type and mutant receptors. .....	109
Figure 6. Co-localization of $\beta$ -arrestin2 with agonist-activated UT and mutant receptors. .....	111

## Annexe I

Figure 10. Phosphorylation induite par l'agoniste du récepteur de type sauvage et des différents mutants de délétion.....	129
--	-----

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Introduction**

Tableau 1. Comparaison de la séquence primaire de l'urotensine II et de l'URP provenant de diverses espèces. ....	3
---	---

### **Article 1**

Table 1. Affinities and expression of UT receptors mutants expressed in transiently transfected COS-7 cells. ....	66
---	----

### **Article 2**

Table 1. Affinities and expression levels of UT receptor mutants in transiently transfected COS-7 cells. ....	99
Table 2. Summary of results obtained with wild-type and mutant receptors. ....	113

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ACAT-1	Acyl-coenzyme A :cholestérol acyltransférase-1
ACTH	Hormone adrénocorticotropine
$\alpha_{1B}$ AR	Récepteur $\alpha_{1B}$ -adrénergique
Arf	ADP-ribosylation facteur 6
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
$\beta$ 2AR	Récepteur bêta2-adrénergique
cAMP	Adésosine monophosphate 3',5'-cyclique
CaSR	Récepteur du calcium
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
COX	Cyclooxygénase
CTR	Récepteur de la calcitonine
$\delta$ OR	Récepteur delta opioïde
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FSH	Hormone stimulante folliculaire
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanine-nucleotide exchange factor</i>
GIT	<i>GPCR-interacting protein</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéins G

GRK	Kinase spécifique des GPCRs
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
LH	Hormone lutéinisante
M2 mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine M2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MLC	Chaîne légère de la myosine
MMP-1	Métalloprotéase de la matrice extracellulaire-1
moxLDL	<i>Mildly oxidized LDL</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PGE2	Prostaglandine E2
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PPT	Pédonculopontine tegmentale
PTH	Parathormone
PTX	Toxine pertussis
RAMP	<i>Receptor Activity-Modifying Protein</i>

REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RGS	<i>Regulator of G protein signaling</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SST	Somatostatine
TMD	Domaine transmembranaire
TSH	Hormone stimulante de la thyroïde
UII	Urotensine II
URP	<i>Urotensin II-related peptide</i>
V2R	Récepteur V2 de la vasopressine
VIP	Peptide intestinal vasoactif

# RÉSUMÉ

## Analyse des déterminants moléculaires des voies de signalisation du récepteur UT de l'urotensine II.

Par

**Christophe Proulx**

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**

L'urotensine II (UII) est un peptide cyclique de 11 résidus décrit à ce jour comme le plus puissant vasoconstricteur connu. L'UII exerce ses fonctions en liant et en activant le récepteur UT, un GPCR couplé à la protéine  $G\alpha_{q/11}$ . Nous avons montré que l'activation du récepteur UT par son agoniste UII promeut l'internalisation du récepteur dans des cellules COS-7 et HEK-293. Cette internalisation s'effectue principalement via les vésicules tapissées de clathrine. L'utilisation d'un récepteur UT conjugué à la protéine GFP et d'arrestines fonctionnelles conjuguées à la protéine fluorescente YFP a montré, par microscopie confocale, que l'activation du récepteur UT mène à son internalisation dans de larges vésicules intracellulaires et à sa co-localisation avec la  $\beta$ -arrestine1 et la  $\beta$ -arrestine2. Afin de déterminer l'importance de la portion carboxy-terminale dans la signalisation et l'internalisation du récepteur UT, nous avons produit plusieurs mutants de délétion de la queue carboxy-terminale ainsi qu'un mutant où un groupe de quatre sérines adjacentes ont été remplacées par des alanines. Ces constructions nous ont permis de montrer que la délétion des 50 derniers résidus n'affecte pas la capacité du récepteur UT à signaler via la protéine  $G\alpha_{q/11}$  ainsi que vers la voie des ERKs. Nous avons finalement montré l'importance du groupe de sérines, situé dans la portion distale de la queue carboxy-terminale du récepteur UT, afin de promouvoir une internalisation efficace d'UT lors de son activation par son agoniste UII.

Dans la seconde partie du projet de recherche, nous avons examiné le rôle du résidu D97<sup>2.50</sup> ainsi que des résidus E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> et Y149<sup>3.51</sup> du motif ERY dans la fonctionnalité du récepteur UT. Les mutations D97<sup>2.50</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ont aboli la capacité du récepteur UT à activer la PLC alors que les mutations E147<sup>3.49</sup> et Y149<sup>3.51</sup> ont diminué de 50% la capacité à activer la PLC. Aucun des mutants n'a démontré d'activité constitutive. Cependant, les mutants R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ont activé les protéines ERKs, ce qui a été aboli par l'agent AG1478, un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur à l'EGF. Chacun de ces deux mutants est capable d'activer directement le récepteur à l'EGF ce qui démontre qu'ils activent la voie des ERKs par un mécanisme indépendant de la protéine  $G\alpha_{q/11}$ , mais dépendant de la transactivation du récepteur à l'EGF. Les mutants D97<sup>2.50</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H n'internalisent pas et ne colocalisent pas avec la  $\beta$ -arrestine2 lors de leur activation par l'UII. Finalement, l'internalisation du mutant E147<sup>3.49</sup>A a été significativement plus importante que celle du récepteur type-sauvage. Cette deuxième étude souligne la contribution majeure du résidu conservé D97<sup>2.50</sup> dans la fonctionnalité d'UT et le rôle central joué par le résidu R<sup>3.50</sup> dans la signalisation protéine G-dépendante ou -indépendante.

# INTRODUCTION

## 1. SYSTÈME UROTENSINE II / RÉCEPTEUR UT

### 1.1. Survol historique :

Initialement identifié à partir d'un organe neurosécrétoire situé dans la partie caudale de la moëlle épinière de poisson téléostéen, l'urophyse, l'urotensine II (UII) a longtemps été considérée comme un composé exclusif de cette espèce. Chez l'anguille, l'UII est capable de produire une réponse hypertensive associée avec une diurèse et une augmentation du rythme cardiaque. Chez le gobie, elle stimule le transport d'ions à travers la vessie et l'intestin, inhibe l'efflux des ions chlore de la peau et contracte le canal déférent. Chez la truite, l'UII contracte le rectum et la vessie. L'UII est, de façon plus générale, reconnue comme un peptide impliqué dans la régulation du système cardiovasculaire, aussi bien périphérique que central, et dans l'osmorégulation chez le poisson. La réalisation que l'UII n'était pas uniquement une curiosité particulière à un organe (urophyse) appartenant à un organisme spécifique (poisson) est venue de l'identification de ce peptide chez diverses autres espèces allant d'organismes moins évolués comme l'agnatha, en passant par le tétrapode jusqu'à l'identification de l'UII chez des mammifères comme le porc, le rat, la souris et l'humain.

Comme il sera décrit ci-après, l'UII est maintenant reconnue comme un important régulateur de divers processus physiologiques chez les mammifères. De plus, il est clair

que l'UII est impliquée dans diverses situations pathophysiologiques chez l'humain, particulièrement associées aux systèmes cardiovasculaire et rénal.

## **1.2. L'Urotensine II et l'URP: Structure et localisation**

L'UII chez l'humain est un peptide cyclique de onze résidus (Tableau 1). L'UII retrouvée chez le poisson, l'amphibien et chez diverses espèces de mammifères sont tous caractérisés par leur portion carboxy-terminale cyclique de six résidus strictement conservés (CONLON, 2008). À noter que cette portion conservée est la région minimale conférant l'activité biologique de ce peptide (LABARRERE *et al.*, 2003). L'UII possède également le triplet FWK à l'intérieur de sa portion cyclique qui lui confère une certaine homologie avec la somatostatine (forme S14 et S28) (PEARSON *et al.*, 1980). La forme mature de l'UII est produite suite au clivage d'un précurseur, la prépro-urotensine II (CHARTREL *et al.*, 2004; DUBESSY *et al.*, 2008). Deux variants d'épissage ont été clonés chez l'humain où des séquences de 124 et 139 résidus en ont été déduites (AMES *et al.*, 1999; COULOUARN *et al.*, 1998). La séquence mature de l'UII est vraisemblablement produite suite au clivage par les proprotéines convertases PC1 ou PC2 (BERGERON *et al.*, 2000).

Des analyses de RT-PCR ont montré une expression quasi ubiquitaire de l'UII aussi bien en périphérie qu'au niveau central. De façon importante, l'ARNm du précurseur prépro-UII est retrouvé au niveau du cœur, de l'aorte, des cellules endothéliales vasculaires, du cerveau, de la moelle épinière, des reins, du foie, des glandes surrénales, du pancréas, de la rate, du petit intestin, du colon et du placenta. L'expression la plus élevée se retrouve au



**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)

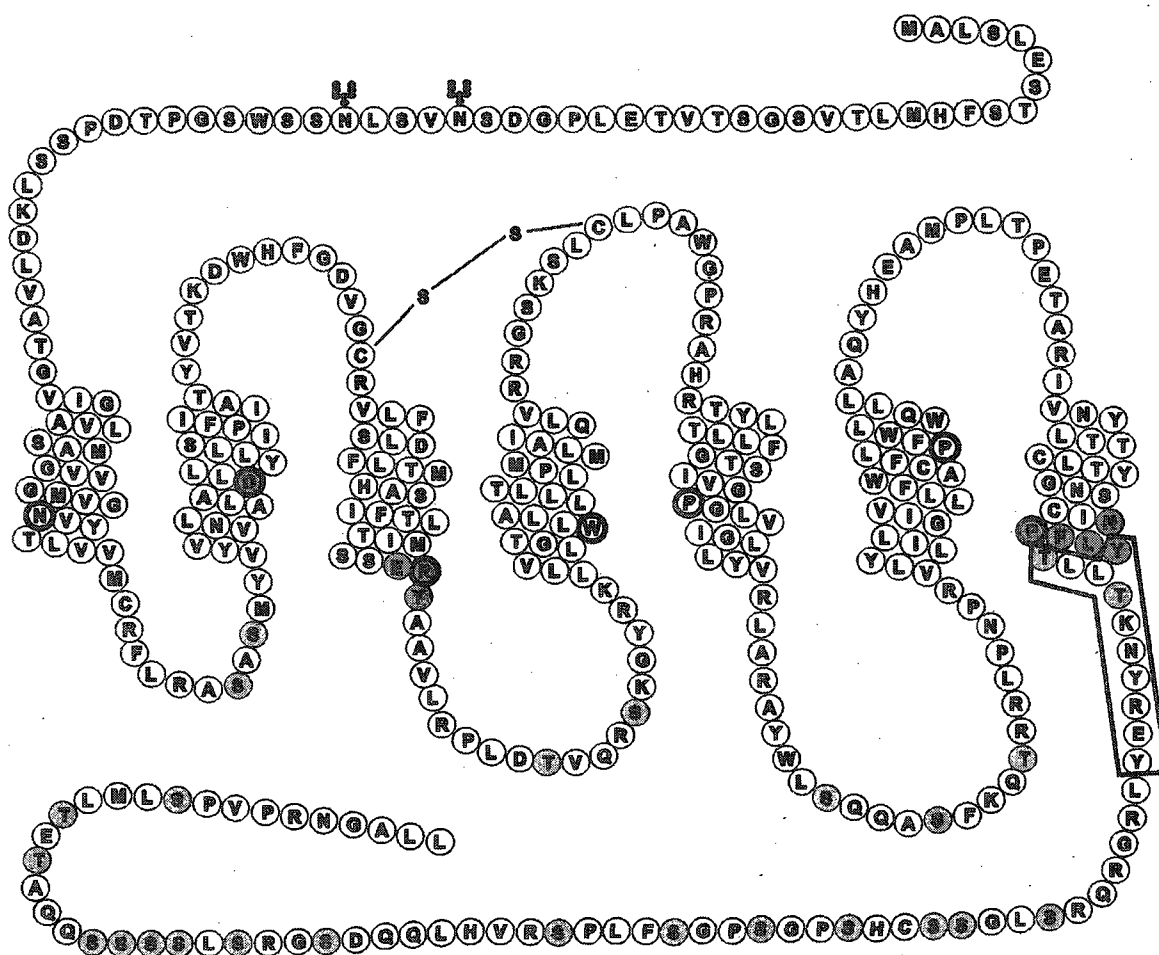
Espèces	Séquences
<b>UII</b>	
Lamproie eau mer	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Lamproie eau douce	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Fugu	H-Thr-Gly-Asn-Asn-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Skate	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Roussette	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Esturgeon	H-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson-spatule	H-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Goby	H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson zèbre α	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poisson zèbre β	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Sucker A	H-Gly-Ser-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Sucker B	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe α	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe β1	H-Gly-Gly-Asn-Thr-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe β2	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Carpe γ	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-CH
Flet	H-Ala-Gly-Thr-Thr-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Truite	H-Gly-Gly-Asn-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Grenouille	H-Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Poulet	H-Gly-Asn-Leu-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Souris	<Gly-His-Lys-Gly-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-CH
Rat	<Gly-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-CH
Porc A	H-Gly-Pro-Thr-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Porc B	H-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Vache	H-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Singe	H-Gly-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Humain	H-Gly-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-Gly-Asn-CH
Poulet	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-CH
Souris	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Rat	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH
Humain	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-CH

niveau de la moëlle épinière (COULOUARN *et al.*, 1998; MATSUSHITA *et al.*, 2001; SUGO *et al.*, 2003; TOTSUNE *et al.*, 2003; TOTSUNE *et al.*, 2001). Récemment, à partir de cerveaux de rat, un peptide ayant une immunoréactivité "UII-like" a été isolé et purifié (SUGO *et al.*, 2003). Ce peptide "UII-like" est composé de huit résidus et possède la portion cyclique caractéristique conservée chez l'UII (Tableau 1). Ce peptide a donc été désigné URP pour "*UII-related peptide*". Les gènes codant pour les précurseurs humain, de rat, de souris et de poulet ont été clonés et possèdent respectivement 119, 118, 113 et 124 résidus (SUGO et MORI, 2008). L'URP lie et active le récepteur de l'UII de rat et humain et provoque une réponse hypotensive lorsque administré chez le rat anesthésié. L'ARNm de l'URP a été identifié dans plusieurs tissus périphériques et centraux chez le rat et l'humain. Des analyses d'hybridation *in situ* ont également révélé la présence d'URP dans les neurones moteurs de la moëlle épinière de la souris (PELLETIER *et al.*, 2005).

### 1.3. Récepteur de l'urotensine II : Structure et localisation

Quelques groupes ont identifié simultanément le récepteur orphelin GPR14 (également connu comme le "sensory epithelium neuropeptide-like receptor", SENR) comme étant le récepteur responsable des actions de l'UII (AMES *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 1999). L'UII exerce donc ses fonctions via l'activation de son récepteur, maintenant connu sous le nom de récepteur UT (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2444>). Le récepteur UT est un récepteur à sept domaines transmembranaires (TMD) couplé à la protéine hétérotrimérique  $G\alpha_{q/11}$  et fait donc partie de la famille des GPCRs (*G protein-coupled*

*receptors*) (AMES *et al.*, 1999). Les hélices transmembranaires sont reliées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires (Figure 1). Le récepteur UT possède deux sites de glycosylation dans sa portion amino-terminale extracellulaire et deux cystéines, dans la première et la deuxième boucle extracellulaire, potentiellement impliquées dans la formation d'un pont disulfure. Ce récepteur possède certains résidus et motifs conservés qui permettent de le classer parmi les récepteurs de classe A, donc ayant une forte homologie avec la rhodopsine et le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique ( $\beta$ 2AR). Le récepteur UT possède donc, comme les GPCRs de classe A, un résidu conservé dans chacun de ses domaines transmembranaires, particulièrement un aspartate dans le deuxième domaine transmembranaire (TMD2 :transmembrane domain 2), un motif ERY (Glu/Arg/Tyr) à la jonction du TMD3 et de la deuxième boucle intracellulaire et un motif NPxxY (où x représente n'importe quel résidu) situé dans le TMD7 (ONAN *et al.*, 2004a). Dans sa portion cytoplasmique (chacune des trois boucles intracellulaires et la queue carboxy-terminale), le récepteur UT possède plusieurs sérines et thréonines, sites putatifs de phosphorylation impliqués dans les mécanismes de désensibilisation du récepteur (ONAN *et al.*, 2004a). Parmi ceux-ci, on retrouve des sites consensus de phosphorylation pour la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC), la caséine kinase 1 (CK1) et la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3). Dans la queue carboxy-terminale du récepteur UT, on retrouve aussi un groupe de sérines généralement reconnu et phosphorylé par une famille de kinases spécifiques aux GPCRs (*G protein-coupled receptor kinases*: GRKs) (ONAN *et al.*, 2004a). Le récepteur UT de rat possède également un motif putatif de liaison à la cavéoline ( $\Phi$ x $\Phi$ xxxx $\Phi$ xx $\Phi$ , où  $\Phi$  est un résidu hydrophobe et x est n'importe quel résidu) similaire à celui présent dans le récepteur AT<sub>1</sub>



**Figure 1. Représentation schématique du récepteur UT.**

Le récepteur UT possède sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Les résidus encadrés en gras sont les résidus les mieux conservés dans chacun des TMDs. Les résidus putatifs de phosphorylation sont illustrés en vert. Le résidu aspartate conservé dans le TMD2 et les motifs ERY et NPxxY sont illustrés en rouge. Les sites de glycosylation et le pont disulfure sont également illustrés. Le site de liaison à la cavéoline est encadré.

de l'angiotensine II (LECLERC *et al.*, 2002). À l'extrémité de sa portion carboxy-terminale, le récepteur UT possède aussi un motif dileucine qui pourrait jouer un rôle dans le routage intracellulaire du récepteur (GABILONDO *et al.*, 1997). Des études de RT-PCR, d'hybridation *in situ*, d'immunocytochimie ainsi que des essais de liaison ont montré une distribution pratiquement généralisée du récepteur UT aussi bien au niveau du système nerveux central qu'en périphérie (AMES *et al.*, 1999; JEGOU *et al.*, 2006; MAGUIRE *et al.*, 2000; MAGUIRE *et al.*, 2008; MAGUIRE *et al.*, 2004). Le récepteur UT est particulièrement retrouvé au niveau du cerveau, de la moelle épinière, du myocarde ventriculaire, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales vasculaires, du cortex rénal, de la glande surrénale, de l'hypophyse et de la thyroïde. Des études d'immunocytochimie et de liaison avec l'UUI-I<sup>125</sup> ont révélé que l'expression la plus élevée d'UT chez l'humain est retrouvée au niveau des muscles squelettiques et du cortex cérébral (MAGUIRE *et al.*, 2000; MAGUIRE *et al.*, 2008). L'expression de l'UUI et de son récepteur UT suggère que l'UUI agirait, soit localement, soit comme une hormone circulante vasoactive, dans la régulation du système cardiovasculaire.

## **1.4. Signalisation intracellulaire du récepteur UT**

### **1.4.1. Couplage aux protéines G hétérotrimériques:**

Le récepteur UT est couplé à la protéine hétérotrimérique  $G_{\alpha_q/11}$ , donc son activation entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC), l'hydrolyse du phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) et la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2000). L'IP<sub>3</sub> active un récepteur-canal

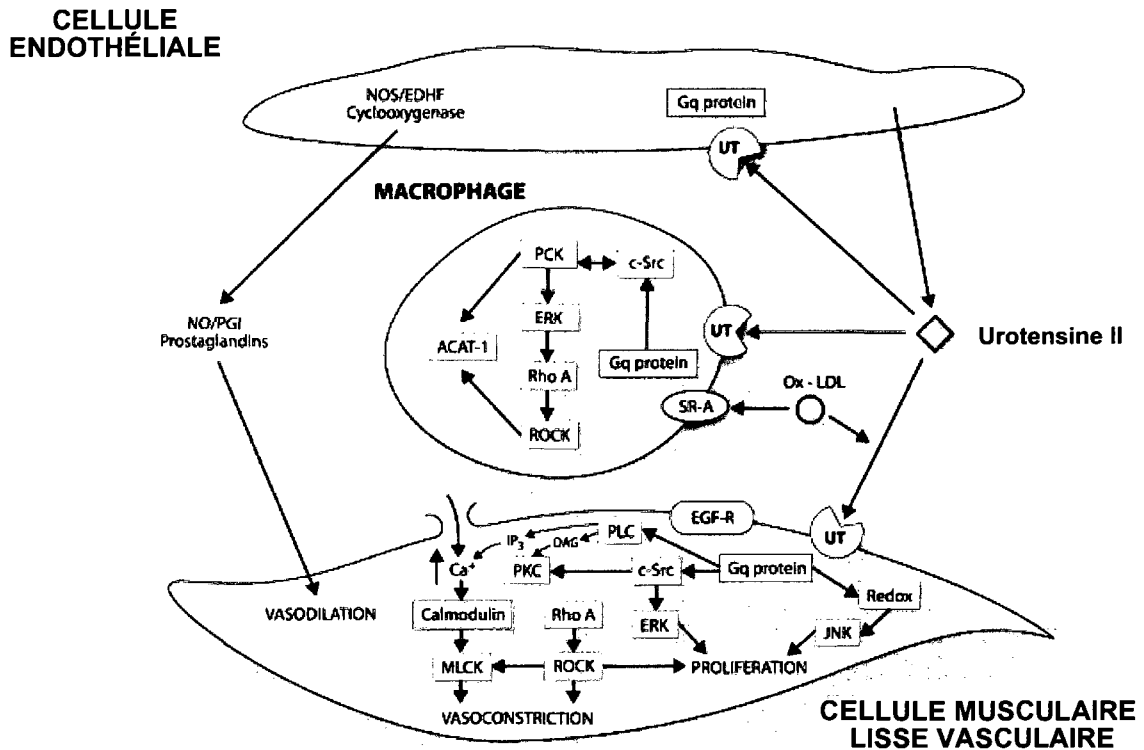
situé au niveau du réticulum endoplasmique et permet ainsi la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol (AMES *et al.*, 1999). Quelques évidences montrent que le récepteur UT peut également activer la protéine hétérotrimérique  $\text{G}\alpha_{i/o}$ . Le récepteur UT active aussi la voie des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), spécifiquement celle des protéines ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase 1/2*) (ZILTENER *et al.*, 2002). La toxine pertussis (PTX), qui inhibe la protéine  $\text{G}\alpha_{i/o}$  par un processus d'ADP-ribosylation, diminue l'activation de la voie des MAPKs par le récepteur UT (ZILTENER *et al.*, 2002). Dans une lignée cellulaire de rhabdomyosarcome humain (SJRH30) exprimant de façon endogène le récepteur UT, la PTX diminue la réponse calcique induite par le récepteur UT (DOUGLAS *et al.*, 2004b). Le récepteur UT active également, de façon Rho-dépendante, la contraction, la réorganisation du cytosquelette et la prolifération des cellules vasculaires lisses aortiques (SAUZEAU *et al.*, 2001). Bien que l'activation de la voie Rho soit généralement associée au couplage et à l'activation de la protéine hétérotrimérique  $\text{G}\alpha_{12/13}$  (BUHL *et al.*, 1995; GOHLA *et al.*, 1999), quelques études ont clairement démontré l'implication de la voie  $\text{G}\alpha_{q/11}$  dans la signalisation vers Rho (DUTT *et al.*, 2002; HIRSHMAN et EMALA, 1999). Le récepteur UT pourrait donc être couplé à la protéine  $\text{G}\alpha_{12/13}$  en plus des protéines  $\text{G}\alpha_{q/11}$  et  $\text{G}\alpha_{i/o}$ . Par contre, le couplage aux protéines  $\text{G}\alpha_{12/13}$  n'est toujours pas démontré.

#### **1.4.2. Mécanismes de signalisation impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire**

L'une des actions les mieux connues et caractérisées de l'UII est la régulation du système cardiovasculaire dans des conditions normales et pathophysiologiques. L'UII a

d'abord été caractérisée comme le plus puissant vasoconstricteur, capable de faire contracter l'aorte de rat plus efficacement que l'endothéline-1, la noradrénaline ou la sérotonine (AMES *et al.*, 1999). L'Ull s'est également avérée un puissant vasoconstricteur de plusieurs lits artériels chez les mammifères, y compris chez l'humain (DOUGLAS et OHLSTEIN, 2000). Bien que l'Ull soit artério-sélectif chez toutes les espèces de mammifères étudiées jusqu'à maintenant, ce peptide a démontré une certaine capacité à faire contracter certains vaisseaux veineux chez l'humain (DOUGLAS et OHLSTEIN, 2000). La vasoconstriction médiée par le récepteur UT est soutenue et pratiquement irréversible pendant plusieurs heures même suite à un lavage efficace (CAMARDA *et al.*, 2002). Le mécanisme par lequel l'Ull active la contraction des muscles lisses est complexe. Comme mentionné ci-haut, le récepteur UT provoque une élévation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (AMES *et al.*, 1999) (Figure 2). La vasoconstriction médiée par l'Ull implique également l'activation de tyrosine kinases, de la p38MAPK, des protéines ERK1/2, de RhoA/ROCK et du système PKC/CPI-17 (PAPADOPOULOS *et al.*, 2008; ROSSOWSKI *et al.*, 2002; RUSSELL et MOLENAAR, 2004; SAUZEAU *et al.*, 2001; TASAKI *et al.*, 2004). RhoA/ROCK et le système PKC/CPI-17 sont particulièrement impliqués dans les mécanismes de sensibilisation au  $Ca^{2+}$  menant à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) (SOMLYO et SOMLYO, 2003). Il est donc possible que la forte vasoconstriction médiée par l'Ull soit la conséquence d'une forte sensibilisation au  $Ca^{2+}$ , ce qui pourrait expliquer que l'Ull soit le plus puissant agent inotropique connu (RUSSELL *et al.*, 2001).

Chez le rat, l'Ull agit comme vasodépresseur lorsque administré de façon systémique en plus d'agir comme vasodilatateur sélectif de certains vaisseaux artériels humains comme



**Figure 2. Résumé des voies de signalisation activées par l'UII dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales et les macrophages.**

EGF-R, epidermal growth factor receptor; ACAT-1, acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1; ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein; SRA, scavenger receptor class A; PKC, protéine kinase C; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PLC, phospholipase C; ROCK, Rho kinase; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-trisphosphate; DAG, diacylglycerol; MLCK, myosin light chain kinase; NO, nitric oxide; PGI<sub>2</sub>, prostacycline.

Figure modifiée de Papadopoulos, P. *et al.* (2008)



les artères de résistance pulmonaires et abdominales et les artères coronaires (GARDINER *et al.*, 2001; KATANO *et al.*, 2000; STIRRAT *et al.*, 2001). Cette vasodilatation est dépendante de la présence de l'endothélium et est médiée par l'activation de la *nitric-oxide synthase* (NOS) et la relâche d'oxide nitrique (NO) (ABDELRAHMAN et PANG, 2002; BOTTRILL *et al.*, 2000; LACZA et D, 2006; LIN *et al.*, 2004). De plus, ISHIHATA *et al.*, (2005) ont récemment montré que la prostacycline et PGE2 sont aussi impliquées dans les mécanismes de vasodilatation médiés par l'UII.

### **1.4.3. Signalisation du récepteur UT dans le développement de pathophysiologies du système cardiovasculaire : rôle central de la voie des MAPKs.**

Plusieurs pathologies du système cardiovasculaire chez l'humain ont comme caractéristique une élévation des niveaux plasmatiques d'UII. Ainsi, les personnes souffrant d'hypertension systémique, de maladie cardiaque ischémique, de trouble cardiaque congestif, d'insuffisance rénale et d'hypertension portale due à une cirrhose du foie ont des niveaux plasmatiques d'UII significativement plus élevés que les sujets sains (BOUSETTE *et al.*, 2006; CHEUNG *et al.*, 2004; GRUSON *et al.*, 2006; HELLER *et al.*, 2002; ONG *et al.*, 2005). L'UII est également impliquée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes (ONAN *et al.*, 2004b; ZOU *et al.*, 2001), dans la production de matrice extracellulaire (TZANIDIS *et al.*, 2003) et dans le développement des plaques athérosclérotiques (BOUSETTE *et al.*, 2004; MAGUIRE *et al.*, 2004; SEGAIN *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2005). L'UII augmente la prolifération des cellules musculaires lisses, en synergie avec l'action de la 5-HT et de moxLDL (*mildly oxidized*

*LDL*) (WATANABE *et al.*, 2001a; WATANABE *et al.*, 2001b). L'UII augmente aussi la prolifération des fibroblastes cardiaques (DAI *et al.*, 2006). Il a récemment été montré que l'UII est un chimioattractant pour les monocytes qui expriment le récepteur UT (SEGAIN *et al.*, 2007). Les voies de signalisation impliquées dans ces phénomènes sont complexes et impliquent la protéine kinase C (PKC), la tyrosine kinase c-src, la transactivation du récepteur à l'EGF, RhoA/ROCK et la voie des MAPKs (Figure 2). La voie des MAPKs a spécifiquement été impliquée dans plusieurs processus incluant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et des voies respiratoires (CHEN *et al.*, 2000; MATSUSAKA et WAKABAYASHI, 2006), la prolifération des fibroblastes (MATSUSAKA et WAKABAYASHI, 2006), la formation des cellules spumeuses dérivées des macrophages (WATANABE *et al.*, 2005), l'expression de MMP-1 et la synthèse de collagène-1 dans les HUVECs (WANG *et al.*, 2004), l'hypertrophie des cardiomyocytes (WANG *et al.*, 2004) et possiblement la sensibilisation au  $Ca^{2+}$  durant la contraction musculaire (TASAKI *et al.*, 2004). À la lumière de ces constatations, il est fort probable que l'activation de la voie des MAPKs médiée par le récepteur UT a des effets majeurs dans des conditions normales et/ou pathologiques du système cardiovasculaire chez l'humain.

## **1.5. Actions physiologiques de l'UII**

### **1.5.1. Actions périphériques :**

#### **1.5.1.1. Régulation du système cardiovasculaire**

L'une des caractéristiques de l'UII est la variabilité de ses effets sur le système cardiovasculaire non seulement d'une espèce à l'autre, mais également d'un tissu à l'autre à l'intérieur d'une même espèce (DOUGLAS *et al.*, 2000). Par exemple, des essais de contraction d'aorte ont démontré que l'UII est le plus puissant vasoconstricteur connu (AMES *et al.*, 1999; DOUGLAS *et al.*, 2000). Par contre, l'UII n'a aucun effet sur l'aorte de souris (DOUGLAS *et al.*, 2000). In vivo, l'injection d'UII chez le singe anesthésié provoque un collapsus circulatoire fatal. Ce dernier est caractérisé par un fort dysfonctionnement cardiovasculaire, par une vasoconstriction artérielle systémique qui se traduit par une augmentation de la résistance périphérique et par une altération de la contractilité du muscle cardiaque qui a comme conséquence de diminuer le volume d'éjection cardiaque (AMES *et al.*, 1999). Par contre, l'injection systémique d'UII chez le rat conscient se traduit par une chute de pression artérielle moyenne due à une vasodilatation des vaisseaux artériels de la région postérieure (pattes arrières), mécanisme impliquant l'activation de la NOS et de la COX (GARDINER *et al.*, 2001; GARDINER *et al.*, 2006). Chez l'humain, l'injection d'UII a produit des résultats qui ne sont pas consistants d'une étude à l'autre. Ainsi, l'étude de Bohm et Pernow (BOHM et PERNOW, 2002) montre que l'infusion d'UII au niveau de l'artère brachiale provoque, de façon dose-dépendante, une réduction du flux sanguin au niveau de l'avant bras alors que des études similaires de Wilkinson *et al.* (2002) et d'Affolter *et al.* (2002) n'ont montré aucun changement au niveau des paramètres hémodynamiques. Les raisons de cette disparité ne sont pas connues, mais elles pourraient être reliées à la différence d'âge des sujets entre les deux études (~ 24 ans dans l'étude de Bohm et Pernow contre ~ 37 ans pour l'étude de Wilkinson *et al.*) (RUSSELL, 2004).

### **1.5.1.2. Régulation du système rénal**

En plus d'être fortement exprimés au niveau de plusieurs tissus du système cardiovasculaire, le récepteur UT et son ligand UII sont également présents au niveau des reins chez l'humain (ASHTON, 2006). De fait, il semble que le rein soit la majeure source d'UII plasmatique et urinaire chez les mammifères (ASHTON, 2006). L'UII pourrait avoir un rôle à jouer dans la régulation de la filtration glomérulaire. L'infusion d'UII dans l'artère rénale chez le rat anesthésié augmente le débit sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire (SHENOUDA *et al.*, 2002), mécanisme complètement inhibé par l'inhibition de la NOS (ZHANG *et al.*, 2003). Cependant, le rôle exact de l'UII dans la régulation du système rénal chez l'humain demeure toujours à être caractérisé.

### **1.5.2. Actions centrales de l'UII**

Comme mentionné plus haut, l'UII et son récepteur UT sont largement distribués au niveau du système nerveux central (NOTHACKER et CLARK, 2005). De façon générale, l'injection d'UII au niveau central mène à une réponse hypertensive et à une tachycardie chez le rat (LIN *et al.*, 2003a; LIN *et al.*, 2003b). Chez la brebis, l'injection centrale d'UII mène à une augmentation des niveaux d'ACTH et d'adrénaline, première constatation évidente du rôle du système UII/UT dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, en plus de promouvoir des actions chronotropique et inotropique sur le coeur (WATSON *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que l'UII pourrait être impliquée dans les mécanismes de réponse aux stimuli d'alerte ou de stress (WATSON *et al.*, 2003).

Finalement, l'UII pourrait également jouer un rôle dans la régulation du cycle éveil-sommeil. Ainsi, Huitron-Resendiz *et al.* (2005) ont montré que l'injection d'UII directement au noyau tegmental pédonculopontin (PPT), centre d'une grande importance dans le contrôle du sommeil paradoxal chez les mammifères, augmente l'activité des neurones cholinergiques et altère ainsi les périodes de sommeil paradoxal chez le rat. Ces résultats suggèrent que l'UII est un neurotransmetteur/neuromodulateur chez les mammifères.

## **2. LA GRANDE FAMILLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G (GPCRs)**

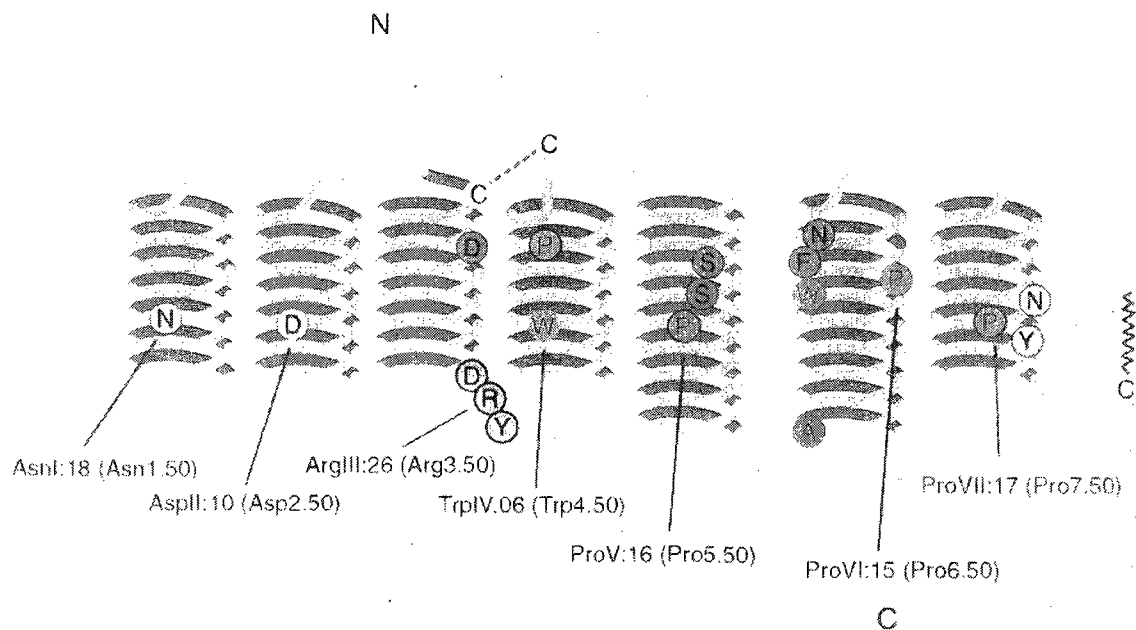
L'évolution des organismes multicellulaires a grandement été dépendante de la capacité développée par les cellules à communiquer entre elles (BOCKAERT et PIN, 1999). Ainsi, l'expression de récepteurs à leur surface a permis aux cellules de réagir à leur environnement en transmettant différents signaux extracellulaires vers l'intérieur par un phénomène que l'on nomme la transduction du signal. Parmi les récepteurs exprimés à la surface des cellules, on retrouve la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs). La superfamille des GPCRs est l'une des plus importantes et des plus diverses familles de protéines exprimées chez les mammifères (BOCKAERT et PIN, 1999). Chez les vertébrés, cette famille de protéines comprend entre 1000-2000 membres (représentant généralement >1% du génome) dont la majeure partie sont des récepteurs gustatifs et olfactifs (BOCKAERT et PIN, 1999). Chez le ver *Caenorhabditis elegans*, plus de 5% du

génomique code pour un GPCR ce qui représente approximativement 1100 récepteurs (BARGMANN, 1998). L'achèvement du séquençage du génome humain a permis de révéler les séquences de presque tous les GPCRs, y compris certains dont la fonction est inconnue et/ou dont le ligand est inconnu (LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001). Actuellement, on estime que le génome humain contient approximativement 865 gènes de la superfamille des GPCRs ce qui code pour plus de 1% du génome chez l'humain (FREDRIKSSON et SCHIOTH, 2005; KRISTIENSEN, 2004). Parmi ceux-ci, 478 encodent des GPCRs olfactifs ou gustatifs (ZOZULYA *et al.*, 2001). Donc, le reste, soit environ 375, encodent des GPCRs pour des ligands endogènes (FREDRIKSSON *et al.*, 2003; VASSILATIS *et al.*, 2003). De ce nombre, plus de 180 sont toujours définis comme récepteurs orphelins c'est-à-dire qu'aucun ligand n'a été associé à ces récepteurs jusqu'à maintenant (VASSILATIS *et al.*, 2003).

La diversité chimique des différents ligands endogènes des GPCRs est exceptionnelle. Parmi ces ligands on retrouve des amines biogènes, des peptides, des glycoprotéines, des lipides, des nucléotides, des ions ou des protéases (BOCKAERT et PIN, 1999). De plus, la sensation de différents stimuli extérieurs comme la lumière, les odeurs et le goût est perçue via l'activation de GPCRs (HOON *et al.*, 1999). Considérant le nombre imposant de différents GPCRs chez l'humain, il est facile de s'imaginer que cette famille de récepteurs soit impliquée dans une panoplie de fonctions biologiques. D'ailleurs, plus de 25% des médicaments vendus sous ordonnances ciblent un GPCR de classe A uniquement, ce qui démontre une fois de plus leur importance dans la régulation de l'homéostasie chez l'humain (OVERINGTON *et al.*, 2006).

## 2.1. Structure et classification des GPCRs

En plus de la grande variabilité caractéristique aux différents ligands des GPCRs, il existe également une variabilité de séquence énorme entre les récepteurs de cette famille. En fait, il existe très peu d'homologie de séquence entre les GPCRs. Dans les faits, deux exigences sont requises afin d'être reconnu comme GPCR. La première exigence est reliée à la présence de sept domaines étendus d'environ 25 à 35 acides aminés démontrant un certain degré d'hydrophobicité. Ces domaines forment essentiellement 7 hélices  $\alpha$  qui traversent la membrane plasmique dans un sens anti-horaire formant ainsi le corps du récepteur (Figure 3). Les domaines transmembranaires (TMDs) sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires de longueurs variables. La portion amino-terminale des GPCRs se retrouve à l'extérieur des cellules alors que la portion carboxy-terminale est cytoplasmique. Les boucles intra- et extracellulaires sont également de longueurs variables. À noter également que la majorité des GPCRs ont deux résidus cystéines situés dans la première et la deuxième boucle extracellulaire qui forment un pont disulfure, vraisemblablement impliqué dans la stabilisation d'un nombre restreint de conformations. La deuxième exigence est la capacité de ces récepteurs à coupler et à activer une protéine G. Ainsi l'activation de ces protéines G constitue la principale voie de signalisation reconnue pour les différents GPCRs. Toutefois, plusieurs évidences ont démontré que les GPCRs peuvent également transmettre leur signaux vers l'intérieur de la cellule indépendamment des protéines G via l'interaction avec diverses protéines cytosoliques, les plus connues étant les arrestines (BRZOSTOWSKI et KIMMEL, 2001) (nous reviendrons plus tard sur cette famille de protéines). Plusieurs classifications ont tenté de



**Figure 3. Modèle en deux dimensions du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique illustrant les principales caractéristiques d'un GPCR appartenant à la classe A.**

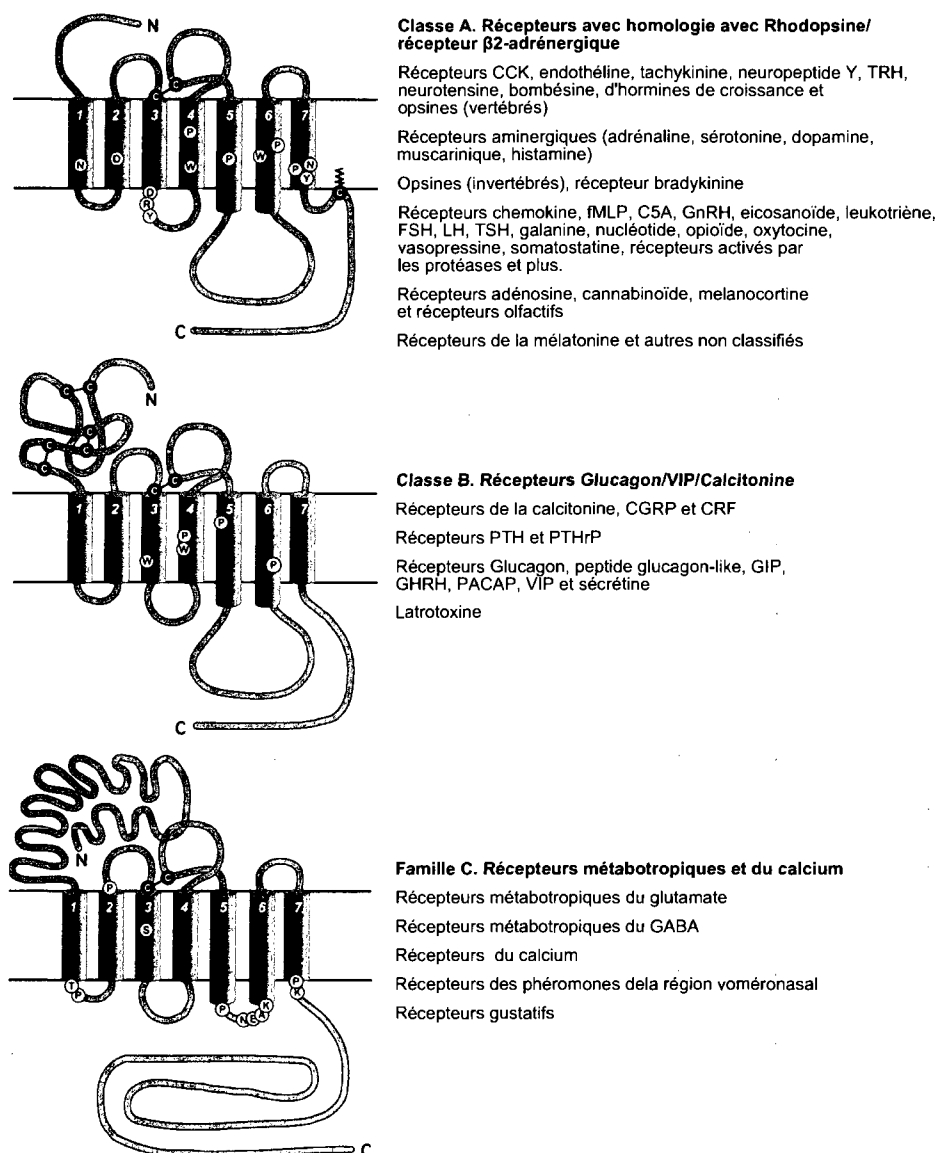
Chacun des résidus les plus conservés de chacun des TMDs sont indiqués avec la nomenclature de Schwartz (voir (SCHWARTZ, 1994)) et de Ballesteros-Weinstein (BALLESTEROS et WEINSTEIN, 1995). Une série de tryptophanes et de prolines sont illustrées en bleu. Le pont disulfure entre la première et la deuxième boucle extracellulaire ainsi que le site de palmitoylation sont illustrés en blanc. Les résidus impliqués dans la liaison de l'épinéphrine sont montrés en rouge (STRADER *et al.*, 1995). La mutation de l'Ala293 du récepteur  $\alpha_1b$  mène à une activité constitutive (KJELSBERG *et al.*, 1992).

Figure tirée de Gether, U. (1998)



trier les membres de la superfamille des GPCRs. Certains ont groupé ces récepteurs par leur façon de lier leurs ligands et d'autres par leurs caractéristiques physiologiques et structurelles. La classification la plus souvent employée catégorise les GPCRs par classe (ou famille) (A, B, C, D, E et F) (GETHER, 2000). Cette classification permet alors d'associer les différents GPCRs selon leur homologie de séquence. Les trois classes majeures sont : la classe A regroupant les récepteurs associés à la rhodopsine et au récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, la classe B regroupant les récepteurs associés au récepteur de la sécrétine et la classe C regroupant les récepteurs reliés aux récepteurs métabotropiques du glutamate (Figure 4) (GETHER, 2000). Les récepteurs des phéromones chez la levure forment deux familles mineures, la famille D (Ste2) et la famille E (Ste3).

Chez *Dictyostelium discoideum*, il existe quatre différents récepteurs du cAMP qui forment une classe mineure et unique de GPCRs (classe F). À noter qu'aucun membre des classes D, E et F n'est retrouvé chez l'humain (GETHER, 2000). Les travaux de Fredriksson *et al.* (2003) ont également permis de définir deux derniers groupes de récepteurs, soit la famille des récepteurs d'adhésion et la famille des récepteurs Frizzled. La famille des récepteurs d'adhésion forme une classe particulière de GPCRs ayant le corps de sept TMDs caractéristique aux GPCRs, fusionné avec un ou plusieurs domaines fonctionnels en N-terminal possédant des motifs *Adhesion-like* comme des répétitions *EGF-like*, des régions *mucin-like* et des motifs conservés riches en cystéines (HAYFLICK, 2000). Les récepteurs Frizzled contrôlent la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que la polarité lors du développement du métazoaire en traduisant les signaux des glycoprotéines nommées Wnt (EISENMANN, 2005).



**Figure 4. Représentation schématique des récepteurs de classe A, B et C.**

Les GPCRs sont divisés en trois classes majeures et une représentation de chacun d'eux est montrée. Chacune des classes peut être subdivisée en différents sous-groupes comme indiqué. Les GPCRs de chaque classe ont certains résidus et motifs conservés représentés par les lettres blanches dans les cercles noirs. Les caractéristiques de chacune des classes sont décrites dans le texte.

Figure modifiée de Gether, U. (2000)

### **2.1.1. GPCRs de classe A**

Les récepteurs de la classe A sont les plus nombreux et les mieux caractérisés. L'homologie générale des récepteurs de cette famille est assez faible et restreinte à la présence de certains résidus et motifs clés grandement conservés chez cette classe de récepteurs. La grande conservation de ces résidus et motifs suggère que ceux-ci ont vraisemblablement des rôles essentiels dans l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de ces récepteurs.

#### **2.1.1.1. Nomenclature de Ballesteros et Weinstein**

Afin de faciliter la comparaison des différents résidus de chacun des GPCRs de classe A, une nomenclature a été proposée. La nomenclature la plus utile et la plus utilisée est celle proposée par Ballesteros et Weinstein (BALLESTEROS et WEINSTEIN, 1995). Ainsi, le résidu le plus conservé de chaque segment transmembranaire se voit attribuer le nombre 50 (Figure 3). Chacun des autres résidus est alors annoté en fonction de sa position par rapport à ce résidu conservé. Par exemple, la position 6.55 indique le résidu situé dans le TMD6, cinq résidus vers la portion carboxy-terminale du résidu proline 6.50 (P<sup>6.50</sup>), le résidu le plus conservé dans le TMD6. Cette annotation sera utilisée tout au long de cette thèse.

Parmi les résidus les mieux conservés chez la classe A des GPCRs, on retrouve un aspartate dans le TMD2 (D<sup>2.50</sup>), un résidu arginine à la jonction du TMD3 et de la

deuxième boucle intracellulaire (R<sup>3.50</sup>) et une proline dans le TMD7 (P<sup>7.50</sup>). R<sup>3.50</sup> fait partie d'un motif conservé E/DRY alors que P<sup>7.50</sup> fait partie d'un motif conservé NPxxY (ou x représente n'importe lequel des résidus). Les ligands de la majorité des GPCRs de classe A se lient dans une pochette de liaison à l'intérieur des TMDs (SCHWARTZ *et al.*, 2006). Il existe cependant quelques exceptions à cette règle, en particulier dans le cas des récepteurs des glycoprotéines (LH, FSH, TSH) où le site de liaison est plutôt localisé dans la portion amino-terminale des récepteurs (MOYLE *et al.*, 2005).

### 2.1.2. GPCRs de classe B

Les récepteurs de classe B dont le prototype est le récepteur de la sécrétine, lient des peptides relativement gros partageant une forte homologie dans leur séquence en acides aminés et agissant généralement de façon paracrine (FREDRIKSSON *et al.*, 2003). Les récepteurs de cette famille possèdent une longue portion amino-terminale d'environ 100 résidus et contenant plusieurs ponts disulfures. Cette portion est très importante pour la liaison du ligand. Parmi les membres de cette famille on retrouve, entre autres, les récepteurs pour le glucagon, le VIP (*vasoactive intestinal peptide*), la calcitonine, la PTH (parathormone) et le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*).

Les membres de cette classe de GPCRs ont comme caractéristique particulière de former des hétérodimères avec les membres d'une famille de protéines nommés RAMP (*Receptor Activity-Modifying Protein*). Les RAMPs forment une petite famille de trois protéines transmembranaires de 148, 175 et 148 acides aminés (RAMP1, RAMP2 et RAMP3 respectivement). Les RAMPs possèdent un long segment extracellulaire, un domaine transmembranaire et une courte séquence intracellulaire (HAY *et al.*, 2006). La

fonction classique attribuée à cette famille de protéines est de moduler les propriétés pharmacologiques du récepteur de la calcitonine (CTR) (HAY *et al.*, 2006). Ainsi, le dimère CTR/RAMP1 est un récepteur de haute affinité pour le CGRP (*calcitonin-gene related peptide*) alors qu'en présence de RAMP2, le dimère forme un récepteur de haute affinité pour l'amyline et son affinité pour le CGRP est diminué de 100 fois (HAY *et al.*, 2006). Cependant, il est maintenant reconnu que les membres de cette famille de protéines ubiquitaires, en plus de jouer le rôle de modulateur pharmacologique, sont également impliqués dans la régulation de la signalisation et du routage non seulement du récepteur de la calcitonine, mais de plusieurs autres GPCRs de classe B (HAY *et al.*, 2006).

### 2.1.3. GPCRs de classe C

Les GPCRs de classe C regroupent les récepteurs des neurotransmetteurs glutamate et acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), de l'ion calcium, de quelques molécules phéromones et les récepteurs gustatifs impliqués dans la perception du sucré et du umami (gustation reliée aux acides aminés) (HOON *et al.*, 1999; PIN *et al.*, 2003). Les membres de cette classe de GPCRs sont caractérisés par une portion amino-terminale exceptionnellement longue d'environ 500-600 résidus et responsable de la reconnaissance et de la liaison du ligand (PIN *et al.*, 2003). Cette large portion amino-terminale peut être subdivisée en deux sous-domaines : (1) un module Venus Flytrap, impliqué dans la liaison du ligand et partageant des similarités de séquence avec une famille de protéines bactériennes périplasmiques impliquées dans le transport de petites molécules comme des acides aminés, des sucres, des ions ou des peptides, (2) un domaine riche en cystéines qui interconnecte le module Venus Flytrap et les sept TMDs (PIN *et al.*, 2003). Une des

caractéristiques particulières associées aux GPCRs de classe C est que tous sont composés de dimères (PIN *et al.*, 2003). Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et du calcium (CaSR) sont tous formés d'homodimères dû à l'interaction directe entre leur module Venus Flytrap et leur TMDs. Les récepteurs GABA et gustatifs forment quant à eux des hétérodimères. Pour ces récepteurs, la formation d'hétérodimères est dépendante de l'interaction entre les portions carboxy-terminales et des modules Venus Flytrap et cette dimérisation est obligatoire afin de former des récepteurs fonctionnels (PIN *et al.*, 2003). Dans le processus d'activation des protéines G par cette classe de GPCRs, il a été proposé que la liaison des agonistes au module Venus Flytrap permet de réorienter ce domaine à l'intérieur du dimère et cause ainsi un changement du mode d'interaction avec les TMDs. Ce changement stabilise les différents TMDs dans une conformation propice pour coupler et activer la protéine G (PIN *et al.*, 2003).

## **2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des GPCRs de classe A**

Les détails moléculaires menant à l'activation des GPCRs ne sont pas encore clairement compris. La grande conservation de certains résidus chez les récepteurs de classe A suggère que ceux-ci sont vraisemblablement impliqués dans le maintien d'une forme inactive des récepteurs ou encore impliqués dans le réarrangement des TMDs menant à l'activation des GPCRs de classe A (SMIT *et al.*, 2007). La cristallisation de plusieurs GPCRs de cette classe a permis d'éclaircir certains aspects structurels de ces récepteurs et suggéré certains mécanismes moléculaires d'activation des GPCRs de classe

A (CHEREZOV *et al.*, 2007; JAAKOLA *et al.*, 2008; PALCZEWSKI *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2008; WARNE *et al.*, 2008).

### 2.2.1. *Ionic Lock*

L'interaction entre le résidu R<sup>3.50</sup> du motif hautement conservé E/DRY, à la jonction du TMD3 et de la deuxième boucle intracellulaire, avec le résidu E/D adjacent (position 3.49) et le résidu E/D (position 6.30), près de la portion cytoplasmique du TMD6, constitue ce que l'on appelle le *ionic lock* (BALLESTEROS *et al.*, 2001). La protonation du résidu E<sup>3.49</sup> lors de l'activation de la rhodopsine brise cet *ionic lock* ce qui permet le mouvement entre les TMDs 3 et 6. Ce mouvement permet d'exposer des sites d'interactions intracellulaires pour la protéines G et mène à son activation (ARNIS *et al.*, 1994). La destruction de ce lien ionique en remplaçant le résidu E/D<sup>3.49</sup> et/ou le résidu E/D<sup>6.30</sup> induit, chez la rhodopsine et chez plusieurs autres GPCRs de classe A, une activité constitutive, ce qui suggère que les GPCRs de classe A ont un mécanisme d'activation similaire (BALLESTEROS *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2004; SCHEER *et al.*, 1996). Cependant, la mutation du résidu E/D<sup>3.49</sup> ne mène pas toujours à de l'activité constitutive (CAPRA *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2002; FENG et SONG, 2003). De plus, la structure tridimensionnelle du cristal du  $\beta$ 2AR indique qu'à l'état basal, la distance entre le TMD3 et le TMD6 est plus grande que celle retrouvée dans la rhodopsine, ce qui serait incompatible avec un mécanisme de lien ionique entre les résidus de ces TMDs du  $\beta$ 2AR (ROSENBAUM *et al.*, 2007). Les différentes conclusions tirées des études fonctionnelles antérieures et celles tirées de la récente cristallisation du  $\beta$ 2AR suggèrent qu'il existerait des rôles alternatifs du résidu E/D<sup>3.49</sup> et du motif E/DRY chez les récepteurs de classe A.

Par exemple, sur la base de résultats obtenus avec le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique ( $\alpha_{1B}AR$ ), Scheer *et al.* (1996) ont suggéré que dans sa forme inactive, le résidu R<sup>3.50</sup> est contraint dans une poche polaire formée des résidus N<sup>1.50</sup>, D<sup>2.50</sup>, N<sup>7.49</sup> et Y<sup>7.53</sup>. Dans ce modèle, la contrepartie ionique de R<sup>3.50</sup> serait le résidu conservé D<sup>2.50</sup> et cette interaction serait brisée dans le processus d'activation du récepteur (SCHEER *et al.*, 1996). La liaison de l'agoniste permettrait alors de libérer le résidu R<sup>3.50</sup>, causant l'isomérisation de la deuxième boucle intracellulaire qui peut ainsi coupler et activer la protéine G (SCHEER *et al.*, 1996).

### 2.2.2. Asparagine du motif NPxxY et D<sup>2.50</sup>

Il a été proposé que le résidu N<sup>7.49</sup>, situé dans le TMD7 et faisant partie du motif conservé NPxxY, agirait comme interrupteur ON/OFF en adoptant différentes orientations dans les états inactif ou actif (GOVAERTS *et al.*, 2001; URIZAR *et al.*, 2005). Dans l'état inactif, N<sup>7.49</sup> serait orienté vers le TMD6 alors que dans l'état actif, il adopterait une orientation propice pour interagir avec D<sup>2.50</sup> du TMD2 (URIZAR *et al.*, 2005). Ainsi, une interaction entre D<sup>2.50</sup> et N<sup>7.49</sup> du motif NPxxY pourrait être un mécanisme important lors de l'activation des GPCRs de classe A (SEALFON *et al.*, 1995; URIZAR *et al.*, 2005).

### 2.2.3. Rotamer Toggle Switch

Un autre changement moléculaire, nommé *rotamer toggle switch* a été proposé dans le mécanisme d'activation des récepteurs aminergiques et des opsines (SHI *et al.*, 2002). Ce *switch* implique un changement dans la structure du TMD6 autour du motif



CxWP<sup>6.50</sup> (SCHWARTZ *et al.*, 2006). Des études avec la rhodopsine et le  $\beta$ 2AR ont montré que le résidu W<sup>6.48</sup> subit une transition conformationnelle passant d'une orientation dirigée vers le TMD7, dans l'état inactif, vers une orientation dirigée vers le TMD5, dans l'état actif de ces récepteurs (LIN et SAKMAR, 1996; RUPRECHT *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2002). Le réarrangement du W<sup>6.48</sup> et de la C<sup>6.49</sup> adjacente contribue à diminuer l'angle induit par la P<sup>6.50</sup> dans le TMD6 déplaçant ainsi la portion cytoplasmique du TMD6 et l'éloignant du TMD3. Ceci contribuerait à briser le *ionic lock* entre le résidu R<sup>3.50</sup> du motif D/ERY et le résidu E/D<sup>6.30</sup> du TMD6 (BALLESTEROS *et al.*, 2001).

### **3. MÉCANISMES DE SIGNALISATION ET DE DÉSENSIBILISATION DES GPCRs**

#### **3.1. Signalisation dépendante des protéines hétérotrimériques G**

Les protéines hétérotrimériques G (G pour *guanine nucleotide-binding protein*) sont les interrupteurs moléculaires qui démarrent les cascades de signalisation en réponse à l'activation des GPCRs par des stimuli extracellulaires. Les protéines G ont donc un rôle crucial dans la spécificité de la réponse intracellulaire induite par l'activation des GPCRs. Malgré le grand nombre et la diversité des différents GPCRs, ceux-ci interagissent avec un nombre relativement restreint de protéines G pour initier la cascade de signalisation intracellulaire. Les protéines hétérotrimériques G sont composées de trois sous-unités soit les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Chez l'humain, il existe 21 sous-unités  $\alpha$ , 6 sous-unités  $\beta$  et 12 sous-unités  $\gamma$  (OLDHAM et HAMM, 2008). Les protéines G hétérotrimériques sont

typiquement divisées en quatre classes basées sur l'homologie de la séquence primaire de la sous-unité  $\alpha$  :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$ . La protéine G est maintenue inactive dans la conformation hétérotrimérique où la sous-unité  $\alpha$  lie le guanosine diphosphate (GDP) et est associée au dimère stable  $\beta\gamma$ . L'activation des GPCRs par leurs agonistes cause un changement conformationnel du récepteur qui permet son association aux protéines G et catalyse la relâche du GDP de la sous-unité  $\alpha$  résultant ainsi en la formation d'un complexe stable et de haute affinité entre le récepteur activé et la protéine G (OLDHAM et HAMM, 2006). Le récepteur activé agit par la suite de facteur d'échange de guanine-nucléotide (guanine-nucleotide exchange factor ou GEF) et promeut le remplacement du GDP par le guanosine triphosphate (GTP). Ceci déstabilise le complexe et permet le relâchement de la sous-unité  $\alpha$ -GTP et du dimère  $\beta\gamma$ . Chacune des sous-unités ( $\alpha$ -GTP et  $\beta\gamma$ ) agit comme messenger et active différents effecteurs intracellulaires. Parmi les effecteurs principaux, on retrouve l'adénylyl cyclase qui est activée par  $G\alpha_s$  ou inhibée par  $G\alpha_{i/o}$ , la phospholipase C qui est activée par  $G\alpha_{q/11}$  et certains canaux potassiques et calciques qui sont activés principalement par le dimère  $\beta\gamma$  (OLDHAM et HAMM, 2006). Les protéines  $G_{12/13}$  activent la protéine Rho qui est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette. La transduction du signal médiée par la protéine G se termine lorsque la sous-unité  $\alpha$  hydrolyse le GTP en GDP et se réassocie avec le dimère  $\beta\gamma$  (OLDHAM et HAMM, 2006).

## **3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation et la régulation des GPCRs**

Dans les systèmes biologiques, les cellules sont exposées à une combinaison complexe de stimuli. Les stimuli extracellulaires varient dans leur nature chimique, leur concentration et leur temps d'exposition. Ainsi, la réponse spécifique d'un GPCR se doit d'être finement régulée. De façon typique et pour un temps donné, un certain nombre de voies de signalisation seront enclenchées par un GPCR. Pour une réponse biologique appropriée (prolifération, différenciation, migration, apoptose) en situation physiologique, des mécanismes efficaces doivent être engagés afin d'orchestrer finement la réponse intracellulaire désirée. Ainsi, outre l'activation des protéines G, les GPCRs peuvent enclencher une série de mécanismes moléculaires qui seront impliqués dans l'arrêt de la signalisation dépendante de la protéine G et dans l'établissement d'une signalisation indépendante des protéines G mais plutôt dépendante de l'interaction avec diverses protéines intracellulaires.

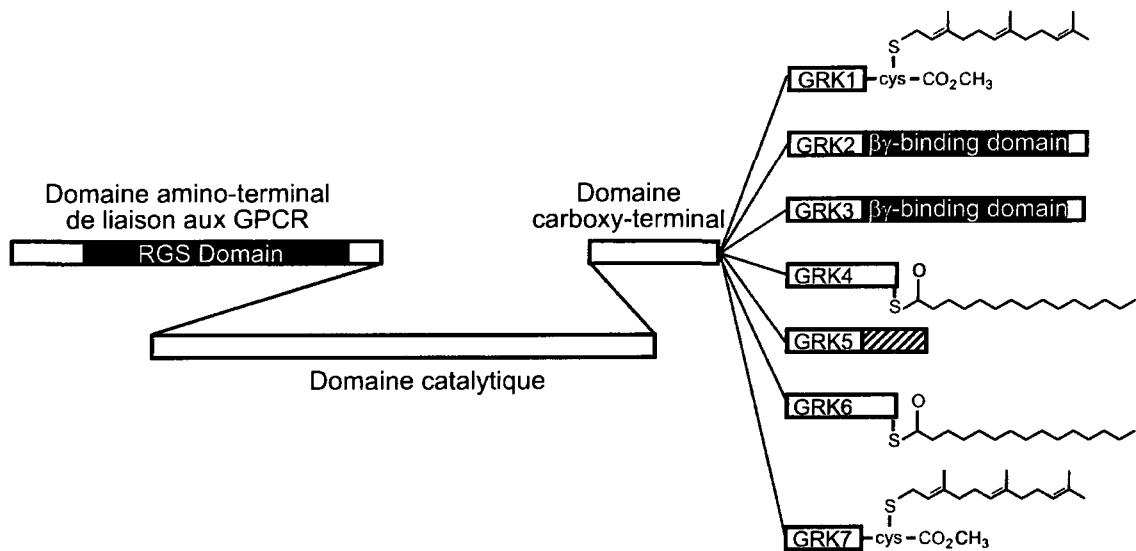
### **3.2.1. Rôle central des GRKs et des arrestines**

Même si plusieurs protéines sont capables d'interagir avec les GPCRs (BOCKAERT *et al.*, 2004), seulement deux familles de protéines (excluant les protéines G) se sont avérées capables d'interagir avec la majorité des GPCRs activés : les kinases spécifiques aux GPCRs (GRKs) et les arrestines (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). Comme conséquence directe de cette interaction, les GRKs et les arrestines permettent l'intégration, la versatilité et la diversité de voies de signalisation d'un nombre grandissant de GPCRs (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). De ce fait, il est maintenant

reconnu que les GRKs et les arrestines agissent comme coordinateurs généraux de la transduction intracellulaire médiée par les GPCRs.

### 3.2.1.1. Les GRKs

Les GRKs sont une famille de sérine/thréonine kinases spécifiques aux GPCRs comprenant sept membres (GRK1 à GRK7) qui partagent une certaine homologie de séquence (PREMONT et GAINETDINOV, 2007). Chaque GRK a une organisation fonctionnelle similaire incluant un domaine catalytique central, un domaine amino-terminal qui serait important pour la reconnaissance du substrat et comprenant un domaine RGS (*regulator of G protein signaling*) et un domaine variable carboxy-terminal qui contribue au ciblage de la kinase à la membrane plasmique (FERGUSON, 2001) (Figure 5). GRK1 et GRK7 sont respectivement exprimées dans les bâtonnets et les cônes de la rétine où elles sont impliquées dans la régulation de l'opsine. GRK4 a une expression limitée au cervelet, aux testicules et aux reins. GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6 sont quant à elles exprimées de façon ubiquitaire. Sur la base de la similarité de leur séquence, les GRKs sont classées en trois sous-familles. GRK1 et GRK7 constituent une famille. Une deuxième famille est constituée de GRK2 et GRK3 qui contiennent un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD). Ce domaine PHD est impliqué dans le recrutement de la kinase à la membrane plasmique lors de l'activation de certains GPCRs. Une troisième famille de GRKs est constituée de GRK4, GRK5 et GRK6 qui sont constitutivement associées à la membrane plasmique grâce à la palmitoylation de leur portion carboxy-terminale (GRK4 et GRK6) ou via une interaction électrostatique entre 46 résidus basiques de la portion carboxy-terminale (GRK5) et les phospholipides de la membrane (FERGUSON, 2001).



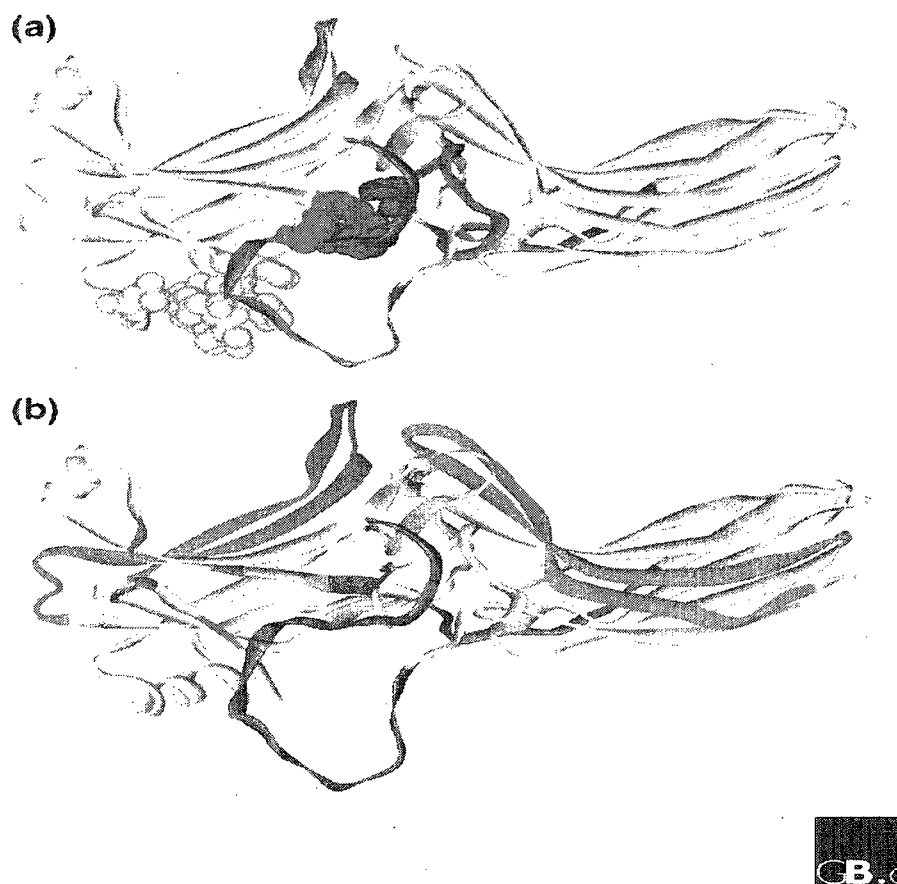
**Figure 5. Représentation schématique des différents domaines importants des GRKs.**

Le ciblage des différentes GRKs est médié par différents mécanismes impliquant leur domaine carboxy-terminal. GRK1 et GRK7 sont farnésylées à un domaine CAAX de la région carboxy-terminale. Le domaine carboxy-terminal de GRK2 et GRK3 contient un site de liaison aux sous-unités  $\beta\gamma$  qui expose une séquence homologe à un domaine pleckstrine. Le domaine carboxy-terminal de GRK5 contient une séquence de 46 résidus basiques (région hachurée) responsable de l'interaction avec les phospholipides de la membrane. GRK4 et GRK6 sont palmitoylées à un résidu cystéine du domaine carboxy-terminal.

Figure modifiée de Ferguson, S.S. (2001).

### 3.2.1.2. Les arrestines

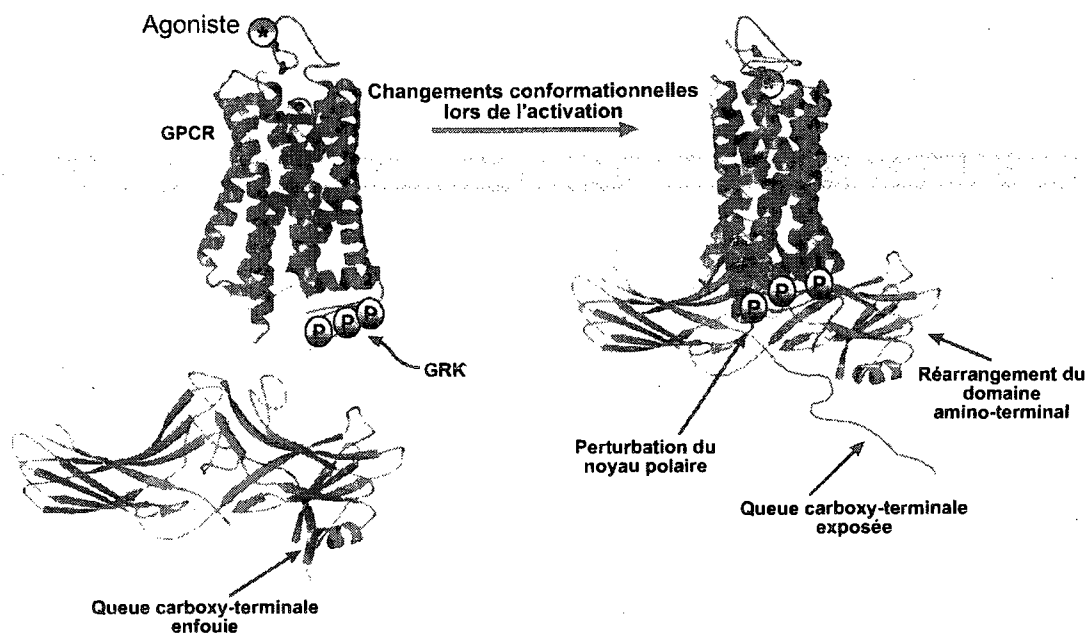
Les arrestines sont une famille de protéines comprenant quatre membres (SHENOY et LEFKOWITZ, 2003). L'expression de l'arrestine 1 et l'arrestine 4 est restreinte respectivement aux bâtonnets et aux cônes de la rétine. Les  $\beta$ -arrestine1 (arrestine 2) et  $\beta$ -arrestine2 (arrestine 3) sont, quant à elles, exprimées de façon ubiquitaire (SHENOY et LEFKOWITZ, 2003). Les arrestines ont une conformation allongée et sont composées d'un domaine amino-terminal et d'un domaine carboxy-terminal séparés par une région charnière (Figure 6). Les arrestines sont maintenues dans une forme inactive via l'interaction de résidus chargés formant le corps polaire de l'arrestine et via des interactions hydrophobes entre certains résidus de la région amino-terminale ( $\beta$ -strand I et l'hélice  $\alpha$  I) et de la queue carboxy-terminale (GUREVICH et GUREVICH, 2006). L'interaction avec les résidus phosphates des GPCRs activés brise le corps polaire de l'arrestine ce qui cause un changement conformationnel important dans l'arrestine (GUREVICH et GUREVICH, 2006). Ce réarrangement implique la libération de la queue carboxy-terminale et un mouvement entre les deux domaines de l'arrestine (Figure 7) (GUREVICH et GUREVICH, 2006). Ces changements permettent une interaction stable avec les récepteurs activés et libèrent des sites d'interaction pour la machinerie d'internalisation ou certaines protéines cytoplasmiques (discuté plus bas) (GUREVICH et GUREVICH, 2006).



**Figure 6. Éléments structuraux clés des arrestines.**

A. Interactions intramoléculaires maintenant les arrestines dans leur état inactif. Les résidus polaires du corps sont illustrés en rouge (charges négatives) et bleu (charges positives). En jaune sont illustrés les résidus hydrophobes des régions  $\beta$ -strand I, de l'hélice  $\alpha$  I et de la queue carboxy-terminale qui forment des interactions stabilisatrices de la forme inactive de l'arrestine. B. Site d'interaction connu de l'arrestine : vert, éléments de liaison aux GPCRs; bleu, charges positives qui lient les phosphates liés aux GPCRs; magenta, éléments de la portion proximale de la queue carboxy-terminale liant la clathrine; rouge, éléments de la portion distale de la queue carboxy-terminale liant AP-2.

Figure tirée de Gurevich, V.V. (2006)



**Figure 7. Modèle décrivant les changements conformationnels de l'arrestine lors de la liaison à un GPCR activé et phosphorylé.**

Quelques changements conformationnelles de l'arrestine qui surviennent lors de la liaison à un GPCR incluent la perturbation du noyau polaire et le réarrangement des domaines amino- et carboxy-terminaux. Ces changements augmentent la liaison au GPCR et permet de révéler les sites de liaison à la clathrine et à l'adaptine  $\beta 2$  du complexe AP-2.

Figure modifiée de Moore, C.A. (2007)



### **3.2.2. Désensibilisation, routage et signalisation indépendante des protéines G**

De façon générale, il est reconnu que les GRKs et les arrestines sont responsables de l'orchestration de l'activité des différents GPCRs à trois différents niveaux : 1-la désensibilisation de la réponse en permettant le découplage fonctionnel des récepteurs et de leurs protéines G 2-le routage intracellulaire en permettant l'internalisation, le recyclage et/ou la dégradation des récepteurs et 3- la signalisation indépendante des protéines G.

#### **3.2.2.1. Découplage de la protéine hétérotrimérique G**

L'activation des GPCRs mène généralement à l'atténuation rapide de la réactivité des récepteurs. Ce processus, appelé désensibilisation, est la conséquence de la combinaison de différents mécanismes. Parmi ceux-ci, on retrouve le découplage des récepteurs de leurs protéines G, l'internalisation des GPCRs membranaires vers des compartiments intracellulaires et la diminution du pool des GPCRs présent dans une cellule causée soit par leur dégradation par les lysosomes, soit par une diminution des niveaux de leur ARNm et de leur traduction (FERGUSON, 2001).

Le moyen le plus rapide par lequel les GPCRs sont découplés de la protéine G est par la phosphorylation par des kinases intracellulaires. Il est bien répertorié que plusieurs GPCRs peuvent être phosphorylés par les kinases dépendantes des seconds messagers tels que la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) (FERGUSON, 2001; MARCHESE *et al.*, 2003). Il a initialement été démontré que les effets médiés par le

$\beta$ 2AR étaient atténués par un processus de phosphorylation. La phosphorylation par la PKA diminue la capacité de couplage du  $\beta$ 2AR à la protéine G dans un système reconstitué (BENOVIC *et al.*, 1985; SIBLEY *et al.*, 1984; STRULOVICI *et al.*, 1984). Ceci suggère que l'unique phosphorylation de la portion cytoplasmique des récepteurs serait suffisante pour permettre un certain découplage des GPCRs de leur protéine G (BENOVIC *et al.*, 1985; FERGUSON et CARON, 1998). La PKA et la PKC ont la capacité de phosphoryler non seulement les GPCRs activés, mais également les GPCRs qui n'ont pas encore été exposés à l'agoniste (HAUSDORFF *et al.*, 1989). La désensibilisation médiée par les kinases dépendantes des seconds messagers est donc décrite comme une désensibilisation hétérologue.

L'implication des GRKs dans la désensibilisation des GPCRs a été étudiée intensivement au cours des 20 dernières années (BENOVIC *et al.*, 1988; PREMONT et GAINETDINOV, 2007). Les GRKs phosphorylent spécifiquement certains résidus sérine et thréonine présents dans la portion carboxy-terminale et/ou dans les boucles intracellulaires des GPCRs activés. Les récepteurs activés et phosphorylés deviennent par la suite des sites d'ancrage de haute affinité pour les arrestines (SHENOY et LEFKOWITZ, 2003). L'interaction des arrestines avec les GPCRs activés et phosphorylés entrave stériquement l'association avec les protéines G, ce qui contribue à la diminution de la réponse. Ce type de désensibilisation est spécifique aux GPCRs activés et est définie comme la désensibilisation homologue. En plus de promouvoir une désensibilisation de la réponse d'une façon dépendante de la phosphorylation telle décrite ci-haut, il a été démontré que GRK2 peut également diminuer la réponse cellulaire d'une façon indépendante de la phosphorylation. Ainsi, le domaine amino-terminal de GRK2,

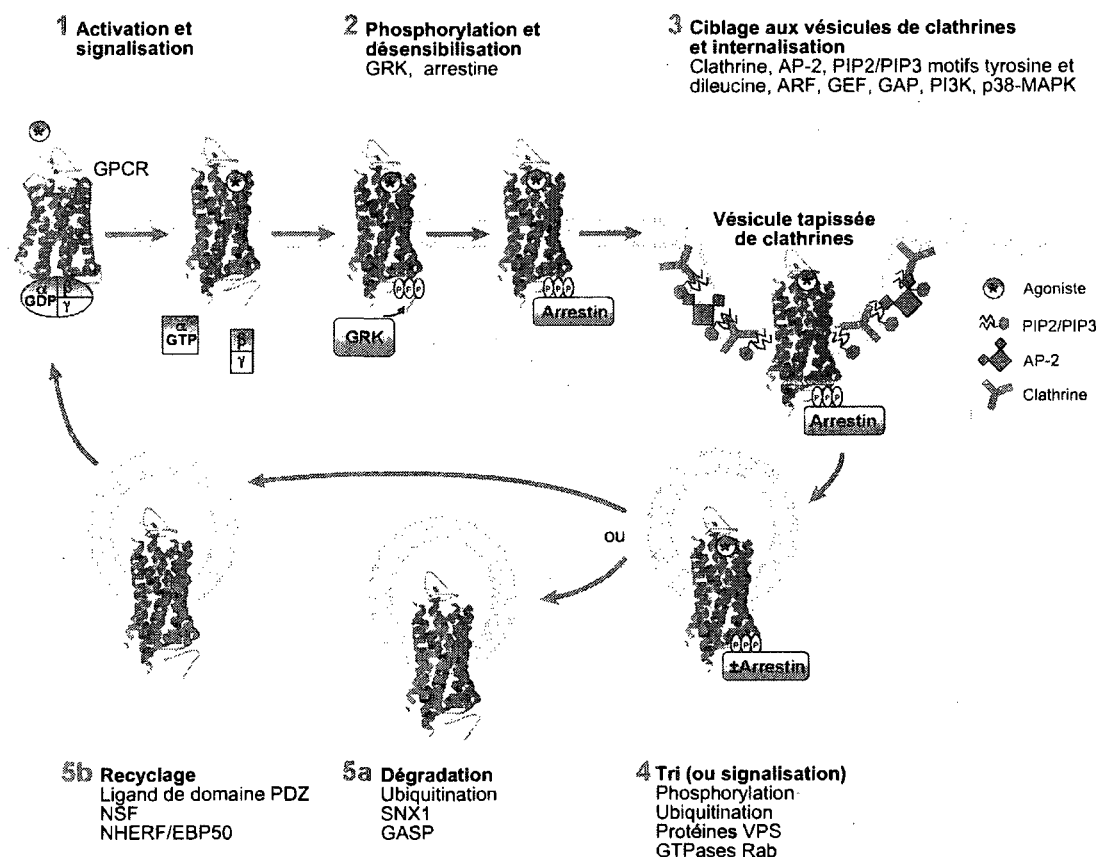
possédant une région RGS, est capable de lier et de séquestrer la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  et ainsi de diminuer la réponse médiée par les GPCRs couplés à  $G\alpha_{q/11}$  (CARMAN *et al.*, 1999). Cette inhibition peut être observée en surexprimant le domaine RGS de GRK2 uniquement et ne semble donc pas dépendante de l'activité kinase de GRK2 (CARMAN *et al.*, 1999; STERNE-MARR *et al.*, 2004).

### **3.2.2.2. Routage intracellulaire des GPCRs**

L'internalisation a un rôle fondamental dans la fonction des GPCRs en régulant de façon temporelle et spatiale leur signalisation (MARCHESE *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2007). Bien que l'internalisation semble être un mécanisme généralement employé par une panoplie de GPCRs, les études ont révélé une importante diversité dans les patrons d'internalisation et dans le routage intracellulaire des GPCRs (MOORE *et al.*, 2007). Trois mécanismes généraux sont responsables de l'internalisation des GPCRs : 1- internalisation via les puits tapissés de clathrines 2-internalisation via les cavéoles et 3- internalisation via certaines vésicules non-tapissées (FERGUSON, 2001; NICHOLS et LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2001).

#### **3.2.2.2.1. Voie dépendante des vésicules de clathrines**

La plus courante et la plus étudiée des voies d'internalisation est celle dépendante des puits et des vésicules de clathrines (WOLFE et TREJO, 2007). Cette voie d'internalisation est dépendante de deux étapes essentielles, soit la phosphorylation par les GRKs et l'interaction subséquente avec les arrestines (Figure 8) (SHENOY et LEFKOWITZ, 2003). En fait, l'internalisation de la majorité des GPCRs semble être



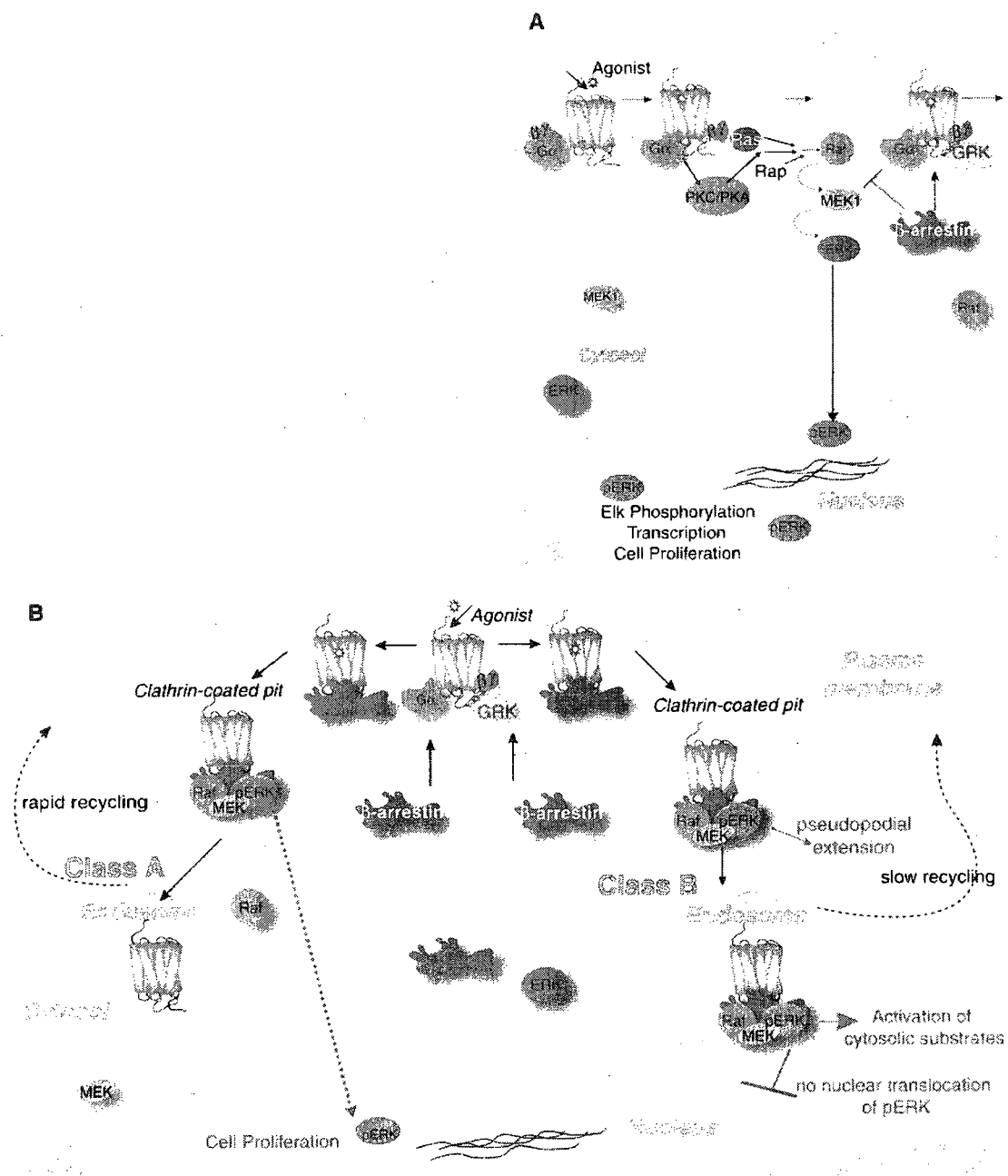
**Figure 8. Régulation du routage intracellulaire des GPCRs par les GRKs et les arrestines.**

La liaison d'un agoniste (astérisque) à un GPCR mène à son activation, au couplage aux protéines G et à la transduction du signal (étape 1). Les GRKs phosphorylent ensuite les GPCRs activés dans leurs portions intracellulaires ce qui permet l'ancrage de l'arrestine (étape 2). Les complexes GPCR/arrestine sont par la suite dirigés vers les puits de clathrines pour être internalisés et dirigés vers des compartiments intracellulaires (étape 3). Les récepteurs internalisés sont par la suite triés (étape 4) pour être redirigés vers les voies de dégradation (étape 5a) ou redirigés à la membrane plasmique (étape 5b) dans un processus nommé resensibilisation.

médiée par les puits de clathrines et dépendante des arrestines (REITER et LEFKOWITZ, 2006). D'un point de vue mécanistique, les arrestines servent d'adaptateurs liant les récepteurs activés et phosphorylés par les GRKs aux éléments de la machinerie d'internalisation comme la clathrine (GOODMAN *et al.*, 1996), la protéine adaptatrice de la clathrine AP-2 (LAPORTE *et al.*, 1999) et la petite protéine G Arf6 (*ADP-ribosylation factor 6*) (CLAING *et al.*, 2001) (Figure 8). Une fois ciblés dans les puits de clathrines, les GPCRs associés aux arrestines sont dirigés vers des compartiments intracellulaires. Pour ce faire, la vésicule tapissée de clathrine doit se détacher de la membrane plasmique sous l'action de la protéine GTPase dynamine (CLAING *et al.*, 2002). Une fois présents dans les endosomes intracellulaires, certains GPCRs comme le  $\beta$ 2AR sont redirigés vers la membrane plasmique par la voie de recyclage (VON ZASTROW et KOBILKA, 1992) alors que d'autres GPCRs comme le récepteur opioïde  $\delta$  ( $\delta$ OR) ou le récepteur V2 de la vasopressine (V2R) sont dégradés par les lysosomes ou par les protéasomes, respectivement (MARTIN *et al.*, 2003; TANOWITZ et VON ZASTROW, 2002). On peut distinguer deux classes de GPCRs selon leur avidité à lier l'arrestine (OAKLEY *et al.*, 2001; OAKLEY *et al.*, 2000). Les récepteurs de classe A<sup>1</sup>, comme le  $\beta$ 2AR, se dissocient rapidement de l'arrestine et sont recyclés vers la membrane plasmique alors que les récepteurs de classe B, comme les récepteurs de l'angiotensine II (AT1) et de la vasopressine (V2R), lient fortement l'arrestine et y demeurent associés dans les endosomes intracellulaires (Figure 9b). Cette capacité à lier fortement l'arrestine est dépendante de la présence d'un groupe de sérines présent dans la portion carboxy-terminale des GPCRs (OAKLEY *et al.*, 2001). Il a été proposé que la phosphorylation de

---

<sup>1</sup> Ici, classe A et classe B réfère à la classification des GPCRs selon leur capacité à lier efficacement l'arrestine décrit par Oakley *et al.* (2001) et non à la classification des GPCRs selon leur homologie de séquence comme décrit précédemment à la section 2.1.



**Figure 9. Modes d'activation des ERKs par les GPCRs.**

A. Activation des protéines ERKs de façon classique dépendante des protéines G.

B. Activation des ERKs dépendante de l'échaffaudage par les arrestines.

Figure tirée de Lefkowitz R.J. et Shenoy S.K. (2005)

ce groupe de sérines est responsable de la forte interaction entre ces récepteurs activés et les arrestines (OAKLEY *et al.*, 2001). Ainsi, la présence de ce groupe de sérines dans la portion carboxy-terminale de certains GPCRs pourrait dicter les voies intracellulaires empruntées par ces récepteurs une fois activés (ZHANG *et al.*, 1999).

### 3.2.2.2. Voies alternatives d'internalisation

Les cavéoles représentent une voie alternative d'internalisation des GPCRs (CHINI et PARENTI, 2004). Les cavéoles sont une région spécialisée de la membrane plasmique riche en cavéoline (protéine principale des cavéoles) et en certains lipides comme le cholestérol et les sphingolipides (CHINI et PARENTI, 2004). Certains GPCRs sont dirigés vers les cavéoles en interagissant directement avec la cavéoline via un domaine d'interaction ( $\Phi x \Phi_{xxxx} \Phi$  ou  $\Phi_{xxxx} \Phi_{xx} \Phi$ , où  $\Phi$  est un résidu hydrophobe et x est n'importe quel résidu) (CHINI et PARENTI, 2004). Ainsi, le récepteur de la somatostatine sst2 internalise via les cavéoles suite à son activation (MENTLEIN *et al.*, 2001). À noter également que les cavéoles sont riches en protéines impliquées dans la signalisation des GPCRs comme certaines protéines G hétérotrimériques, la *nitric oxide synthase* (NOS), l'adénylyl cyclase et certains membres de la voie des MAPKs. Le ciblage de certains GPCRs vers les cavéoles est également responsable de l'activation de certaines voies de signalisation spécifiques (CHINI et PARENTI, 2004; NAVRATIL *et al.*, 2003; OSTROM *et al.*, 2000).

L'utilisation de dominants négatifs des arrestines et/ou de la dynamine a suggéré l'existence de certaines voies alternatives responsables de l'internalisation des GPCRs

activés vers des compartiments intracellulaires. Ainsi certains GPCRs, comme le récepteur muscarinique de l'acétylcholine M2 (M2 mAChR), peuvent internaliser indépendamment de la présence des arrestines ou de la dynamine et ne semblent pas emprunter la voie des cavéoles (FERGUSON, 2001; ROSEBERRY et HOSEY, 2001). Cependant, ces voies n'ont pas été caractérisées clairement.

### **3.2.2.3. Signalisation indépendante des protéines G**

Les GPCRs n'interagissent pas uniquement avec les protéines G hétérotrimériques, mais également avec une panoplie de protéines accessoires nommées GIP (*GPCR-interacting protein*) (BOCKAERT *et al.*, 2004). Ces GIPs sont non seulement impliquées dans la régulation du routage intracellulaire des récepteurs, mais également dans la formation de "réceptosomes" (BOCKAERT *et al.*, 2004). Ces "réceptosomes", ou complexes fonctionnels, servent à contrôler finement la signalisation spécifique des différents GPCRs. L'interaction avec les arrestines, suite à la phosphorylation par les GRKs, représente le complexe protéique le mieux connu et le mieux caractérisé dans la fonctionnalité des GPCRs (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). En plus de promouvoir l'internalisation des GPCRs, les arrestines servent d'adaptateurs, de protéines d'échafaudage et/ou de transducteurs de signal en connectant les récepteurs activés avec une multitude de protéines cytoplasmiques (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). Parmi les voies dépendantes des arrestines, celle menant à l'activation des protéines ERK1/2, de la voie des MAPKs, est la mieux caractérisée (LEFKOWITZ et SHENOY, 2005). Les MAPKs sont les éléments terminaux d'une cascade d'activation de différentes kinases grandement conservées. Cette voie est constituée d'une MAPKKK (comme Raf), une



MAPKK (comme MEK) et une MAPK (comme ERK1/2) (LUTTRELL, 2003). Ainsi, les GPCRs peuvent activer la voie MAPK par un mécanisme classique, dépendant des protéines G (Figure 9a), mais également par l'entremise des arrestines dont l'activation est indépendante des protéines G (Figure 9b) (CHAREST *et al.*, 2007; LEFKOWITZ et SHENOY, 2005; SHENOY *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2003). Les protéines ERKs activées via l'échaffaudage des arrestines possèdent certaines particularités qui permettent de les distinguer des protéines ERKs activées via la voie classique dépendante des protéines G (REITER et LEFKOWITZ, 2006). L'activation des ERKs par l'arrestine est lente (~5-10 min avant d'atteindre un maximum), persistante (demi-vie > 1h) et confinée dans le cytosol. Par contre, l'activation des ERKs via les protéines G est rapide, transitoire, sensible aux inhibiteurs des seconds messagers et se distribue jusqu'au noyau, ce qui mènera à la transcription de gènes cibles et à la prolifération (REITER et LEFKOWITZ, 2006). Ainsi, ces deux voies d'activation des ERKs produisent des réponses physiologiques très différentes.

Les mécanismes d'activation des ERKs par les GPCRs de classe A et B sont les mêmes c'est-à-dire que les récepteurs de ces deux classes font intervenir une composante protéine G-dépendante et -indépendante. Cette dernière peut référer à une activation des ERKs par un mécanisme dépendant de l'échaffaudage des arrestines. Les mécanismes ou encore les intervenant impliqués (Raf/MEK/arrestines/PKA/PKC) semblent être les mêmes pour les deux classes de GPCRs. Par contre, la différence réside dans la conséquence de cette activation. Les récepteurs de la classe B, capables de s'associer longtemps aux arrestines, retiennent les pERKs dans le cytosole ce qui diminue l'activité transcriptionnelle de ces protéines pour plutôt maintenir une activité cytosolique. Le papier le Tohgo *et al.* illustre

bien cette différence fonctionnelle entre les récepteurs de classe A ( $\beta$ 2AR) et B (AT1 et V2R) (Tohgo et al., 2003).

#### 4. RAISONNEMENT THÉORIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les connaissances actuelles démontrent que l'activation d'un GPCR ne cause pas uniquement l'activation d'une protéine G hétérotrimérique, mais induit aussi une série d'interactions protéiques qui permettent non seulement de désensibiliser la réponse dépendante de la protéine G, mais aussi d'engendrer une signalisation spécifique à chacun des GPCRs. Le système urotensine II semble impliqué dans plusieurs pathologies humaines comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, la fibrose cardiaque, l'hypertrophie cardiaque et le développement de plaques athérosclérotiques. Ainsi, il est évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de régulation du récepteur UT permettra de mieux comprendre les implications cellulaires et physiologiques de ce récepteur dans des états normaux et/ou pathologiques.

Étant donné que le récepteur UT est capable d'activer plusieurs voies de signalisation (PAPADOPOULOS *et al.*, 2008), notre hypothèse de travail est que la régulation des différentes voies de signalisation médiées par le récepteur UT est dépendante de différents domaines et motifs de ce récepteur. Afin de vérifier cette hypothèse nous posons les questions suivantes :

- 1- Est-ce que l'internalisation du récepteur UT est nécessaire à l'activation de certaines voies de signalisation?
- 2- Est-ce que le résidu D97<sup>2,50</sup> et les résidus du motif conservé ERY sont impliqués dans les mécanismes d'activation et de régulation du récepteur UT?

Afin de répondre à ces questions, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

#### **4.1. Objectif 1 : Caractériser les mécanismes d'internalisation du récepteur UT.**

Les GPCRs activent leurs protéines G associées et permettent une transduction de signaux à l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme d'activation des voies de signalisation se fait à la membrane plasmique où la relâche des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines G hétérotrimériques activent différents effecteurs intracellulaires. Par contre, certains GPCRs comme le  $\beta$ 2AR doivent être internalisés afin de pouvoir activer certaines voies de signalisation comme la voie des ERKs (LUTTRELL *et al.*, 1999). Afin de mieux définir l'implication de l'internalisation d'UT dans l'activation de ses voies de signalisation, il est impératif de déterminer d'abord si UT internalise suite à son activation. Nous avons donc évalué si le récepteur UT: 1-internalise dans des compartiments intracellulaires 2-à quelle vitesse cette internalisation s'effectue 3-par quelle voie cette internalisation s'effectue et 4- quelle est l'importance de la queue carboxy-terminale du récepteur UT dans son internalisation et sa signalisation.

#### **4.2. Objectif 2 : Déterminer le rôle du résidu conservé D97<sup>2.50</sup> et des résidus du motif conservé ERY dans la régulation de l'activité du récepteur UT.**

Le récepteur UT fait partie de la classe A des GPCRs. Très peu d'homologie de séquence existe entre les membres de cette classe de récepteur à l'exception de certains résidus et motifs clés hautement conservés. La grande conservation de ces résidus et motifs suggère que ceux-ci ont des rôles essentiels dans l'intégrité structurelle et fonctionnelle de ces

récepteurs. Presque tous les récepteurs de classe A ont un aspartate dans le TMD2 (D97<sup>2.50</sup>) et un motif E/DRY, situé à la jonction du TMD3 et de la deuxième boucle intracellulaire. Ces résidus ont un rôle primordial pour maintenir plusieurs GPCRs de la classe A dans leur forme inactive via la formation de liens intramoléculaires comme le *ionic lock*. De plus la modulation de ces interactions par l'agoniste permet d'induire une forme active des récepteurs (BALLESTEROS *et al.*, 2001; SMIT *et al.*, 2007). Cependant, le rôle de ces résidus conservés ne semble pas être identique chez tous les GPCRs de la classe A (ROVATI *et al.*, 2007). Le récepteur UT possède un aspartate dans le TMD2 (D97<sup>2.50</sup>) et un motif ERY. Nous avons voulu déterminer le rôle de ces résidus dans la fonctionnalité du récepteur UT. Pour ce faire, nous avons investigué comment la substitution des résidus D97<sup>2.50</sup> et des résidus E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> et Y149<sup>3.51</sup> du motif ERY affecte la liaison de l'urotensine II, la signalisation et l'internalisation du récepteur UT.

## **RÉSULTATS**

## **Avant propos de l'article 1**

### **Article 1**

#### **Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization.**

Proulx, C.D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S.A., Guillemette, G., & Leduc, R.

*Biochem. J.* **385**: 115-123 (2005)

**Statut:** Publié

**Référence:** Proulx, C.D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S.A., Guillemette, G., & Leduc, R. (2005). Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochemical Journal*. **385**(Pt-1): 115-123

**Apport:** J'ai généré tous les résultats de ce manuscrit à l'exception des figures de microscopie confocale (Figures 2 et 5). J'ai rédigé la première version de ce manuscrit.

## Résumé de l'article 1

Afin de permettre leur internalisation suivant leur activation par un agoniste, la majorité des GPCRs nécessitent la présence de résidus spécifiques présents dans leur portion carboxy-terminale cytosolique afin d'établir des interactions avec différentes protéines de la machinerie d'internalisation. Dans cet article, nous montrons que le récepteur UT internalise suivant son activation et qu'un groupe spécifique de sérines participe à ce processus. Nous avons d'abord observé que le récepteur UT, exprimé dans les cellules COS-7, internalise suivant son activation par l'UII. Cette séquestration a été diminuée significativement en présence de sucrose ce qui montre que l'internalisation d'UT se fait en partie via les puits tapissés de clathrines. Un fois internalisé, le récepteur UT co-localise avec la  $\beta$ -arrestine1 et la  $\beta$ -arrestine2. Dans le but d'évaluer si certaines portions spécifiques de la queue cytoplasmique d'UT pouvaient être impliquées dans cette internalisation, nous avons construit cinq mutants. Dans quatre de ces constructions, la portion carboxy-terminale du récepteur UT fut tronquée à différentes positions (UT $\Delta$ 367, UT $\Delta$ 363, UT $\Delta$ 350 et UT $\Delta$ 336) et dans un autre mutant, nous avons remplacé par des alanines un groupe de quatre sérines adjacentes à la position 364-367 (Mut4S). À l'exception du mutant UT $\Delta$ 367, chacun des mutants ont montré une diminution significative à être internalisé suivant leur activation par l'UII. Ceci nous a permis de révéler l'importance du groupe de sérines de la queue carboxy-terminale du récepteur UT afin que ce dernier puisse être internalisé efficacement.



## SYNOPSIS

Most G-protein coupled receptors that undergo agonist-dependent internalization require the presence of specific cytoplasmic-tail residues to initiate interactions with proteins of the endocytic machinery. Here we show that the urotensin II receptor (UT receptor)<sup>1</sup> undergoes internalization and that specific serine residues of the receptor's cytoplasmic tail participate in this process. We first observed a time-dependent increase in internalization of the UT receptor expressed in COS-7 cells following binding of the agonist urotensin II. This sequestration was significantly reduced in presence of sucrose demonstrating that agonist-activated UT receptor is internalized in part by clathrin-coated pits. Moreover, the sequestered receptor was co-localized in endocytic vesicles with  $\beta$ arrestin1 and  $\beta$ arrestin2. To assess whether specific regions of the receptor's cytoplasmic tail were involved in internalization, five UT receptor mutants were constructed. Four constructs had the receptor's cytoplasmic tail truncated at various positions (UT $\Delta$ 367, UT $\Delta$ 363, UT $\Delta$ 350 and UT $\Delta$ 336) and another had four adjacent serine residues at positions 364-367 replaced by Ala (Mut4S). Each mutant, except for UT $\Delta$ 367, demonstrated a significantly reduced internalization rate thereby revealing the importance of specific serine residues within UT's cytoplasmic tail for the receptor's ability to internalize efficiently.

*Keywords:* Urotensin II, urotensin receptor, G-protein coupled receptor,  $\beta$ arrestin, internalization, site-directed mutagenesis.

<sup>1</sup>Abbreviations: UII, urotensin II; GPCR, G protein-coupled receptor; UT, urotensin II receptor; GRK, G protein-coupled receptor kinase; PLC, phospholipase C; GFP, green fluorescent protein; TLC, thin layer chromatography.

## INTRODUCTION

Urotensin II, a cyclic undecapeptide originally isolated from the caudal neurosecretory system of teleost fish [1], has since been identified in many classes of vertebrates including human [2]. Studies have shown that urotensin II has potent hemodynamic effects acting both as vasodilator [3] as well as vasoconstrictor [4].

Urotensin II is the endogenous ligand for the G-protein-coupled receptor (GPCR), GPR14 (now called UT receptor) [5]. Urotensin II binds to the UT receptor with high affinity, which leads to phospholipase C-dependent production of inositol phosphates [6] and increased levels of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  [5]. The UT receptor is found in the central nervous system and is widely expressed in human tissues, including left atrium and ventricle from the heart, smooth muscle cells from the coronary artery and aorta as well as in endothelial cells from several vascular beds [2, 7]. Compelling evidence has implicated the urotensin II/UT system in the pathophysiology of hypertension, heart failure, in cardiac fibrosis and hypertrophy [8].

Upon stimulation by agonists, GPCRs transfer information to intracellular second messengers via their coupling to heterotrimeric G proteins thereby enabling the activation of a diverse variety of effector systems. GPCR function is then regulated by several processes, including desensitization, internalization, recycling and down-regulation. Most GPCRs exhibit homologous desensitization following prolonged agonist stimulation. Agonist-activated receptors are rapidly phosphorylated by G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) [9], which in turn promote binding of  $\beta$ arrestins. The  $\beta$ arrestins preclude receptor/G protein interaction leading to functional uncoupling of G-protein from its associated receptor, and to a rapid down-regulation of the receptor's effectors systems. The  $\beta$ arrestin/receptor complex is sequestered in clathrin-coated pits thereby facilitating endocytosis and eventual targeting towards various intracellular compartments [10]. Following internalization in endosomal compartments, some GPCRs such as the  $\beta$ 2-adrenergic receptor [11] recycle toward the plasma membrane while others such as the delta opioid receptor [12] or the vasopressin V2 receptor [13] are targeted for proteolysis to lysosomes or the proteasome respectively.

The rat UT receptor belongs to the peptide subfamily of the rhodopsin-like family of GPCRs and is comprised of 386 residues. The receptor's cytoplasmic tail possesses

serine/threonine residues that are potential phosphorylation sites for various kinases. Our goal was to determine whether the UT receptor undergoes internalization following binding with the agonist urotensin II and to verify the putative involvement of specific residues of the receptor's C-terminal tail in this process. Our results indicate that a specific cluster of serine residues in UT's cytoplasmic tail is involved in facilitating internalization of the receptor.

## EXPERIMENTAL

### Materials

Bovine serum albumin and bacitracin were from Sigma. The cDNA encoding the rat UT receptor (GPR14) subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3 was a generous gift from Dr. Brian O'Dowd (University of Toronto). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin and oligonucleotide primers were purchased from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD). FuGENE™-6 and protease inhibitor cocktail was purchased from Roche (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated and active forms of p42/p44 MAPK and the Phototope™-HRP Detection Kit (ECL) immunodetection system were purchased from New England Biolabs (Mississauga, Canada). Urotensin II was synthesised in our laboratory using Fmoc-protected amino acids and Wang resin. The synthetic peptides were purified to homogeneity by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) separation. Cysteines were protected by AcM groups, which were removed by using mercury acetate. Disulfide bond formation was achieved by DMSO oxydation. Purity and identities of the peptides were determined by thin layer chromatography and mass spectrometry<sup>2</sup>. <sup>125</sup>I-UII (specific radioactivity 400 Ci/mmol)<sup>3</sup> was prepared with IODO-GEN as described by Fraker and Speck [14]. Briefly, 25 µl of 1 mM peptide solution was incubated with 20 µg IODO-GEN (Pierce Chemical Co.), 65 µl of 100 mM Borate buffer pH 7.8 and 1 mCi of Na<sup>125</sup>I for 30 min at room temperature. The labeled peptides were purified by HPLC on a C-18 column (10 µm, Allteck Associates Inc) with 35-45%

---

<sup>2</sup> La technique de chromatographie sur couche mince n'est plus utilisée dans le laboratoire afin de déterminer la pureté des peptides. Au moment de cette publication, la responsable de la synthèse peptidique utilisait la TLC afin de déterminer quelles étaient les fractions qui ne contenaient qu'un seul point (peptide) à la sortie de la colonne préparative suivant la synthèse. Cette étape était utilisée immédiatement avant une purification sur colonne C18 analytique. Il est inhabituel d'utiliser aujourd'hui la chromatographie sur couche mince comme moyen de déterminer la pureté. La Spectrométrie de masse donne bien sûr donné des indices sur sur la pureté. Toutefois, l'intensité d'un pic produit par ionisation est proportionnelle non seulement à la quantité de matériel, mais aussi à la facilité d'ionisation du composé

<sup>3</sup> Suite au marquage du peptide UII par l'iode<sup>125</sup>, une purification sur HPLC est effectuée afin de séparer le peptide froid du chaud. Cette étape n'est pas efficace à 100% et une certaine quantité de peptide froid est présente dans notre sonde UII-I<sup>125</sup>. Par des mesures de dose déplacement et de saturation, il nous est possible de calculer l'activité spécifique de notre *mélange* UII-I<sup>125</sup>/UII froid. Dans le cas de l'UII, cette activité spécifique est calculée comme étant de 400 Ci/mmol.

acetonitrile gradient. The specific radioactivity of the labeled hormones was determined by self-displacement and saturation binding analysis.

### **PCR mutagenesis**

Mutant UT receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Expand High Fidelity PCR System, Roche) using the rat UT cDNA inserted into pcDNA3 (Invitrogen Inc.) as a template. Two sets of forward and reverse oligonucleotides were used (Life Technologies Inc.) to introduce stop codons at Gln<sup>368</sup>, Ser<sup>364</sup>, Ser<sup>351</sup>, and Ser<sup>337</sup>, to replace Ser<sup>364-367</sup> by Alanines. PCR products were subcloned using KpnI and XbaI sites of pcDNA3.1 after digestion by the same restriction enzymes. For UT- and Mut4S-green fluorescent protein conjugate (UT-GFP and Mut4S-GFP respectively) rat UT and Mut4S cDNA inserted into pcDNA3.1 were amplified and PCR products were subcloned using EcoRI and BamHI sites of pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON) after digestion by the same restriction enzymes. Mutagenesis was confirmed by automated nucleotide sequencing.

### **Cell culture and Transfections**

COS-7 and HEK-293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovin serum (FBS), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37<sup>0</sup>C. COS-7 cells were plated at 1×10<sup>6</sup> cells per 100 mm culture dishes. When cells reached 70 % confluency, they were transfected with 4 µg of plasmid DNA and 8 µl of FuGENE<sup>TM</sup>-6 as described by the manufacturer. Transfected cells were grown for 48 h before performing binding assays. HEK-293 cells were plated on 22 mm<sup>2</sup> coverslips in 6-well plates at a density of 2,5×10<sup>5</sup> cells. When cells reached 70 % confluency, they were transfected with 1 µg of plasmid DNA and 2 µl of FuGENE<sup>TM</sup>-6 as described by the manufacturer. Transfected cells were grown for 48 h before collecting images on a confocal microscope (Zeiss LSM-510 META). Using the UT-GFP construct, the efficiency of transfection of COS-7 and HEK-293 cells were found to be approximately 30% and 15% respectively.

### **Binding Experiments**

COS-7 cells were grown for 48 h post-transfection in 100 mm culture dishes, washed once with PBS, and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were then gently scraped in washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), centrifuged at 2500xg 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 saturation binding assays, broken cells (10-15 µg of protein) were incubated for 1h at room temperature in binding buffer containing increasing concentrations of <sup>125</sup>I-UII (0,15-20 nM) (50 Ci/mmol) 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 3h in binding buffer. Nonspecific binding was measured in the presence of 1 µM unlabeled urotensin II. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ counting. K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> values were evaluated by Scatchard plot analysis. Peptide stability was evaluated by TLC and no degradation was observed after incubation of the peptide with COS-7 cell membranes for up to 2 hours.

#### **Measurement of agonist-induced Inositol Phosphate production**

Inositol phosphate accumulation was determined as described [15]. Briefly, COS-7 cells were seeded in six well plates, transfected, and labeled for 16 h in serum-free, inositol-free DMEM containing 10 µCi/ml of [<sup>3</sup>H]myoinositol (Amersham Pharmacia Biotech). Cells were washed twice with PBS 0.1% dextrose and then incubated in stimulation buffer (DMEM, 25 mM HEPES, 10 mM LiCl and 0.1% BSA, pH 7.4) for 30 min at 37°C. Inositol phosphate production was induced with 100 nM urotensin II for 10 min at 37°C in stimulation buffer. Incubations were terminated by the addition of ice-cold perchloric acid (final 5% v/v). Water-soluble inositol phosphates were then extracted with an equal volume of the 1:1 mixture of 1,1,2-trichlorotrifluoroethane and tri-*n*-octylamine. The samples were vigorously mixed and centrifuged at 2500 x g for 30 min. The upper phase containing inositol phosphates was applied to an AG1-X8 resin column (BioRad). Inositol phosphates were sequentially eluted by the addition of an ammonium formate/formic acid solution of increasing ionic strength. Fractions containing inositol phosphates were collected and measured by a liquid scintillation counter.

#### **Protein expression and immunoblotting**

Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and proteins (40  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE on 10% gels. Proteins were detected immunologically following electrotransfer onto nitrocellulose membranes. Blots were then incubated with antibodies directed against phosphorylated or unphosphorylated forms of p42/p44 MAPK in blocking solution overnight at 4°C and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:1,000) IgG in blocking solution for 1 h. Blots were visualized by Phototope™-HRP Detection Kit ECL system. Protein concentrations were measured using a modified Lowry procedure with BSA as standard [16].

### **<sup>125</sup>I-UII Internalization assay**

Internalization was evaluated as previously described [17]. Briefly, transfected COS-7 cells were incubated for varying periods of time at 37°C in internalization buffer (25 mM HEPES pH 7.4, DMEM, 0.1 % BSA) containing 0.1 nM <sup>125</sup>I-UII. Internalization was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS. Cells were then incubated for 120 min in 1 ml of ice-cold acidic solution (150 mM NaCl, 50 mM acetic acid, pH 3). The supernatant containing the acid-released radioactivity was collected for analysis. Cells were then solubilized with 0.1 N NaOH and their acid-resistant radioactive content was evaluated. Internalization was calculated from the ratio of acid-resistant binding to total binding (acid-resistant plus acid-released). Non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu$ M unlabeled urotensin II.

### **Confocal microscopy**

HEK 293 cells expressing UT-GFP or Mut4S-GFP and  $\beta$ arrestin1-YFP or  $\beta$ arrestin2-YFP were stimulated at 37°C with urotensin II for the indicated period of time and then fixed for 15 min at room temperature with a solution of 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS. Cover slips were mounted with GelTol Aqueous Mounting Medium (Immunon). Confocal images were collected on a Zeiss laser-scanning confocal microscope (LSM-510 META) using a 63x oil immersion lens. In cells expressing only UT-GFP, the fluorescence was visualized in the single-track mode with LASER excitation

(488 nm) and emission (LP 505) filter sets. In cells expressing both the GFP and YFP fusion proteins, images were collected using the lambda mode. In this mode, the closely overlapping emission spectra of the GFP and the YFP were separated to produce cross-talk-free images of individual fluorescent proteins. Lambda images were unmixed with the Zeiss LSM-510 META image processing software using the individual spectra of the YFP- and the GFP-expressing proteins as references.

### **Data analysis**

Results were collected in triplicate and presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Binding curves, binding capacity ( $B_{\max}$ ) and  $K_d$  values were derived from the Kell program (Biosoft, Ferguson, MO), which uses a weighted nonlinear curve-fitting routine.



## RESULTS

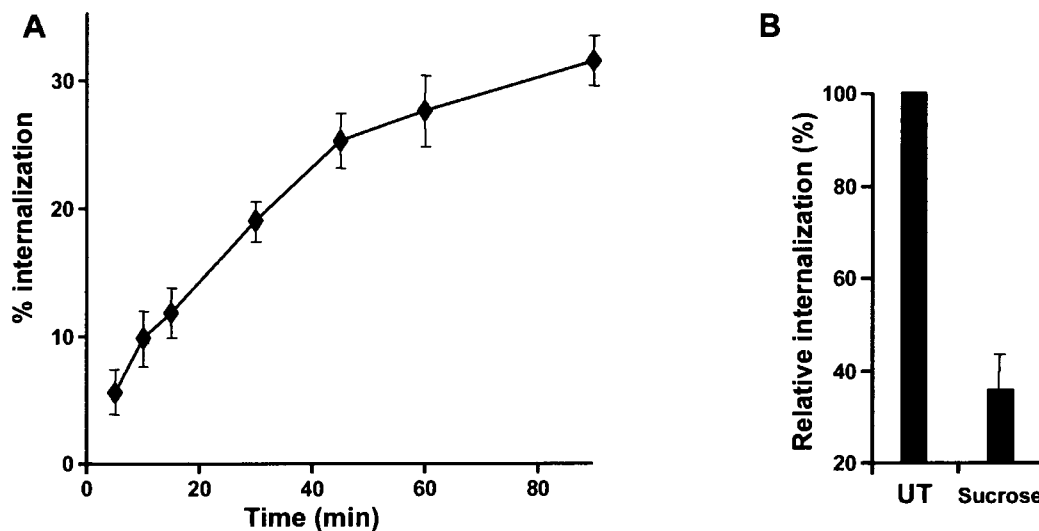
### Characterization of $^{125}\text{I}$ -UII internalization

To determine whether the UT receptor undergoes agonist-induced internalization, we assessed the kinetics of  $^{125}\text{I}$ -UII internalization. Fig. 1A shows the time course for internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII in COS-7 cells transiently expressing the UT receptor. During incubation at 37°C, the acid-resistant binding of  $^{125}\text{I}$ -UII to the wild-type receptor increased to a value representing  $31 \pm 1,9\%$  of total specific binding within 90 min of stimulation. The half time of internalization was 20 min. This uptake of radioactive material is consistent with internalization of the hormone/receptor complex.

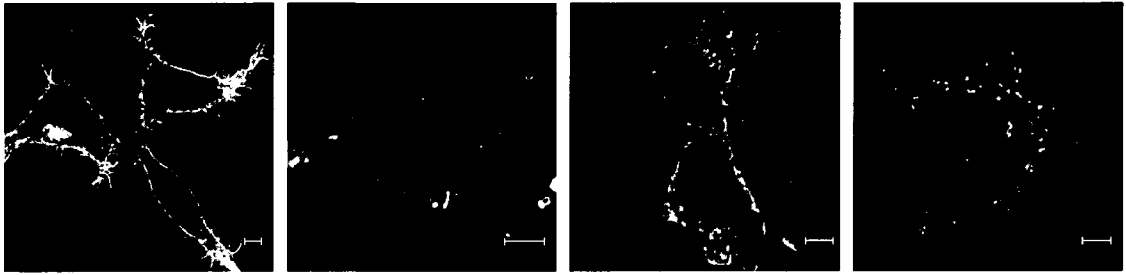
To better characterize this process, we evaluated the effect of hyperosmolar sucrose, a known inhibitor of clathrin-mediated endocytosis, on internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII. COS-7 cells expressing the wild-type UT receptor were pretreated with medium or with 0.45 M sucrose to block clathrin-mediated internalization before stimulation with urotensin II; sucrose was continuously present during the experiment. The kinetics of  $^{125}\text{I}$ -UII internalization were studied after a 90 min treatment. As shown in Fig. 1B, sucrose significantly blocked the internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII in cells expressing the UT receptor with a reduction of 65% relative to non-treated cells indicating that receptor-specific internalization can be mediated by clathrin-coated vesicles.

### Trafficking of agonist-activated UT receptor

We used functional UT receptor-green fluorescent protein (UT-GFP) to visualize intracellular trafficking of the receptor in transfected HEK-293 cells. UT-GFP has the green fluorescent protein in its carboxyl-terminal portion and this modification does not affect ligand binding, receptor expression nor the receptor's capacity to activate phospholipase C (data not shown). In the absence of agonist (0 min), UT-GFP was localized at the plasma membrane (Fig. 2). After a 5 min stimulation of the UT receptor with 100 nM urotensin II, we observed a punctate pattern of UT-GFP at the plasma membrane. Longer exposure with agonist (15 min), led to the observation that UT-GFP was localized within endocytic vesicles. These vesicles, which were first detected within 5 min of agonist addition, grew in size and number and were still observed after a 45 min



**Figure 1. Internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII by UT-wt in transiently transfected COS-7 cells.** Cells expressing wild-type UT receptor were incubated with  $^{125}\text{I}$ -UII (0.2 nM) at 37°C for different periods of time (A). Effect of 0.45 M sucrose in internalization was evaluated after 90 min (B). Internalization was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS. Acid-resistant binding was evaluated as indicated in the Experimental section. Data are expressed as percent of total binding for each time point and represent mean  $\pm$  standard deviation of triplicate values. Internalization was calculated from the ratio of acid-resistant binding to total binding (acid-resistant plus acid-released). Non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled urotensin II. These results are representative of three independent experiments.



**Figure 2. Intracellular trafficking of UT-GFP.**

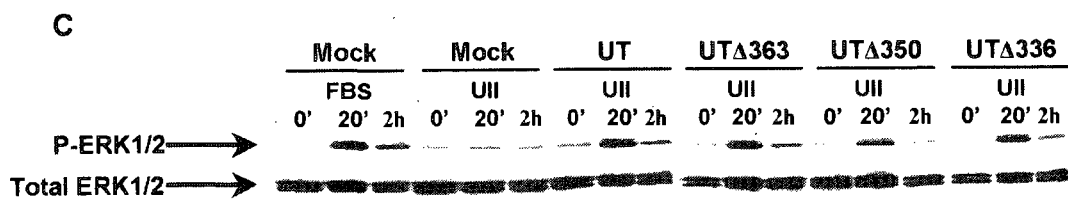
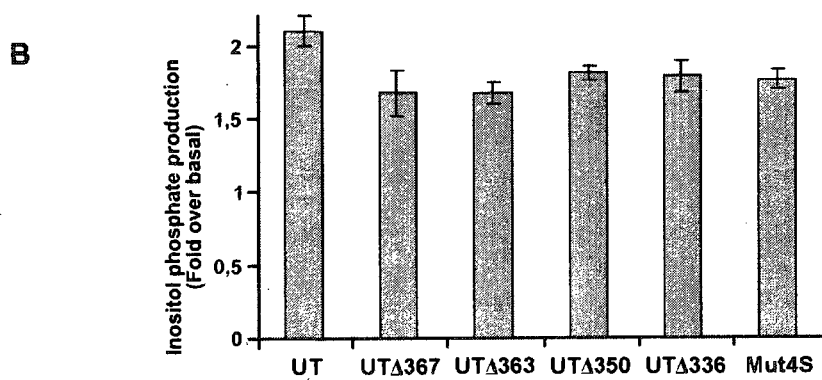
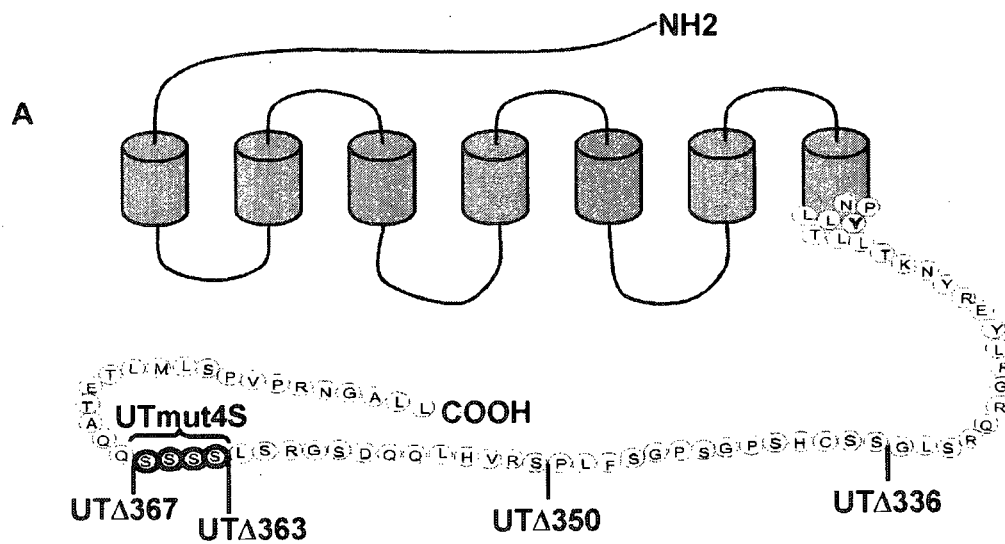
HEK-293 cells were transiently transfected with UT-GFP. Shown are representative confocal microscopic images of UT-GFP fluorescence in HEK-293 cells treated with agonist for 0, 5, 15 and 45 min at 37°C. Scale bars represent 5 $\mu$ m. Experiments were repeated three times, with similar results.

treatment with agonist. These results demonstrate that agonist-activated UT receptor internalize to ultimately localize to endocytic vesicles.

### **Involvement of carboxyl-terminal tail residues in UT receptor internalization**

To assess whether the cytoplasmic c-terminal tail of the UT receptor plays a role in its internalization, we initially constructed three truncation mutants in which the last 23 (UT $\Delta$ 363), 36 (UT $\Delta$ 350) and 50 (UT $\Delta$ 336) residues were removed (Fig. 3A). These truncations removed many potential phosphorylation sites from the cytoplasmic tail; amongst these a cluster of four adjacent serines at positions 364-367. To first characterize the pharmacological properties of the truncation mutants, binding analysis was performed by increasing concentrations of [<sup>125</sup>I]UII (saturation kinetics) in transiently transfected COS-7 cells. We found no significant differences in  $K_d$  values (4 nM) between the wild-type UT receptor and mutated receptors (Table 1). Moreover, binding capacities of both wild-type and mutant receptors were similar with values ranging between 0.5 and 1.0 nM. These results demonstrate that the cytoplasmic deletions do not affect the receptors' affinity toward urotensin II nor do they alter the receptors' capacity at being expressed at the cell surface.

The functional properties of the transiently transfected wild-type and mutant receptors were also evaluated by measurement of urotensin II-induced inositol phosphate production (Fig. 3B). Cells were incubated for 10 min with  $10^{-7}$ M urotensin II and total IP accumulation was measured. In each experiment, receptor densities were assessed by binding assay to adjust the IP production with receptor expression. As shown in figure 3B, stimulation of COS-7 cells expressing wild-type or mutant receptors with urotensin II caused a significant accumulation of total inositol phosphates (between 1.7 and 2.1 fold increase above basal level) which demonstrated that cytoplasmic tail deletions did not significantly affect the functional properties of the receptors. Another property of the UT receptor is its capacity to activate the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway [18]. We measured the effect of c-terminal truncation of UT receptor in ERK1/2 activation by immunoblotting with antibodies against the phosphorylated, active forms of ERK1/2. Addition of urotensin II to mock transfected cells did not induce ERK1/2



**Figure 3. Functional characterization of UT receptors.**

A. Schematic representation of UT receptor representing full-length (wild-type), carboxyl-terminal deletion mutations and point mutations of the UT receptor. Mutant cDNAs were ligated into pcDNA3.1 as described in the Experimental section. The scheme shown above includes wild-type UT receptor (386 aa), sequentially carboxyl-terminal-deleted receptors: -19 aa (UT $\Delta$ 367); -23 aa (UT $\Delta$ 363); -36 aa (UT $\Delta$ 350); -50 aa (UT $\Delta$ 336) and point mutation mutant receptors: serine cluster replaced by alanines (Mut4S). B. Inositol phosphate production was evaluated in transfected COS-7 cells with wild-type and mutant receptors. Inositol phosphate production was induced with 100 nM urotensin II for 10 min at 37°C in stimulation buffer. The phase containing inositol phosphates was applied to an AG1-X8 resin column (BioRad). Inositol phosphates were sequentially eluted by the addition of an ammonium formate/formic acid solution of increasing ionic strength [36]. Fractions containing inositol phosphates were collected and counted by a liquid scintillation counter. C. Effect of UT receptor truncation on MAP kinase activation. COS-7 cells transiently transfected either with WT or truncated receptor were serum-starved overnight and then treated with 10% FBS as positive control or 100 nM urotensin II at 37°C for 0 min, 20 min or 1 h in DMEM and lysed. Equal amount of protein were resolved by SDS-PAGE. Activated MAPK was identified by immunoblotting using phospho-MAPK specific antibody, which labeled 44- and 42-kDa bands, ERK1 and ERK2, respectively. Total MAPK was shown to be the same in all samples on parallel blots that were probed with antibody against total MAPK. Experiments were repeat three times, with similar results.

**Table 1. Affinities and expression of UT receptors mutants expressed in transiently transfected COS-7 cells.**

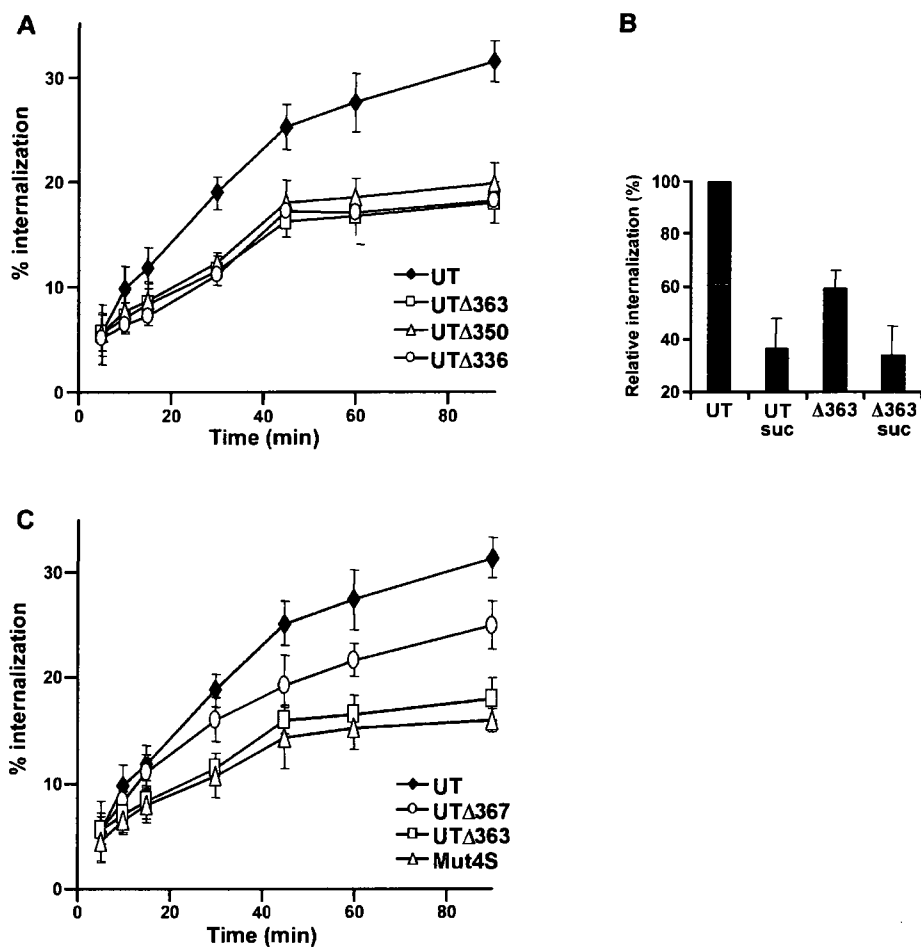
Saturation-binding studies with membranes expressing wild-type and mutated receptors were carried out as described in the *Experimental* section. Binding capacity ( $B_{max}$ ) and  $K_d$  values were derived from the Kell program (Biosoft, Ferguson, MO), which uses a weighted nonlinear curve-fitting routine.

Receptor	$K_d$ (nM)	$B_{max}$ (nM)
Wild-Type	$4,17 \pm 0,51$	$0,63 \pm 0,14$
UT $\Delta$ 367	$4,49 \pm 0,64$	$0,49 \pm 0,17$
UT $\Delta$ 363	$4,28 \pm 0,40$	$0,55 \pm 0,23$
UT $\Delta$ 350	$4,65 \pm 0,73$	$0,53 \pm 0,33$
UT $\Delta$ 336	$4,93 \pm 1,07$	$0,68 \pm 0,39$
Mut4S	$4,71 \pm 0,16$	$1,01 \pm 0,58$

activation (Fig. 3C). However, addition of urotensin II to COS-7 cells transfected with wild-type receptor led to a robust activation of ERK1/2 after 20 min and phospho-ERK1/2 was still observed 1 h following urotensin II addition. Activation of UTA363, UTA350 and UTA336 gave similar response to wild-type receptor at each time point measured. These results demonstrate that mutations in the cytoplasmic tail of the UT receptor do not affect its capacity to activate the ERK1/2 pathway.

We then studied the internalization kinetics of the truncated UT receptors during a 90 min period. Removal of the last 23 residues from the cytoplasmic tail yielded a mutant receptor (UTA363) with significantly impaired internalization kinetics (Fig. 4A). Indeed, the maximal acid-resistant binding of  $^{125}\text{I}$ -UII to UTA363 was  $18 \pm 2\%$  within 90 min. Removal of the last 23 residues of the cytoplasmic tail of the UT receptor thus reduced its internalization by 42% relative to wild-type receptor after 90 min of stimulation (Fig. 4A). Removal of either 36 or 50 residues of the cytoplasmic tail had no further effect on the internalization rate of UT receptor over UTA363 (Fig. 4A). In order to verify whether residual internalization observed with mutant receptor UTA363 was attributable to the clathrin-coated vesicles pathway, the kinetics of  $^{125}\text{I}$ -UII internalization was studied after 90 min stimulation with urotensin II on transiently transfected COS-7 cell expressing UTA363 receptor in absence and in presence of 0,45M sucrose. As shown in Fig. 4B, sucrose significantly blocked the internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII on cells expressing UTA363 receptor to the same extent than the wild-type receptor indicating that residual receptor-specific internalization of  $^{125}\text{I}$ -UII is also mediated by clathrin-coated vesicles. These results demonstrate that the last 23 residues of the cytoplasmic tail of the UT receptor contain determinant(s) that are important for internalization and that residual internalization observed with truncated receptors is also dependent on the clathrin-coated vesicle pathway. To assess the importance of the serine cluster present in the last 23 residues of the cytoplasmic tail of UT receptor, we constructed, expressed and evaluated the internalization kinetics of UTA367 and Mut4S. These mutations removed all residues after the serine cluster or replaced this cluster by alanines from the cytoplasmic tail respectively. Binding properties and functional characterization of these mutant receptors showed no significant difference when compared to the wild-type receptors (table 1 and Fig. 3). As shown in Fig. 4C, deletion of the last 19 residues and replacement of the four





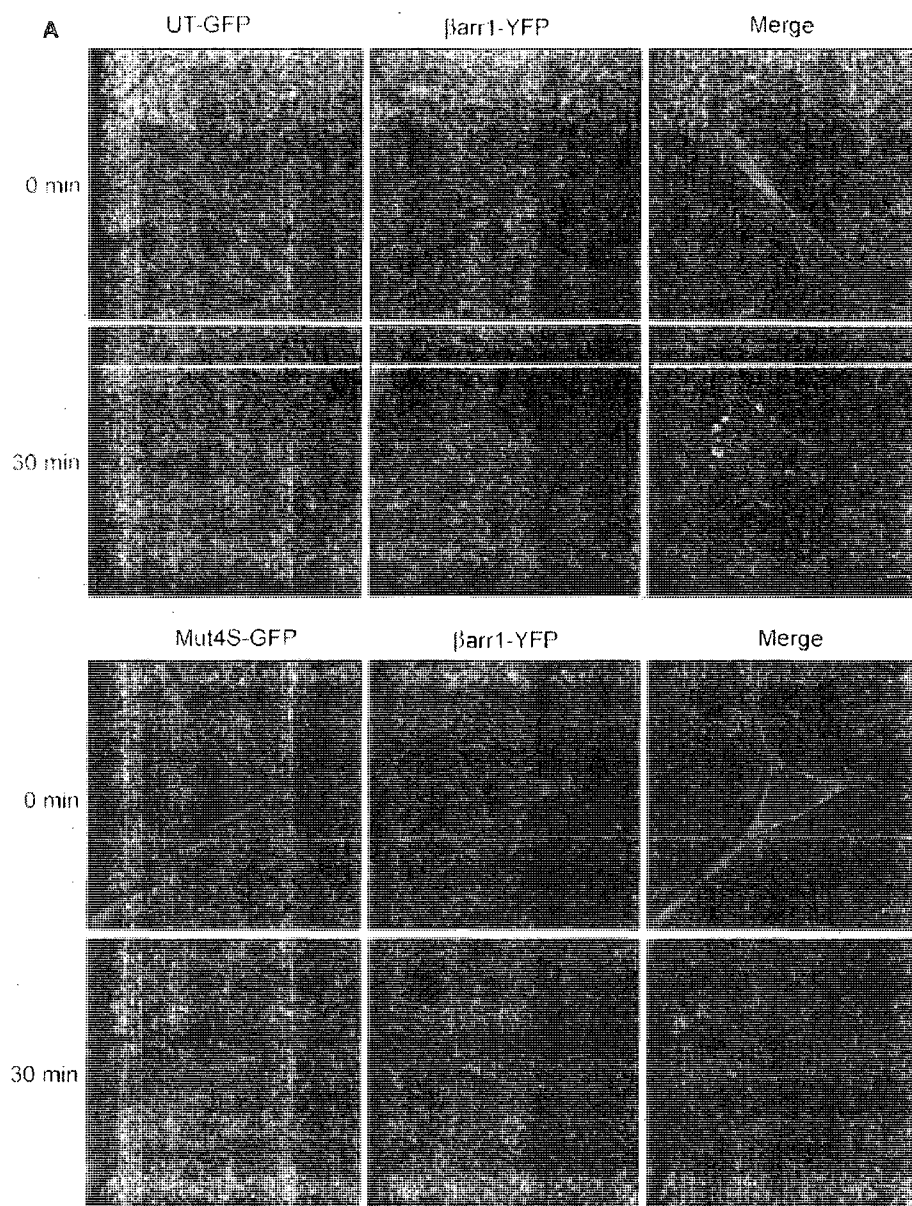
**Figure 4. Effect of C-terminal truncations on UT receptor internalization.**

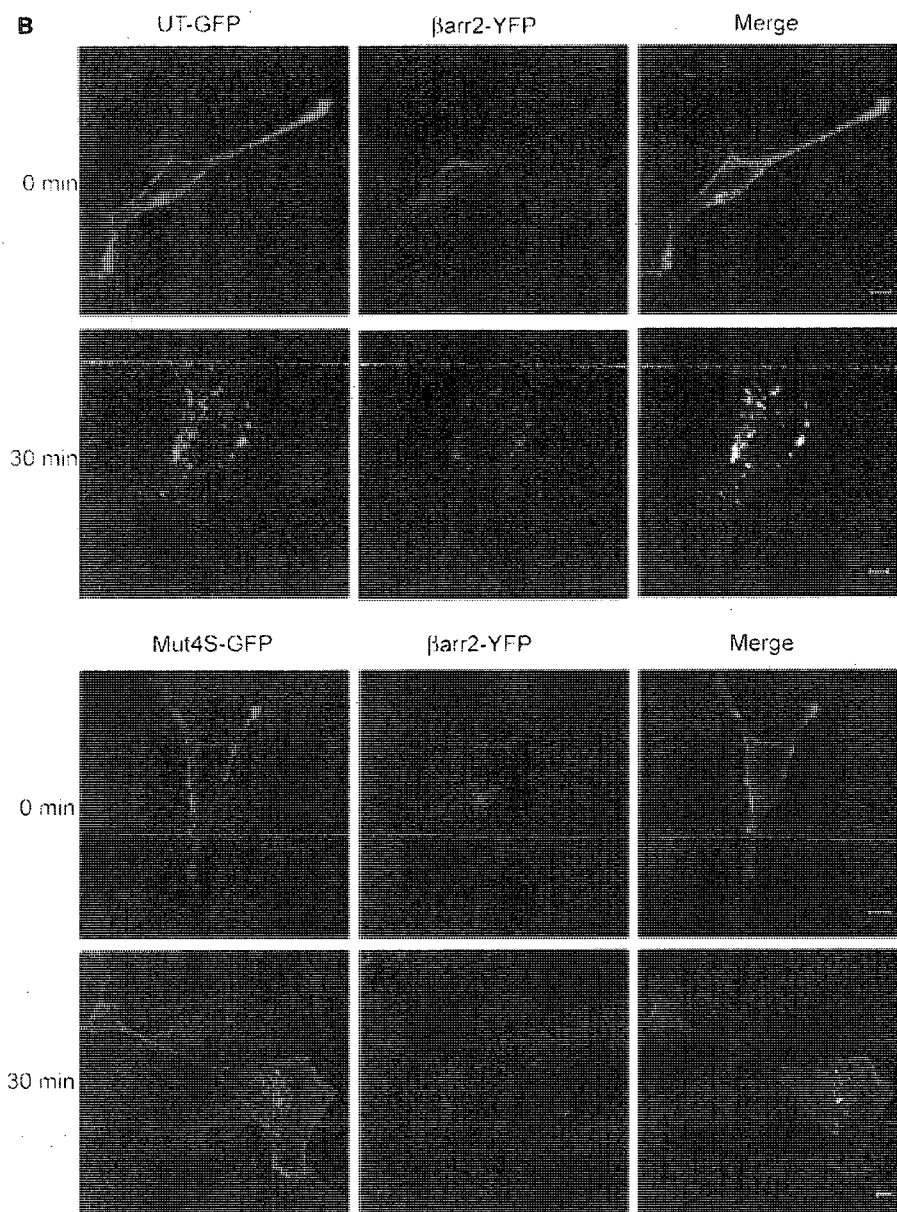
A, COS-7 cells expressing wild-type UT receptor (◆), UTΔ363 (□), UTΔ350 (Δ) and UTΔ336 (○) and B, COS-7 cells expressing wild-type UT receptor (◆), UTΔ367 (○), UTΔ363 (□) and Mut4S (Δ) were incubated with  $^{125}$ I-UII (0.2 nM) at 37°C for different periods of time. Effect of 0,45 M sucrose on UT-wt and UTΔ363 was evaluated after 90 min, C. Internalization was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS. Acid-resistant binding was evaluated as indicated in the Experimental section. Data are expressed as percent of total binding for each time point and represent mean  $\pm$  standard deviation of triplicate values. Internalization was calculated from the ratio of acid-resistant binding to total binding (acid-resistant plus acid-released). Non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu$ M unlabeled urotensin II. These results are representative of three independent experiments.

adjacent serines by alanines attenuated internalization relative to the wild-type receptor. The maximal acid-resistant binding of  $^{125}\text{I}$ -UII to UT $\Delta$ 367 and Mut4S were of  $25 \pm 1\%$  and  $16 \pm 1\%$  respectively within 90 min of stimulation. Removal of the serine cluster present within the last 23 residues of the cytoplasmic tail of the UT receptor thus reduced its internalization by 49 % relative to the native receptor after 90 min of stimulation (Fig. 4C). These data demonstrate the importance of the four adjacent serines located in the last 23 residues of the cytoplasmic tail of UT receptor in its internalization but also demonstrated that the last 19 residues also have a role in this process.

#### **Trafficking of $\beta$ arrestins with agonist-activated wild-type and Mut4S receptors**

We used either functional UT-green fluorescent protein (UT-GFP) or Mut4S-green fluorescent protein (Mut4S-GFP) and  $\beta$ arrestin1- or  $\beta$ arrestin2-yellow fluorescent protein conjugates ( $\beta$ arr1-YFP,  $\beta$ arr2-YFP) to visualize intracellular trafficking of both receptors and the association of  $\beta$ arrestins with the agonist-occupied receptors in transfected HEK-293 cells. Similar to UT-GFP, Mut4S-GFP has the green fluorescent protein in its carboxyl-terminal portion and this modification does not affect ligand binding, receptor expression nor the receptor's capacity to activate phospholipase C (data not shown). In the absence of agonist (0 min), UT-GFP and Mut4S-GFP were localized at the plasma membrane (Fig. 5A and B) while  $\beta$ arr1-YFP and  $\beta$ arr2-YFP were uniformly distributed in the cytoplasm of cells, as indicated by the homogeneous  $\beta$ arr1-YFP and  $\beta$ arr2-YFP fluorescence. Upon agonist-stimulation (30 min), there was an extensive redistribution of cell surface UT-GFP and cytoplasmic  $\beta$ arr1-YFP as well as  $\beta$ arr2-YFP to large perinuclear structures (Fig. 5A and B merge). These vesicles, which were first detected within 5 min of agonist addition (data not shown), qualitatively grew in size and number after 30 min of agonist treatment (Fig. 5A and B). Agonist-activation of Mut4S-GFP also promoted the co-localization of mutant receptor with  $\beta$ arr1-YFP and  $\beta$ arr2-YFP but in smaller vesicles than those observed with the wild-type receptor. Moreover, whereas the fluorescence of UT-GFP totally disappeared from the plasma membrane after agonist treatment, the fluorescence of the Mut4S-GFP was still detectable after the same period of urotensin II treatment. Next, we verified whether Mut4S-GFP co-localizes with  $\beta$ arrestins



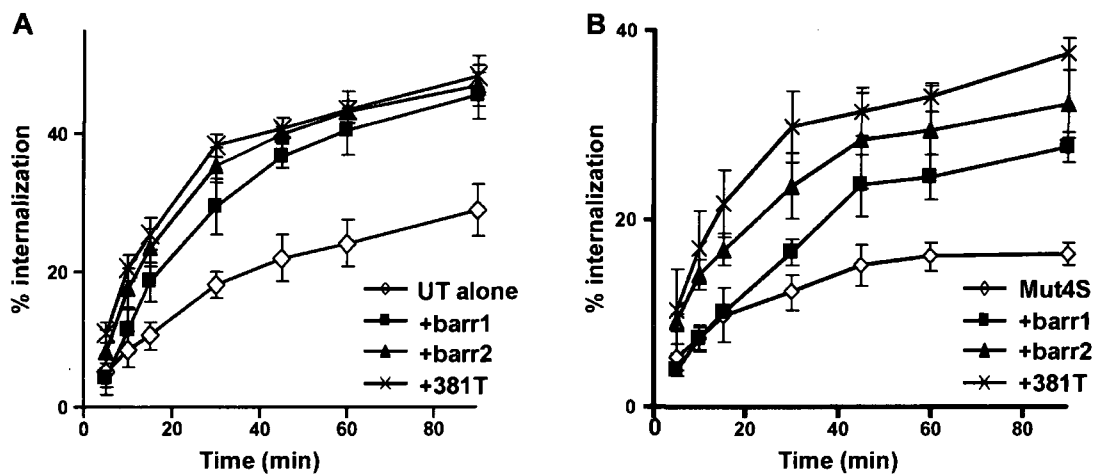


**Figure 5. Co-localization of  $\beta$ arrestin1 and  $\beta$ arrestin2 to agonist-activated UT or Mut4S receptors.**

HEK-293 cells were transiently transfected with either UT-GFP or Mut4S-GFP plus either  $\beta$ -arrestin1-YFP or  $\beta$ -arrestin2-YFP cDNAs. Shown are representative confocal microscopic images of either UT-GFP or Mut4S-GFP and  $\beta$ -arrestin1-YFP (A) or  $\beta$ -arrestin2-YFP (B) fluorescence (illustrated as red pseudocolour) in HEK-293 cells treated with agonist for 30 min at 37°C. Scale bars represent 5  $\mu$ m. Experiments were repeated three times, with similar results.

in large vesicles after prolonged periods of time following agonist stimulation. Following 90 minutes of agonist stimulation, UT-GFP is detected with  $\beta$ arr2-YFP in large vesicles whereas Mut4S-GFP is still observed in small vesicles (data not shown). This demonstrates that in absence of the serine cluster, Mut4S is not found in large vesicles.

To examine the effect of  $\beta$ arrestin in more detail, COS-7 cells were co-transfected with UT or Mut4S receptors and either  $\beta$ arrestin1,  $\beta$ arrestin2 or  $\beta$ arrestin2-381T and internalization assays were performed after a time course of agonist exposure (Fig. 6).  $\beta$ arrestin2-381T has been shown to exhibit phosphorylation-independent receptor binding due to the removal of key regulatory residues [19]. In vitro, this mutant binds to the agonist-activated beta2-adrenergic receptor regardless of its phosphorylation status. We found that co-expression of  $\beta$ arrestin1,  $\beta$ arrestin2 or  $\beta$ arrestin2-381T increased internalization of the UT receptor to the same extent and at each time point. These results confirm the importance of  $\beta$ arrestin for internalization of UT receptor. Co-transfection of  $\beta$ arrestin1,  $\beta$ arrestin2 or  $\beta$ arrestin2-381T increased Mut4S internalization rate in COS-7 cells (fig. 6B) demonstrating the implication of  $\beta$ arrestins in Mut4S internalization. Interestingly, the phosphorylation-independent  $\beta$ arrestin2-381T increased the internalization rate of Mut4S in a more important manner than  $\beta$ arrestin1 and  $\beta$ arrestin2 suggesting that the specific serine cluster present in the carboxyl-terminal tail of UT receptor is phosphorylated following urotensin II activation.



**Figure 6. Effect of overexpression of  $\beta$ arrestin1,  $\beta$ arrestin2 and truncated  $\beta$ arrestin2-381T on WT and Mut4S receptor internalization.**

COS-7 cells expressed either wild-type UT receptor (A) or Mut4S (B) alone ( $\diamond$ ) or co-expressed  $\beta$ arrestin1 ( $\blacksquare$ ),  $\beta$ arrestin2 ( $\blacktriangle$ ) or  $\beta$ arrestin2-381T ( $\times$ ) and were incubated with  $^{125}\text{I}$ -UII (0.2 nM) at 37°C for different periods of time. Internalization was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS. Data are expressed as percent of total binding for each time point and represent mean  $\pm$  standard deviation of triplicate values. Internalization was calculated from the ratio of acid-resistant binding (internalized) to total binding (acid-resistant plus acid-released). Non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled urotensin II. These results are mean of three independent experiments.

## DISCUSSION

Agonist activation of G protein-coupled receptors not only initiates the receptor-mediated signal transduction cascade, but also triggers the activation of cellular mechanisms that lead to receptor desensitization and internalization.

In the present study, we show that urotensin II stimulation promotes the internalization of its cognate UT receptor and that this appears to take place via clathrin-coated pits since hypertonic sucrose, which has been extensively used to block clathrin-mediated internalization of numerous GPCRs, inhibits this process [20]. However, it has been observed, for the M2 muscarinic acetylcholine receptor, that although sucrose blocked internalization of the receptor, neither clathrin nor caveolae were shown to be involved in this process [21]. We therefore cannot exclude the possibility that UT receptor may also internalize by other atypical pathways<sup>4</sup>.

We also demonstrate that the maximal internalization percentage obtained after 90 min of urotensin II stimulation was 31% with a  $t_{1/2}$  of 20 min. These numbers differ from those reported for other rhodopsin-like receptors. For example, the maximal internalization percentage of angiotensin type 1A receptor is 60% and is reached after 10 min of stimulation [17]. Internalization percentages of 70% in 20 min, 80% in 10 min and 90% in 30 min have been observed for the vasopressin V2 receptor [22], neurokinin 1 receptor [23, 24] and for neurotensin receptor [25] respectively with  $t_{1/2}$  values for all receptors of less than 7 min. Moreover, the internalization kinetics observed with UT receptor is correlated with confocal imaging of UT-GFP receptor whereby a punctate pattern of fluorescence is observed at the membrane of transfected cells after 5 min of agonist stimulation but only after 15 min of activation do we observe fluorescence associated with endocytic vesicles. Although overexpression of  $\beta$ arrestin1 or  $\beta$ arrestin2 did lead to a greater extent of receptor internalization, it did not significantly improve the

---

<sup>4</sup> Dans la discussion de ma thèse, je discute de la voie impliquant les cavéoles où il a été démontré pour certains GPCRs que les cavéoles était une voie employée afin de séquestrer ces récepteurs vers des compartiments intracellulaires. Pour ce qui est des autres voies atypiques, comme mentionné pour le récepteur M2 muscarinic de l'acétylcholine, peu d'informations existe sur les mécanismes moléculaires alternatifs d'internalisation. Ces voies sont généralement suggérées lorsque la surexpression de dominants négatifs des arrestines ne semble avoir aucun effet sur l'internalisation d'un GPCR. Certains GPCRs seraient capable d'interagir directement avec une des sous-unités du complexe AP-2 via des domaines dileucine ou motif de type tyrosine. Des voies alternatives impliquant une interaction avec des protéines cytoplasmiques via des domaines PDZ sont également suggérées. Cependant, ces derniers mécanismes demandent encore à être clairement définis.

$t_{1/2}$ . This relatively slow internalization kinetics of the UT receptor may be explained by the receptor being a poor substrate for GRK family members thereby leading to a low phosphorylated state and weaker interaction with  $\beta$ arrestins.

The role of different intracellular domains and residues of GPCRs in triggering internalization has been evaluated in several studies using site-directed mutagenesis. For some GPCRs such as the  $\beta$ 2-adrenergic receptor, deletions within the third intracellular loop alters agonist-induced internalization [26]. For the M3 muscarinic acetylcholine receptor, mutation of serine- and threonine-rich domains present in either the third intracellular loop or the carboxyl-terminal tail of the receptor abolishes agonist-induced internalization [27, 28]. Moreover, many examples showing the importance of the carboxyl-terminal tail of GPCRs in internalization have been described [29]. Since the carboxyl-terminal tail plays a critical role in the agonist-induced regulation of a number of GPCRs, we chose in the present study, to investigate the role of this region of the UT receptor in agonist-induced internalization.

We produced and expressed truncated receptors in order to identify which portion and/or specific determinants are involved in the internalization process. Our results show that deleting up to 50 residues of the cytoplasmic tail (UT $\Delta$ 336) did not affect the binding capacity or the efficiency with which the receptors were able to translocate to the cell surface. The UT $\Delta$ 336 mutant was functional in its capacity to activate phospholipase C and to activate the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway (ERK) pathway. The mechanisms by which GPCRs control the activity of MAP kinases vary according to receptor and cell type but fall broadly into one of three categories: 1) signals initiated by classical G protein effectors, e.g., protein kinase PKA and PKC, 2) signals initiated by cross-talk between GPCRs and classical receptor tyrosine kinases, e.g., “transactivation” of epidermal growth factor-like (EGF) receptors, and 3) signals initiated by direct interaction between  $\beta$ arrestins and components of the MAP kinase cascade, e.g.,  $\beta$ arrestin “scaffolds” [30]. Since deletion of the UT receptor C-tail reduces internalization without affecting either PLC or ERK activation and that UT receptor internalization involves  $\beta$ arrestin association, this would suggest that ERK activation by UT receptor in COS-7 cells is mediated by the classical G protein effectors or by transactivation of the EGF



receptor and possibly not by  $\beta$ arrestin “scaffolds”. Additional deletions of the UT receptor would be needed to completely address this point.

Although C-terminal deletions did not affect the functional properties of UT, our data indicate that four adjacent serines present in the last portion of the c-tail are involved in internalization of the UT receptor. Indeed, removal of the last 23 residues (UT $\Delta$ 363) or replacement of this cluster by four adjacent alanines (Mut4S) significantly reduced the agonist-induced internalization by 49% relative to the wild-type receptor after 90 minutes of agonist activation. Removal of 36 and 50 residues from the c-tail, which also removed a total of 15 of 17 potential phosphoacceptor sites within this domain, did not further affect the internalization rate of the UT receptor over that observed with the UT $\Delta$ 363 receptor suggesting that residues located between positions 336 and 363 do not significantly contribute to the internalization process. It also suggests that other regions of the receptor probably participate in UT receptor internalization. Mutant UT $\Delta$ 367, which retains the serine cluster, also internalizes less efficiently than does the wild-type receptor. This would suggest that the last 19 residues of the carboxyl-terminal tail contain motifs that, although not crucial to, participate in receptor internalization possibly by facilitating association of proteins involved in the internalization machinery.

Following agonist-induced activation of GPCRs, a common mechanism of regulation involves kinase-dependent phosphorylation of receptors that uncouples them from the heterotrimeric G-protein and promotes a rapid desensitization of signalling [31]. Phosphorylated c-tails of GPCRs become good docking sites for  $\beta$ arrestin binding, which contributes to keep the receptor uncoupled from the G protein and to target activated receptors toward clathrin-coated vesicles for internalization in endosomes. On the basis of their interaction with  $\beta$ arrestins and their internalization patterns, GPCRs can be divided into two distinct classes [32, 33]. Class A receptors bind  $\beta$ arrestin2 with higher affinity than  $\beta$ arrestin1 and do not interact with visual arrestin. In contrast, class B receptors bind both  $\beta$ arrestin isoforms with similar high affinity and also interact with visual arrestin. In the latter case,  $\beta$ arrestin forms a stable complex with receptors that colocalize in endocytic vesicles whereas class A- $\beta$ arrestin complexes dissociate at or near the plasma membrane. The ability of class B receptors to bind  $\beta$ arrestin family members with such

high affinity appears to be mediated in part by clusters of phosphorylated residues in the receptor carboxyl-terminal tail that is absent in class A receptors [32, 34].

The UT receptor possesses such a serine cluster located in its c-tail. Moreover, the use of a functional UT-GFP and either  $\beta$ arrestin1-YFP or  $\beta$ arrestin2-YFP allowed us to show that agonist-activated UT receptors form a stable endocytic complex with  $\beta$ arrestin1 as well as  $\beta$ arrestin2, and that this complex co-localizes to a considerable number of large vesicles classifying UT as a class B receptor. Previous reports have shown how specific serine/threonine clustered in c-tails of class B GPCRs serve as the primary site for agonist-induced receptor phosphorylation [35]. Without this motif the receptor/ $\beta$ arrestin interaction is less stable and the agonist-occupied receptor dissociate from  $\beta$ arrestin at or near the plasma membrane. Although the fact that UT possesses characteristics of class B receptors, replacement of the serine clusters by alanine do not totally abrogate stable receptor- $\beta$ arrestin2 complex formation. Indeed, in cells transfected with Mut4S, small vesicles as opposed to larger ones (for wild-type) containing  $\beta$ arrestins are observed, coupled with a basal level of fluorescence indicating presence of the mutant receptor at the cell surface. Therefore, Mut4S maintains its ability to associate with  $\beta$ arrestin1 as well as  $\beta$ arrestin2 in intracellular vesicles despite removal of the potentially phosphorylated serine cluster docking site, an essential condition for stable receptor/ $\beta$ arrestin association of other class B GPCRs. This pattern of receptor trafficking is reminiscent of the substance P receptor (SPR), whereby removal of all the serine/threonine clusters in the C-tail still enabled the receptor/arrestin complex to traffick, albeit weakly, into endocytic vesicles [35].

In view of our results, it is possible that the internalization defect of Mut4S revolves around the absence of the phosphorylated serine cluster thereby preventing the high affinity interaction between  $\beta$ arrestin and the receptor. The robust and persistent co-localization of agonist-activated UT-GFP with  $\beta$ arr1-YFP and  $\beta$ arr2-YFP in large perinuclear vesicles may highlight a more stable association between the UT receptor and  $\beta$ arrestins. However, the Mut4S-GFP receptor, although fully functional, would not allow a stable receptor- $\beta$ arrestin2 association and subsequently would not enable the receptor/ $\beta$ arrestin complex to be localized to large endosomal vesicles. Moreover, the fact

that the overexpression of  $\beta$ arrestin1,  $\beta$ arrestin2 and especially the phosphorylated-receptor independent  $\beta$ arrestin2 ( $\beta$ arrestin2-381T) all increased the extent of internalization of the Mut4S receptor favour this hypothesis. This outcome could be explained by the fact that overexpression of  $\beta$ arrestins with Mut4S would compensate for the decrease in receptor affinity for  $\beta$ arrestin.

In summary, we demonstrate that urotensin II stimulation promotes internalization of UT receptor. The serine cluster in the c-tail of UT seems be necessary for efficient internalization and targeting into large vesicles.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (to EE, GG and RL), the Heart and Stroke Foundation grants (to RL) and CIHR grant MOP-49447 (to SAL). MS holds a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) fellowship. SAL holds a Canada Research Chair in Molecular Endocrinology. EE holds a J.C. Edwards Chair in Cardiovascular Research. RL is a Senior Scholar of the FRSQ.

**REFERENCES**

1. 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
2. Douglas, S. A., Dhanak, D. and Johns, D. G. (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 76-85
3. Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Berry, C., Kirk, A., Richardson, M. and MacLean, M. R. (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **280**, H925-928
4. Douglas, S. A., Sulpizio, A. C., Piercy, V., Sarau, H. M., Ames, R. S., Aiyar, N. V., Ohlstein, E. H. and Willette, R. N. (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**, 1262-1274
5. 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., Douglas, S. A. and et al. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**, 282-286
6. Saetrum Opgaard, O., Nothacker, H., Ehlert, F. J. and Krause, D. N. (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur. J. Pharmacol.* **406**, 265-271
7. Douglas, S. A. and Ohlstein, E. H. (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 229-237
8. 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
9. Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653-692
10. Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* **66**, 61-79
11. von Zastrow, M. and Kobilka, B. K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 3530-3538
12. Tanowitz, M. and Von Zastrow, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **277**, 50219-50222
13. Martin, N. P., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2003) Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 45954-45959

14. 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
15. 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
16. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356
17. Laporte, S. A., Servant, G., Richard, D. E., Escher, E., Guillemette, G. and Leduc, R. (1996) The tyrosine within the NPXnY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. *Mol. Pharmacol.* **49**, 89-95
18. Ziltener, P., Mueller, C., Haenig, B., Scherz, M. W. and Nayler, O. (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **22**, 155-168
19. Kovoor, A., Celver, J., Abdryashitov, R. I., Chavkin, C. and Gurevich, V. V. (1999) Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 6831-6834
20. Heuser, J. E. and Anderson, R. G. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell. Biol.* **108**, 389-400
21. Roseberry, A. G. and Hosey, M. M. (2001) Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J. Cell. Sci.* **114**, 739-746
22. Pfeiffer, R., Kirsch, J. and Fahrenholz, F. (1998) Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp. Cell. Res.* **244**, 327-339
23. Sanders, M. A. and LeVine, H., 3rd. (1996) Desensitization of the neurokinin 1 receptor is mediated by the receptor carboxy-terminal region, but is not caused by receptor internalization. *J. Neurochem.* **67**, 2362-2372
24. Garland, A. M., Grady, E. F., Payan, D. G., Vigna, S. R. and Bunnett, N. W. (1994) Agonist-induced internalization of the substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. *Biochem. J.* **303** ( Pt 1), 177-186
25. Hermans, E., Octave, J. N. and Maloteaux, J. M. (1994) Receptor mediated internalization of neurotensin in transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 89-91
26. Cheung, A. H., Sigal, I. S., Dixon, R. A. and Strader, C. D. (1989) Agonist-promoted sequestration of the beta 2-adrenergic receptor requires regions involved in functional coupling with Gs. *Mol. Pharmacol.* **35**, 132-138
27. Moro, O., Lameh, J. and Sadee, W. (1993) Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 6862-6865

28. Yang, J., Williams, J. A., Yule, D. I. and Logsdon, C. D. (1995) Mutation of carboxyl-terminal threonine residues in human m3 muscarinic acetylcholine receptor modulates the extent of sequestration and desensitization. *Mol. Pharmacol.* **48**, 477-485
29. Krupnick, J. G. and Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319
30. Luttrell, L. M. (2002) Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 375-382
31. Ferguson, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1-24
32. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. and Caron, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32248-32257
33. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. and Barak, L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201-17210
34. Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G. and Ferguson, S. S. (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10999-11006
35. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. and Caron, M. G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J. Biol. Chem.* **276**, 19452-19460
36. Berridge, M. J. (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem. J.* **212**, 849-858

## Avant propos de l'article 2

### Article 2

#### **Mutational analysis of the conserved Asp<sup>2.50</sup> and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor**

Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R.

*Mol. Pharm.* 74(3): 552-561 (2008)

**Statut:** Publié

**Référence:** Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp<sup>2.50</sup> and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Molecular Pharmacology*. 4(3): 552-61

**Apport:** J'ai généré tous les résultats de ce manuscrit. J'ai rédigé la première version de ce manuscrit.

## Résumé de l'article 2

Les GPCRs de classe A (avec une homologie avec la rhodopsine) possèdent certains résidus et motifs conservés qui sont importants pour leur activité spécifique. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle du résidu Asp97<sup>2.50</sup> ainsi que des résidus Glu147<sup>3.49</sup>, Arg148<sup>3.50</sup> et Tyr149<sup>3.51</sup> du motif ERY sur la fonctionnalité du récepteur UT de l'urotensine II. Les mutations D97<sup>2.50</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ont abolié la capacité du récepteur UT à activer la phospholipase C alors que les mutations E147<sup>3.49</sup>A et Y149<sup>3.51</sup>A ont réduits de 50% la capacité du récepteur à activer la PLC. Aucun des mutants n'ont montré d'activité constitutive. Cependant, les mutants R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ont conservé leur capacité à activer les protéines ERK1/2. Cette dernière fut abolie par l'agent AG1478, un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur à l'EGF. Chacun de ces mutants ont conservé la capacité d'activer EGFR ce qui confirme que ces mutants activent la voie des MAPKs par un mécanisme indépendant de l'activation de la protéine G $\alpha_{q/11}$ , mais dépendant de l'activation du EGFR. Les mutants D97<sup>2.50</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ne sont pas internalisés ni ne co-localisent avec la  $\beta$ -arrestine2-GFP suivant leur activation par l'agoniste UII. Finalement, l'internalisation induite par l'agoniste du mutant E147<sup>3.49</sup>A s'est avérée plus importante que le récepteur de type-sauvage. Cette étude souligne la contribution majeure du résidu conservé Asp97<sup>2.50</sup> dans la fonctionnalité du récepteur UT et que le résidu Arg du motif ERY est un élément important afin de déterminer si une signalisation protéine G $\alpha_{q/11}$ -dépendante ou -indépendante peut survenir.



Title Page

Mutational analysis of the conserved Asp<sup>2.50</sup> and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor

Christophe D. Proulx, Brian J. Holleran, Antony A. Boucard, Emanuel Escher, Gaétan Guillemette and Richard Leduc

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

**Abstract**

Class A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors possess conserved residues and motifs that are important for their specific activity. In the present study, we examined the role of residue Asp97<sup>2,50</sup> as well as residues Glu147<sup>3,49</sup>, Arg148<sup>3,50</sup> and Tyr149<sup>3,51</sup> of the ERY motif on the functionality of the urotensin II receptor (UT). Mutations D97<sup>2,50</sup>A, R148<sup>3,50</sup>A and R148<sup>3,50</sup>H abolished the ability of UT to activate phospholipase C, whereas mutations E147<sup>3,49</sup>A and Y149<sup>3,51</sup>A reduced the ability to activate PLC by 50%. None of the mutants exhibited constitutive activity. However, R148<sup>3,50</sup>A and R148<sup>3,50</sup>H promoted ERK1/2 activation, which was abolished by AG1478, an inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase activity. Both these mutants were capable of directly activating EGFR, which confirmed that they activated the MAPK pathway by a  $G\alpha_{q/11}$ -independent transactivation of EGFR. The D97<sup>2,50</sup>A, R148<sup>3,50</sup>A and R148<sup>3,50</sup>H mutants did not readily internalize and did not promote translocation nor co-localize with  $\beta$ -arrestin2-GFP. Lastly, the agonist-induced internalization of the E147<sup>3,49</sup>A mutant receptor was significantly increased when compared to wild-type receptor. This study highlights the major contribution of the conserved Asp<sup>2,50</sup> residue to the functionality of the UT receptor. The Arg residue in the ERY motif of UT is an important structural element in signaling crossroads that determine whether  $G\alpha_{q/11}$ -dependent and – independent events can occur.

## Introduction

GPCRs, which make up the largest family of membrane proteins, are coded by upwards of 720 genes in the human genome (Wise et al., 2004). Of these, 280 belong to family A, which are classified by homology with rhodopsin (<http://www.iupharbb.org/receptorList/results.php>). Class A GPCRs respond to a wide array of ligands ranging from photons to large glycoproteins (Bockaert and Pin, 1999). More than 25% of clinically marketed drugs currently target class A GPCRs (Overington et al., 2006). In view of the broad range of biological functions and the great potential for pharmacological intervention, considerable interest has been generated in understanding the mechanisms by which GPCRs mediate their effects.

Overall homology among class A receptors is low and is restricted to a number of highly conserved key residues, suggesting that these residues play an essential role in the structural and/or functional integrity of these receptors. Most members of the rhodopsin-like family possess a conserved Asp residue (D<sup>2.50</sup>) in transmembrane domain 2 (TMD2) and a Glu/Asp-Arg-Tyr (E/D<sup>3.49</sup>-R<sup>3.50</sup>-Y<sup>3.51</sup>) motif at the junction of TMD3 and the second intracellular loop (ICL2). Using different biochemical methods, several groups have demonstrated movements between TMD3 and TMD6 when receptors undergo activation (Gether et al., 1997). In rhodopsin, the basal inactive state is maintained by an ionic lock, where R<sup>3.50</sup> and E<sup>3.49</sup> form a network of ionic interactions with E<sup>6.30</sup> at the cytoplasmic end of TMD6 (Palczewski et al., 2000). Protonation of E<sup>3.49</sup> in rhodopsin causes the pivoting movement between TMD3 and TMD6 and leads to receptor activation (Arnis et al., 1994). Mutations in E<sup>3.49</sup> and E<sup>6.30</sup> have been shown to promote constitutive activation of a number of GPCRs, suggesting that rhodopsin-like GPCRs may have similar activation

mechanisms (Ballesteros et al., 2001; Scheer et al., 1996). However, replacement of E<sup>3.49</sup> does not always lead to constitutive activity (Capra et al., 2004; Chung et al., 2002; Feng and Song, 2003). In addition, the crystal structure of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor indicates that in the basal state, the distance between TMD3 and TMD6 is greater in this receptor than in rhodopsin, which would not allow interactions between specific residues in these domains to occur (Rosenbaum et al., 2007). Discrepancies in the functional effects revealed by mutational analyses of these residues in class A GPCRs and those deduced from the crystal structure of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor suggest alternative roles for the E/D<sup>3.49</sup> residue and the E/DRY motif in class A GPCRs. For example, based on simulations using the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor, Scheer et al. suggested that R<sup>3.50</sup> in the inactive state is constrained in a "polar pocket" formed by residues N<sup>1.50</sup>, D<sup>2.50</sup>, N<sup>7.49</sup> and Y<sup>7.53</sup> (Scheer et al., 1996).

Urotensin II (UII), a cyclic undecapeptide in human and originally isolated from the caudal neurosecretory system of teleost fish, has since been identified in many classes of vertebrates, including humans (Douglas et al., 2004). While it is clear that UII influences the physiological regulation of mammalian cardiovascular function, early studies led to conflicting reports of vasoactive responses, depending on the species or tissues studied, with UII acting both as a potent vasodilator (Stirrat et al., 2001) and a vasoconstrictor (Douglas et al., 2000). UII is the endogenous ligand for the G protein-coupled UT receptor (originally called GPR14) (Ames et al., 1999). The UT receptor belongs to the class A family of GPCRs. Upon UII binding it functionally couples to G $\alpha_{q/11}$  thereby promoting phospholipase C activation (Saetrum Opgaard et al., 2000), Ca<sup>2+</sup> mobilization (Ames et al., 1999) and MAPK activation (Ziltener et al., 2002). UT is found

in the central nervous system and is widely expressed in human tissues, including the left atrium and ventricle of the heart, smooth muscle cells in the coronary artery and aorta and endothelial cells in vascular beds (Douglas et al., 2004). Compelling evidence has implicated the urotensin system in the pathophysiology of hypertension, heart failure and of cardiac fibrosis and hypertrophy (Douglas et al., 2004).

Here, we investigate how substitution of the conserved residue D97<sup>2.50</sup> in TMD2 and E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> and Y149<sup>3.51</sup> in the ERY motif affects binding, signaling and internalization of the UT receptor. Our results demonstrate that Asp<sup>2.50</sup> plays a critical role in the activation of the UT receptor. Mutational analyses of the highly conserved Arg<sup>3.50</sup> reveal that this residue is important in G $\alpha_{q/11}$ -protein-dependent UT signaling and reveals a G $\alpha_{q/11}$ -protein-independent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK).

## Materials and Methods

**Materials.** Bovine serum albumin and bacitracin were from Sigma-aldrich (Oakville, ON, Canada). The cDNA encoding the rat UT receptor (GPR14) subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3 was a generous gift from Dr. Brian O'Dowd (University of Toronto). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin and oligonucleotide primers were from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA), FuGENE™-6, protease inhibitor cocktail and mouse monoclonal anti-myc antibody were from Roche (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated and active forms of p42/p44 MAPK were from New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada), goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibody was from Invitrogen Molecular Probes (Burlington, ON, Canada), anti-EGFR antibodies (sc-03) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Bisindolylmaleimide I (BIM), AG1478, mouse anti-phosphotyrosine (PY20) antibodies and the phosphatase inhibitor cocktail set II were from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and urotensin II was from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA).  $^{125}\text{I}$ -UII (specific radioactivity 400 Ci/mmol) was prepared with IODO-GEN as described by Fraker and Speck (Fraker and Speck, 1978). Briefly, 25  $\mu\text{l}$  of 1 mM peptide solution was incubated with 20  $\mu\text{g}$  of IODO-GEN (Pierce Chemical Co.), 65  $\mu\text{l}$  of 100 mM borate buffer pH 8.5 and 1 mCi of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  for 30 min at room temperature. The labeled peptides were purified by HPLC on a C-18 column (10  $\mu\text{m}$ , Allteck Associates Inc.) with a 35-45% acetonitrile gradient. The specific radioactivity of the labeled hormones was determined by self-displacement and saturation binding analyses.

**PCR mutagenesis.** Mutant UT receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Expand High Fidelity PCR System, Roche) using rat mycUT cDNA inserted into pcDNA3.1 (Invitrogen) as a template. Two sets of forward and reverse oligonucleotides were used to introduce mutations at D97<sup>2.50</sup>, E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> and Y149<sup>3.51</sup>. PCR products were subcloned using KpnI and XbaI sites of pcDNA3.1 after digestion by the same restriction enzymes. Mutagenesis was confirmed by automated nucleotide sequencing.

**Cell culture and transfections.** COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin at 37°C. Cells ( $1.2 \times 10^6$ ) were plated in 100-mm culture dishes. When they reached 70% confluency, they were transfected with 2 µg of plasmid DNA and 4 µl of FuGENE™-6 according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were grown for 48 h before performing binding assays. For confocal microscopy, HEK-293 cells were plated on 12 mm<sup>2</sup> coverslips in 6-well plates at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/well. When cells reached 70% confluency, they were transfected with 1 µg of receptor plasmid DNA/0.5 µg of β-arrestin2-GFP plasmid DNA and 2 µl of FuGENE™-6 according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were grown for 24 h and images were captured using a Fluoview™ FV1000 confocal microscope (Olympus).

**Binding Experiments.** COS-7 cells were grown for 48 h post-transfection in 100-mm culture dishes, washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken

cells were gently scraped in 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 saturation binding assays, broken cells (10-15 µg of protein) were incubated for 1 h at room temperature in binding buffer containing increasing concentrations of <sup>125</sup>I-UII (0.15-20 nM) (50 Ci/mmol) 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. Non-specific binding was measured in the presence of 1 µM unlabeled urotensin II. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ counting. K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> values were evaluated using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Peptide stability was evaluated by TLC. No degradation was observed after incubating the peptide with COS-7 cell membranes for up to 2 h.

**Measurement of agonist-induced inositol phosphates.** Inositol phosphate (IP) accumulation was measured as described previously (Lanctot et al., 1999). Briefly, COS-7 cells were seeded in 6-well plates, transfected and labeled for 16 h in serum-free, inositol-free DMEM containing 10 µCi/ml of [<sup>3</sup>H]myo-inositol (Amersham Pharmacia Biotech). Cells were washed twice with PBS supplemented with 0.1% dextrose and incubated in stimulation buffer (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM LiCl and 0.1% BSA) for 30 min at 37°C. Inositol phosphate production was induced by adding 0.1 µM urotensin II for 10 min at 37°C in stimulation buffer. Incubations were terminated by the addition of ice-cold perchloric acid (final 5% v/v). Water-soluble IPs were extracted with an equal volume of a 1:1 mixture of 1,1,2-trichlorotrifluoroethane and tri-n-octylamine. The



samples were vigorously mixed and centrifuged at 2500 x g for 30 min. The upper phase containing the IPs was applied to an AG1-X8 resin column (BioRad). The IPs were sequentially eluted with ammonium formate/formic acid solutions of increasing ionic strength. Fractions containing IPs were collected and radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. Parallel plates were used to measure receptor expression and IP accumulation levels were adjusted based on receptor expression levels.

**Preparation of cell extracts and immunoblotting.** Transfected COS-7 cells in 6-cm dishes were starved for 12–18 h in serum-free medium prior to stimulation. Where specified, protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (BIM) alone or in combination with EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 was added 30 min before UII. After stimulation, the medium was removed and cells were rinsed with ice-cold PBS. Cells were then lysed with 150  $\mu$ l of radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 4 mM EDTA, 0.1% SDS) containing protease inhibitor cocktail, 150 mM NaF, 50 mM sodium orthovanadate and 250 mM  $\beta$ -glycerophosphate. Samples were centrifuged to remove insoluble material and protein concentrations were measured by Bradford assay. Proteins (40  $\mu$ g) were resolved on 10 % Tris/glycine polyacrylamide gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting. Phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2 were detected by immunoblotting with rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (1:2000) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and anti-MAP kinase (1:4000) (Upstate Technology Inc., Lake Placid, NY, USA) respectively. The antibodies were visualized with donkey anti-rabbit HRP antibodies (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) using Western Lightning

Chemiluminescence Reagent Plus according to the manufacturer's instructions (PerkinElmer Life Sciences). Films were scanned, and band intensities were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

**EGFR phosphorylation.** Transfected COS-7 cells in 10-cm dishes were starved for 12-18 h in serum-free medium prior to stimulation. Cells were then stimulated with UII (0.1  $\mu$ M) or EGF (10 nM) for the indicated times, the medium was removed and cells were rinsed with ice-cold PBS. Cells were then lysed with 800  $\mu$ l of lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl and 4 mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail, a phosphatase inhibitor cocktail, 150 mM NaF, 50 mM sodium orthovanadate and 250  $\mu$ M  $\beta$ -glycerophosphate. Samples were centrifuged to remove insoluble material and protein concentrations were measured by Bradford assay. Equal amount of protein were immunoprecipitated using anti-EGFR antibodies. Western blots were probed sequentially with anti-phosphotyrosine antibody (PY20) and the anti-EGFR antibody. The antibodies were visualized with specific secondary HRP antibodies (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus according to the manufacturer's instructions (PerkinElmer Life Sciences). Films were scanned and band intensities were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

**Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay.** Receptor internalization was quantified by ELISA as described elsewhere (Parent et al., 2001). Briefly, COS-7 cells were seeded at  $1.2 \times 10^6$  cells/100-mm dish and transfected with 2  $\mu$ g of myc-UT or mutant cDNA in combination with 2  $\mu$ g pcDNA3.1 or  $\beta$ -arrestin2-GFP cDNA. Twenty-four hours post-

transfection, cells were transferred into six wells of a 24-well plate. The following day, the cells were washed once with PBS and incubated in the presence or the absence of 0.1  $\mu$ M UII for 120 min at 37°C in pre-warmed DMEM supplemented with 0.5% BSA and 20 mM HEPES, pH 7.4. The medium was then removed, the cells were fixed in 3.7% formaldehyde/TBS (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl) for 5 min at room temperature and washed three times with TBS. Non-specific binding was blocked by incubating the cells in 1% TBS/BSA for 30 min. Anti-myc-specific monoclonal antibody (1:500 in TBS/BSA) was then added and the incubation was continued for a further 60 min. Cells were then washed three times with TBS, blocked in TBS/BSA for 15 min and incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse (1:1000 in TBS/BSA) for 60 min. Cells were then washed three times with TBS. *p*-Nitrophenyl-phosphate (250  $\mu$ l) was added and the plates were incubated at 37°C until a yellow color appeared (standardized at 45 min). A 100  $\mu$ l aliquot was collected, neutralized by adding 100  $\mu$ l of 0.4 N NaOH and the absorbance was read at 405 nm using a Titertek Multiskan MCC/340 spectrophotometer. Cells transfected with pcDNA3.1 alone were used as controls. Results are shown as the percentage of cell surface receptor loss, where unstimulated cells represent 100% of receptor cell surface expression. To determine the expression levels of cell surface receptors, absorbance of unstimulated cells transfected with each receptor was measured and expressed as fold absorbance over cells transfected with empty vector.

**Confocal microscopy.** HEK-293 cells expressing myc-tagged UT (myc-UT) or mutant receptors and  $\beta$ -arrestin2-GFP were stimulated at 37°C with 0.1  $\mu$ M UII for 30 min. They were then fixed for 30 min at room temperature in a solution of 3% (w/v)

paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min and blocked with 1% BSA/PBS for 30 min. Cells were then incubated with anti-myc antibodies for 1 h at room temperature and then with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> for 1 h. Coverslips were mounted on slides using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, U.K.).

Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to an inverted microscope with a PlanApo 60x/1.42 oil immersion objective. Specimens were laser-excited at 488 nm (40 mW Argon laser) for GFP and 543 nm (Helium-Neon laser) for Alexa Fluor 594. To avoid cross-talk between GFP and Alexa Fluor 594 fluorescence, readings were recorded sequentially at wavelengths ranging from 505 to 530 nm and 580 to 650 nm, respectively. Serial horizontal optical sections (1024x1024 pixels) with two-time line averaging were acquired. Olympus Fluoview software version 1.6a was used for image acquisition and analysis. The images were further processed using Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

**Data analysis.** Results were collected in triplicate and are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). Binding curves, binding capacity ( $B_{max}$ ) and  $K_d$  values were determined using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego CA, USA). Statistical significance of the difference was assessed using one-way ANOVA and post-hoc Dunnett test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Results

**Binding properties of wild-type and mutant UT receptors.** To study the involvement of D97<sup>2.50</sup>, E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> and Y149<sup>3.51</sup> in the functionality of the UT receptor, we mutated the residues to alanine (D97<sup>2.50</sup>A, E147<sup>3.49</sup>A, R148<sup>3.50</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A, respectively). Another mutant (R148<sup>3.50</sup>H), which was based on a reported single nucleotide polymorphism (SNP) of the UT receptor (refSNP ID: rs13305975), was also constructed. To facilitate the comparison of residues in TMDs, amino acids were indexed according to their positions relative to the most conserved residue in the TMD (designated X.50, X being the TMD number) in which they are located (Figure 1) (Ballesteros and Weinstein, 1995).

To characterize the pharmacological properties of all mutants, binding analyses using increasing concentrations of <sup>125</sup>I-UII (saturation kinetics) in transiently transfected COS-7 cells were used to characterize the pharmacological properties of the mutants. Table 1 shows that K<sub>d</sub> values ranged from 1.4 ± 0.2 nM (E147<sup>3.49</sup>A) to 7.9 ± 2.3 nM (D97<sup>2.50</sup>A) while expression levels ranged from 1.6 to 5.7 pmol/mg protein. ELISA analysis confirmed that mutant receptors were expressed at similar levels to those of wild-type receptor (see table 1).

**D97<sup>2.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup> mutants abolish inositol phosphate accumulation.** To evaluate the functional properties of the wild-type and mutant receptors, we tested their capacity to activate G $\alpha_{q/11}$  by measuring UII-induced inositol phosphates accumulation. As shown in figure 2, 0.1  $\mu$ M UII caused a significant inositol phosphate accumulation in COS-7 cells expressing the wild-type UT receptor. However, the effect of UII was significantly

Figure 1

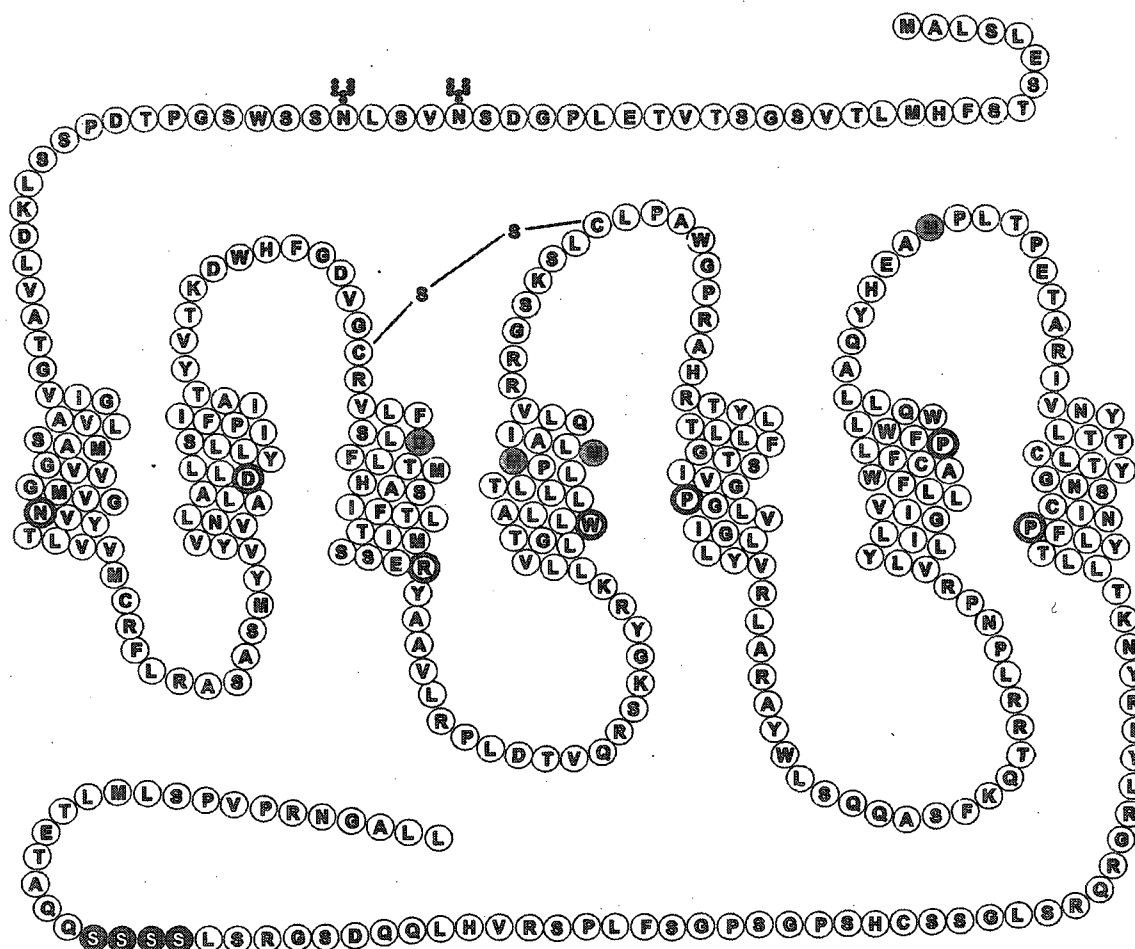


Figure 1. Schematic representation of the rat UT receptor.

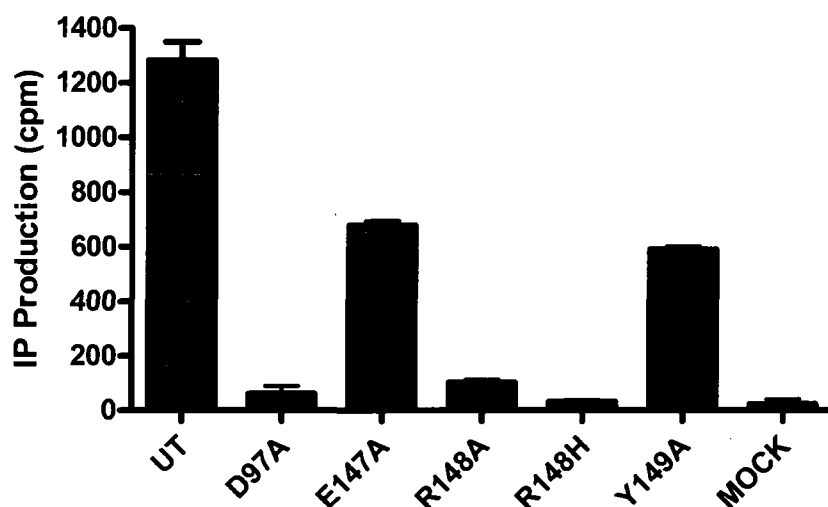
The wild-type UT receptor (386 aa) and mutant receptors (light grey) in which D97<sup>2.50</sup>, E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> and Y149<sup>3.51</sup> were replaced by alanine or histidine (R148<sup>3.50</sup>H). The most conserved residues of each TMD are circled in bold. Residues of the UT receptor that are important for UII binding are in dark grey (Boucard et al., 2003; Holleran et al., 2007) and those that are important for internalization are in black with white lettering (Proulx et al., 2005). Putative Asn-glycosylation sites (N29, N33) and the conserved disulphide bridge are depicted.

**Table 1. Affinities and expression levels of UT receptor mutants in transiently transfected COS-7 cells.**

<sup>a</sup>Saturation-binding studies with broken cells expressing wild-type or mutant receptors were carried out as described in Material and Methods. Bmax and Kd values were determined using GraphPad Prism version 5.00 for Windows. <sup>b</sup>Relative expression of wild-type and mutant receptors determined by ELISA (fold absorbance over mock transfected cells).

Receptor	Kd (nM) <sup>a</sup>	Bmax (pmol/mg protein) <sup>a</sup>	Cell surface expression <sup>b</sup>
UT	3.8 ± 1.9	3.2 ± 1.6	6.0 ± 1.3
D97 <sup>2.50</sup> A	7.9 ± 2.3	3.3 ± 2.6	6.1 ± 1.5
E147 <sup>3.49</sup> A	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.6	4.0 ± 0.9
R148 <sup>3.50</sup> A	5.6 ± 1.4	4.7 ± 4.4	6.3 ± 1.5
R148 <sup>3.50</sup> H	4.7 ± 2.4	5.6 ± 3.0	5.9 ± 1.8
Y149 <sup>3.51</sup> A	3.1 ± 0.5	1.8 ± 1.0	5.8 ± 1.4

Results are the means of three to five separate experiments

**Figure 2****Figure 2. Inositol phosphate production by the wild-type and mutant receptors.**

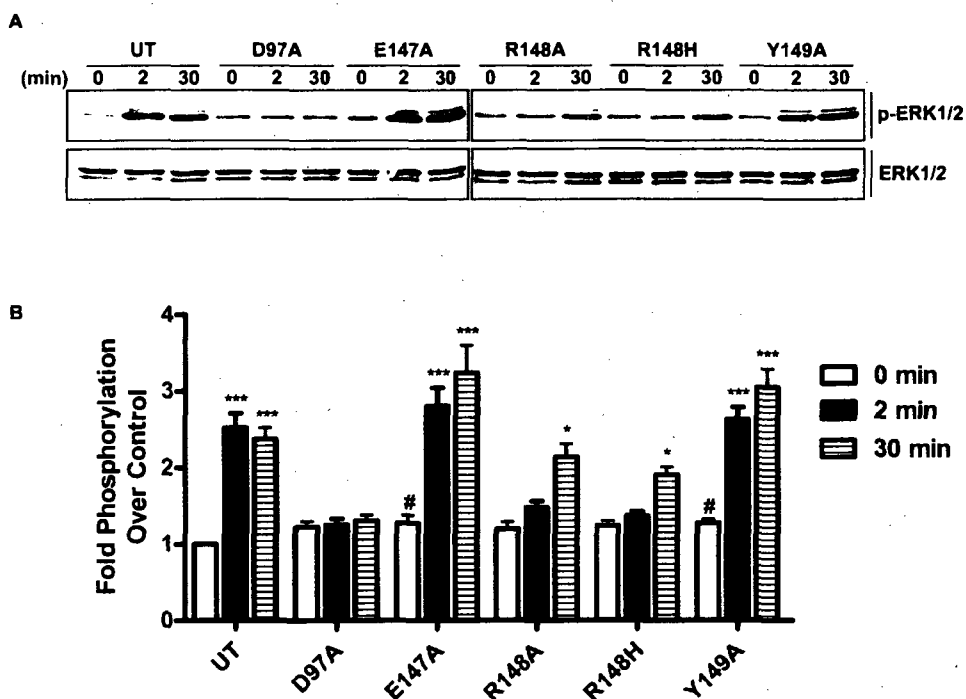
Inositol phosphate production was evaluated in COS-7 cells transfected with wild-type or mutant receptors. Inositol phosphate production was induced with 0.1  $\mu$ M UII for 10 min at 37°C in stimulation buffer. The incubation was stopped with perchloric acid and inositol phosphate levels were measured as described in Materials and Methods. Results are the sum of the amounts of inositol bisphosphate, inositol trisphosphate and inositol tetrakisphosphate in excess of the basal level and are expressed as mean experimental variations of triplicate values. The results are representative of four independent experiments.



reduced in cells expressing the E147<sup>3.49</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A mutant receptors. Moreover, cells expressing the D97<sup>2.50</sup>A or R148<sup>3.50</sup> mutant receptors did not accumulate inositol phosphates following UII stimulation. No constitutive activity was observed for any receptor tested as measured by inositol phosphate accumulation under basal conditions (data not shown).

**R148<sup>3.50</sup> mutants can activate the MAPK pathway.** UT receptor-mediated signaling activates the MAPK pathway, particularly by promoting extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation (Proulx et al., 2005; Ziltener et al., 2002). We previously reported that deleting specific residues in the carboxy terminus of the UT receptor does not affect its ability to activate the ERK1/2 pathway (Proulx et al., 2005). In the present study, we measured the effect of D97<sup>2.50</sup> and ERY motif mutations on ERK1/2 activation by immunoblotting with antibodies directed against the phosphorylated active forms of ERK1/2 (p-ERK1/2). Addition of 0.1  $\mu$ M UII to COS-7 cells transiently transfected with wild-type UT, E147<sup>3.49</sup>A or Y149<sup>3.51</sup>A mutant receptors led to a robust activation of ERK1/2 after 2 and 30 min (Figure 3a and 3b). The D97<sup>2.50</sup>A mutant did not activate ERK1/2 following UII stimulation. Interestingly, and unlike their inability to activate  $G\alpha_{q/11}$ , the R148<sup>3.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup>H mutants were able to activate the MAPK pathway, although the temporal pattern of MAPK activation was altered. Indeed, very little ERK1/2 activation was observed after 2 min of UII stimulation whereas significant activation was detected after 30 min. The E147<sup>3.49</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A mutants exhibited a very slight but statistically significant increase of the basal phosphorylation of ERK1/2

Figure 3



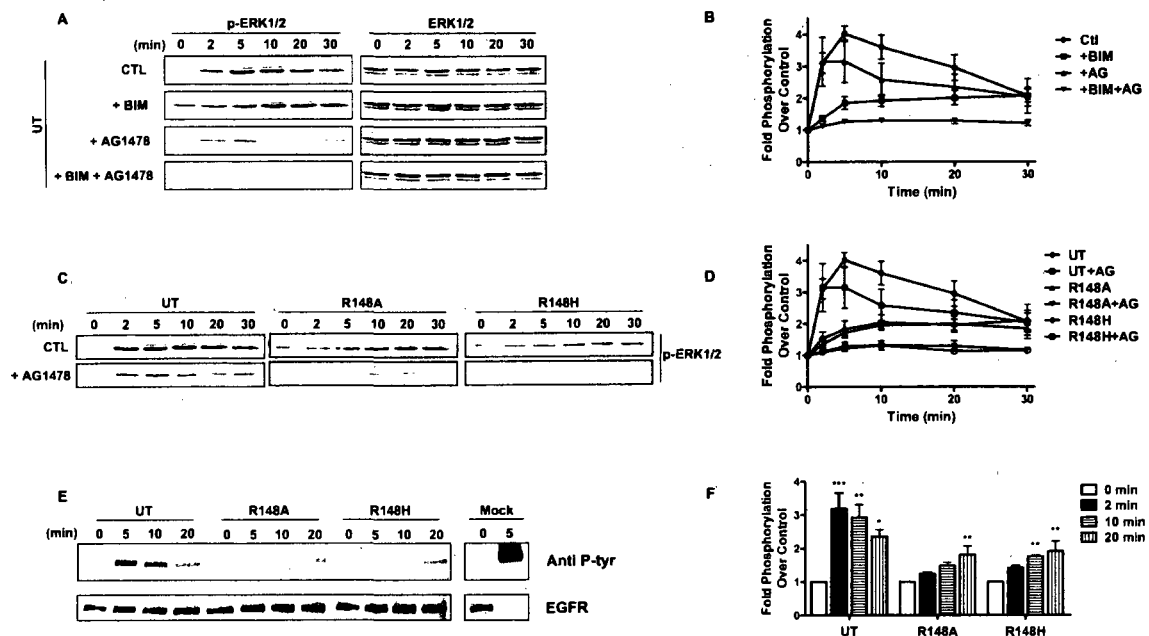
**Figure 3. Effect of UT receptor mutations on MAPK activation.**

COS-7 cells transiently transfected with either wild-type or mutant receptors were serum-starved overnight. They were then treated with 0.1  $\mu$ M UII at 37°C for 0 min, 2 min or 30 min in DMEM and lysed. Equal amounts of protein were resolved by SDS/PAGE. A. Activated MAPK was identified by immunoblotting using phospho-MAPK specific antibody, which labeled the 44 and 42 kDa bands (ERK1 and ERK2 respectively). The total amount of MAPK was the same in all samples based on parallel blots probed with antibody directly against total MAPK. B. p-ERK1/2 bands were analysed by densitometry and presented as fold phosphorylation (mean  $\pm$  S.E.M. n=3) over UT basal. Statistical significance of the difference was assessed using one-way ANOVA and post-hoc Dunnett test. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001. # represents statistically significant differences (p<0.05) of basal phosphorylation of mutants compared with basal phosphorylation of wild-type UT.

that may represent constitutive activity of these mutants towards MAPK activation (Figure 3b).

**UT-dependent activation of ERK1/2 involves both PKC and transactivation of the EGF receptor.** Because the G protein-mediated activity of UII is typically transduced by  $G\alpha_{q/11}$  leading to PKC activation, we evaluated the extent of PKC dependence on ERK1/2 activation in COS-7 cells transfected with the UT receptor. Moreover, EGFR-dependent ERK1/2 activation by the UT receptor has been reported in cardiomyocytes (Onan et al., 2004). To determine the contribution of PKC- and EGFR-dependent mechanisms to ERK1/2 activation, cells were pretreated either with 1  $\mu$ M BIM, a PKC inhibitor, or with 0.5  $\mu$ M AG1478, an EGFR kinase inhibitor, or simultaneously with both inhibitors before evaluating the temporal pattern of ERK1/2 activation by UII. In untreated COS-7 cells transfected with the UT receptor, 0.1  $\mu$ M UII promoted a specific temporal ERK1/2 activation pattern (Figure 4a and 4b). Early rapid activation of ERK1/2 was observed at 2–5 min, peaking at 5 min followed by a slow decrease toward basal levels (30 min). BIM-mediated PKC inhibition reduced early ERK1/2 activation but did not affect late ERK1/2 activation (10-30 min). On the other hand, AG1478 reduced ERK activation at each time point, but early activation (2-5min) was maintained. The addition of both BIM and AG1478 almost entirely abolished the ability of the UT receptor to promote ERK1/2 phosphorylation, suggesting that the PKC- and EGFR-dependent pathways play a major role in ERK1/2 activation by UT. These results suggest that PKC activation and EGFR transactivation are the main ERK-activation pathways in COS-7 cells following UT

Figure 4



**Figure 4. R148<sup>3,50</sup> mutants promote ERK1/2 activation by transactivation of EGFR.**

COS-7 cells transiently transfected with wild-type receptor (A) or R148 mutants (B) were serum-starved overnight. They were then treated with 1  $\mu$ M BIM and/or 0.5  $\mu$ M AG1478 for 30 min, stimulated with 0.1  $\mu$ M UII at 37°C for the indicated time in DMEM and lysed. Equal amounts of protein were resolved by SDS/PAGE. Activated MAPK was identified by immunoblotting using phospho-MAPK-specific antibody, which labeled the 44 and 42 kDa bands (ERK1 and ERK2, respectively). The total amount of MAPK was the same in all samples based on parallel blots probed with antibody directed against total MAPK. B and D. p-ERK1/2 bands were analysed by densitometry and presented as fold phosphorylation (mean  $\pm$  S.E.M. n=3) over basal as reference. E. COS-7 cells transiently transfected with wild-type receptor or R148<sup>3,50</sup> mutants were serum-starved overnight. They were then stimulated with 0.1  $\mu$ M UII at 37°C for the indicated time in DMEM and lysed. The EGFR was immunoprecipitated from cell extracts and Western blotted using antibodies for phosphotyrosine and total EGFR protein. F. p-Tyr-EGFR bands were analysed by densitometry and presented as fold phosphorylation (mean  $\pm$  S.E.M. n=3) over basal. Statistical significance of the difference was assessed using one-way ANOVA and post-hoc Dunnett test. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

receptor activation. They also revealed the important contribution of PKC to UII-induced phosphorylation of ERK1/2 at the early time points.

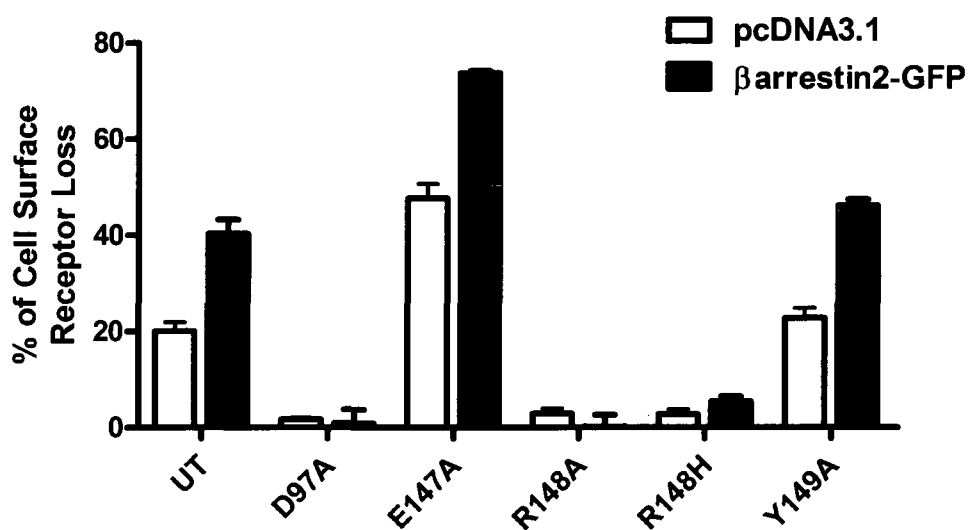
**R148<sup>3.50</sup> mutants transactivate EGFR via a  $G\alpha_{q/11}$ -independent mechanism.** To better understand how the R148<sup>3.50</sup> mutants promoted ERK1/2 phosphorylation, we determined the temporal pattern of ERK1/2 activation by R148<sup>3.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup>H. Figure 4c and 4d show that the R148<sup>3.50</sup> mutants promoted ERK1/2 activation but that the activation was delayed. This suggests that these mutants, because they are unable to activate the  $G\alpha_{q/11}$ -PLC pathway, promote ERK1/2 phosphorylation by transactivating EGFR. This is supported by the fact that AG1478 entirely abolished UII-induced ERK1/2 phosphorylation in cells expressing the R148<sup>3.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup>H mutants (Figure 4c and 4d). To confirm that the R148<sup>3.50</sup> mutants were able to promote EGFR transactivation, COS-7 cells transiently transfected with wild-type UT receptor or R148<sup>3.50</sup> mutant constructs were stimulated with UII and lysed. Presence of active tyrosine-phosphorylated EGFR was then confirmed with anti-phosphotyrosine antibodies (anti-p-Tyr). Figure 4e shows that activated UT receptor, as well as both R148<sup>3.50</sup> mutants, promoted the tyrosine phosphorylation of EGFR. Moreover, this transactivation was delayed in cells expressing the R148<sup>3.50</sup> mutants (figure 4e and 4f). These results suggest that R148<sup>3.50</sup> of the ERY motif is essential for the activation of  $G\alpha_{q/11}$  but is not involved in the transactivation of EGFR and that the UT receptor activates two independent mechanisms that lead to ERK1/2 phosphorylation.

**Role of D97<sup>2.50</sup>, E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> and Y149<sup>3.51</sup> in agonist-dependent cell surface receptor loss.** We previously showed that UT undergoes agonist-induced internalization in COS-7 cells (Proulx et al., 2005). Figure 5 shows that a two-hour treatment with 0.1  $\mu$ M UII caused a significant 20% loss of cell surface receptors on cells expressing the UT receptor. Under the same conditions, the D97<sup>2.50</sup>A and both R148<sup>3.50</sup> mutant receptors did not show any significant loss of cell surface receptors while the Y149<sup>3.51</sup>A mutant behaved as wild-type receptor. Interestingly, the agonist-induced cell surface loss of E149<sup>3.49</sup>A receptors increased considerably when compared to wild-type receptor. To determine whether this was modulated by arrestins, we co-expressed  $\beta$ -arrestin2-GFP with the wild-type and mutant receptors. As shown in figure 5 (black columns), co-expression of  $\beta$ -arrestin2-GFP increased cell surface receptor loss of the wild-type, the E147<sup>3.49</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A mutant receptors by 100%, 54% and 102%, respectively, but did not significantly affect the cell surface loss of the D97<sup>2.50</sup>A or R148<sup>3.50</sup> mutants.

**D97<sup>2.50</sup> and R148<sup>3.50</sup> mutants do not promote  $\beta$ -arrestin translocation.** We previously reported that activated UT receptors traffic into intracellular vesicles in HEK-293 cells and co-localize with either  $\beta$ -arrestin1-YFP or  $\beta$ -arrestin2-GFP (Proulx et al., 2005). To determine whether activated mutant receptors were able to promote  $\beta$ -arrestin translocation, we co-expressed myc-tagged wild-type and mutant receptors with functional conjugated  $\beta$ -arrestin2-GFP in HEK-293 cells. Under control conditions, UT was localized to the plasma membrane (Figures 6a) while  $\beta$ -arrestin2-GFP was uniformly distributed in the cell cytosol. After exposure to agonist (30 min), both UT and  $\beta$ -arrestin2-GFP redistributed to vesicular structures of the cell and UT co-localized with  $\beta$ -

arrestin2-GFP (Figure 6a, merged images). Under the same experimental conditions, D97<sup>2.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup> mutants were also distributed in the plasma membrane under basal conditions, but exposure to UII did not modify their distribution nor the cytosolic distribution of  $\beta$ -arrestin2-GFP (Figure 6b). However, E147<sup>3.49</sup>A and Y149<sup>3.51</sup>A behaved like the wild-type receptor distributing at the plasma membrane under control conditions and co-localizing with  $\beta$ -arrestin2-GFP in vesicular structure after exposure to UII.

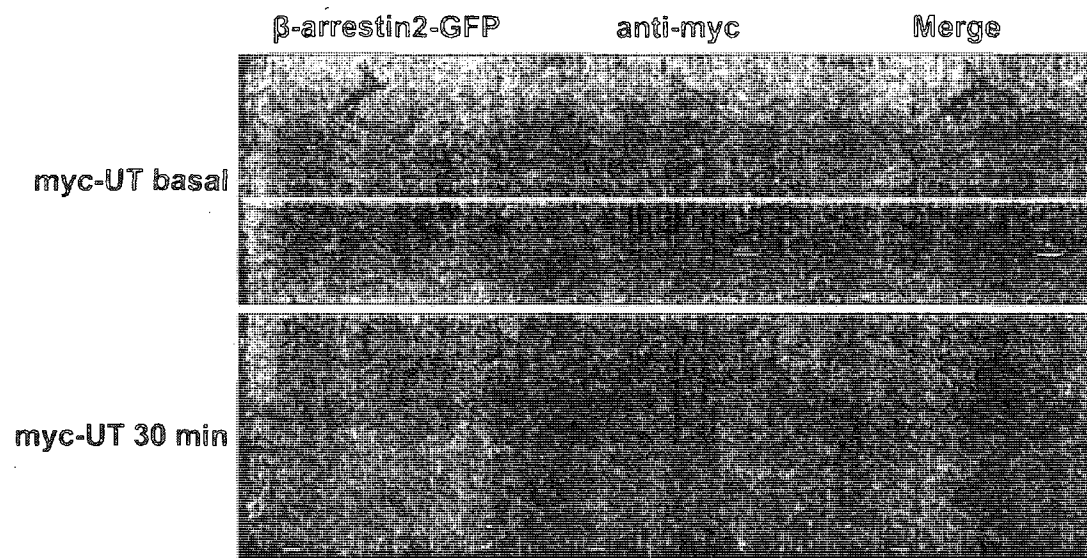


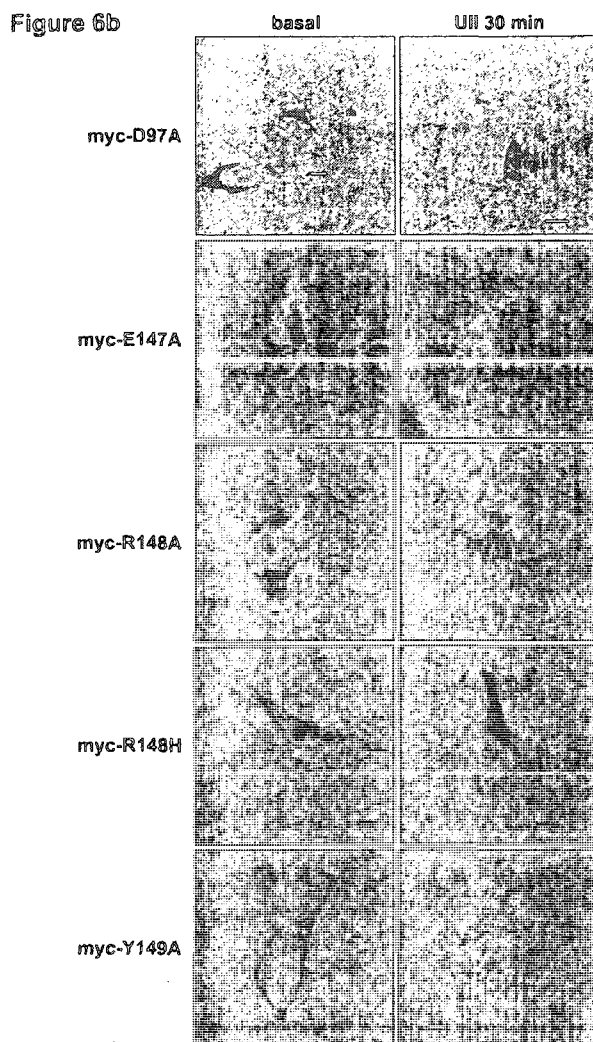
**Figure 5**

**Figure 5. Agonist-dependent cell surface receptor loss of wild-type and mutant receptors.**

COS-7 cells expressing myc-tagged UT or mutant receptors co-transfected with pcDNA3.1 or  $\beta$ -arrestin2-GFP were stimulated with 0.1  $\mu$ M UII for 120 min. Cell surface receptor loss was quantified by ELISA as described in Materials and Methods. Mock-transfected cells were used to determine background. Results are the means  $\pm$  S.E.M of four independent experiments.

Figure 6a





**Figure 6. Co-localization of  $\beta$ -arrestin2 with agonist-activated UT and mutant receptors.**

HEK-293 cells were transiently transfected with either myc-UT (A) or myc-tagged mutant receptors (B) together with  $\beta$ -arrestin2-GFP. Shown are representative confocal microscopic images of either myc-UT or myc-tagged mutants and  $\beta$ -arrestin2-GFP fluorescence in HEK-293 cells treated with agonist for 30 min at 37°C as described in Material and Methods. Scale bars equal 5  $\mu$ m. Experiments were repeated three times, with similar results.

## Discussion

The aim of this study was to determine the role of the conserved residues/motif D<sup>2.50</sup> and ERY on the functionality of the UT receptor. Five mutants were constructed, all of which displayed cell-surface expression levels and binding properties towards the natural ligand, UII, that were similar to that of the wild-type receptor, which suggests that the mutations did not significantly perturb the overall structure of the receptor.

Substitution of D<sup>2.50</sup> in TMD2 by alanine in the UT receptor (D97<sup>2.50</sup>A) led to a receptor that could no longer activate phospholipase C with ensuing lack of inositol phosphate production. U-II binding did not promote loss of cell surface of the D97<sup>2.50</sup>A receptor nor did it activate the MAPK pathway. D<sup>2.50</sup> plays a major role in the activation of class A GPCRs since mutations of this residue alter the signaling capacity of many GPCRs (Bihoreau et al., 1993; Neve et al., 1991). An interaction between D<sup>2.50</sup> and the conserved N<sup>7.49</sup> of the NPxxY motif in TMD7 may be important in the activation mechanism of GPCRs (Sealfon et al., 1995; Urizar et al., 2005). N<sup>7.49</sup> acts as an on/off switch by adopting different orientations in the inactive and active states (Govaerts et al., 2001; Urizar et al., 2005). In the inactive state, N<sup>7.49</sup> is restrained toward TMD6 while in the active state, it likely adopts an orientation favoring an interaction with D<sup>2.50</sup> (Urizar et al., 2005). Altering D<sup>2.50</sup> in the UT receptor would abrogate an obligatory interaction with N<sup>7.49</sup> in TMD7 needed to maintain the active state. Like other class A GPCRs, substituting the D<sup>2.50</sup> residue in the UT receptor with another amino acid would profoundly affect the ability of the receptor to transit from an inactive to an active state upon agonist binding.

In many GPCRs, including rhodopsin, mutating Glu or Asp in the E/D<sup>3.49</sup>RY motif to either Ala or Asn may eliminate an ionic interaction with R<sup>3.50</sup> and increase their

**Table 2. Summary of results obtained with wild-type and mutant receptors.**

<b>Receptor</b>	<b>IPs</b>	<b>ERK1/2</b>	<b>EGFR transactivation.</b>	<b>% Cell Surface Recepteur Loss</b>	<b>Co-local. β-arr2-GFP</b>
<b>UT</b>	+	+	+	+	+
<b>D97<sup>2.50</sup>A</b>	-	-	n.d.	-	-
<b>E147<sup>3.49</sup>A</b>	+	+	n.d.	+	+
<b>R148<sup>3.50</sup>A</b>	-	+	+	-	-
<b>R148<sup>3.50</sup>H</b>	-	+	+	-	-
<b>Y149<sup>3.51</sup>A</b>	+	+	n.d.	+	+

-, no functional response; +, functional response, n.d.: not determined.

constitutive activity (Alewijns et al., 2000; Ballesteros et al., 2001; Mhaouty-Kodja et al., 1999). However, for some GPCRs, E/D<sup>3.49</sup> substitutions do not induce constitutive activation, suggesting that this residue has other roles (Capra et al., 2004; Ohyama et al., 2002). Using inositol phosphate production as a functional assay, replacing E147<sup>3.49</sup> by alanine (E147<sup>3.49</sup>A) in the UT receptor did not promote constitutive activation. Thus, a putative ionic interaction between E147<sup>3.49</sup> and R148<sup>3.50</sup> would not constitute a major determinant in maintaining basal state of UT.

The E147<sup>3.49</sup>A mutant exhibited two particular properties. First, activating this mutant did not produce a maximal response compared to the wild-type receptor and, second, the agonist-dependent cell surface loss was greater than the wild-type receptor. It is thus possible that the reduced signaling efficacy of E147<sup>3.49</sup>A may be due to structural changes in the activated receptor that influence Gα<sub>q/11</sub> protein coupling and/or that enable increased coupling to the internalization machinery thereby increasing its desensitization relative to the wild-type receptor.

As mentioned above, we observed that, following agonist binding, loss at the cell surface of the E147<sup>3.49</sup>A mutant was greater when compared to the wild-type receptor, a process that was improved by overexpressing β-arrestin2 (similar results were obtained with β-arrestin1; data not shown), which points to a β-arrestin-dependent internalization mechanism. Marion et al. recently proposed a model whereby the proximal 10 residues of second intracellular loops, including the E/DRY motif in rhodopsin-like receptors, provide binding determinants for β-arrestin recognition (Marion et al., 2006). The highly conserved amino acids proline and alanine, which reside six residues at the C-terminus of the E/DRY motif, regulate β-arrestin binding and β-arrestin-mediated internalization. It

has been suggested that a conformational change directed by the second intracellular loop, likely using the loop itself as a binding patch, functions as a switch for transitioning  $\beta$ -arrestin from its inactive form to its active receptor-binding state. Replacing E147<sup>3.49</sup> in the UT receptor may thus influence the orientation of residues of the second intracellular loop, which is involved in recognizing  $\beta$ -arrestins and modulating the affinity of the activated receptor to  $\beta$ -arrestins. Our results thus suggest that residue E147<sup>3.49</sup> plays an important role in the contribution of the second intracellular loop of the UT receptor to the internalization of the receptor. However, because our methodology using ELISAs reveals loss of cell surface receptors after agonist stimulation, we cannot exclude the possibility that trafficking, degradation and recycling processes may affect the overall cell surface expression of the E147<sup>3.49</sup> mutant.

An analysis of the activation profile of the MAPK pathway using the wild-type UT receptor reveals an early PKC-dependent pathway and an EGFR-dependent pathway that are involved in the activation of ERK1/2 in COS-7 cells. These two pathways likely mediate the signaling profile of the UT receptor towards ERK1/2 activation since inhibiting PKC and EGFR abolished ERK1/2 activation altogether. Substituting the conserved residue R148<sup>3.50</sup> by alanine or histidine completely abolished the ability of the UT receptor to promote  $G\alpha_{q11}$  activation/inositol phosphate accumulation and abrogated the internalization of the receptor in COS-7 cells following UII binding. In HEK-293 cells, the R148<sup>3.50</sup> mutants did not promote  $\beta$ -arrestine2-GFP translocation or co-localization to UII-bound receptors. However, UII binding to R148<sup>3.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup>H mutants induced ERK1/2 activation at later (30 min) but not earlier (2 min) time points. This activation was abolished by the addition of AG1478, an EGFR kinase inhibitor.

Moreover, stimulated R148<sup>3.50</sup> mutants promoted EGFR activation as demonstrated in figure 4e and 4f. This suggests that the R148<sup>3.50</sup>A and R148<sup>3.50</sup>H mutants, which are unable to promote the phospholipase C/inositol phosphate/PKC activation cascade, can still activate ERK1/2 in a G $\alpha_{q/11}$  protein-independent manner by transactivation of EGFR. ERK1/2 activation by GPCRs involves a complex network of G protein-dependent and -independent signals (Luttrell, 2003). For example, the angiotensin II type 1A (AT<sub>1</sub>) receptor in HEK 293 cells activates ERK1/2 by distinct pathways, either G protein or beta-arrestin dependent (Ahn et al., 2004). Moreover, G $\alpha_{q/11}$ -independent signaling via EGFR transactivation as the main transductional mechanism for ERK1/2 activation has also been described for AT<sub>1</sub> in CHO-K1 and in human coronary artery smooth muscle cells (HCSMCs) (Miura et al., 2004). In the case of the UT receptor, the fact that the R148<sup>3.50</sup> mutants maintained their ability to activate ERK1/2 but were unable to recruit  $\beta$ -arrestin suggests that ERK1/2 activation is  $\beta$ -arrestin-independent.

Mutations in the DRY motif of other GPCRs such as the angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice cause cardiac hypertrophy (Zhai et al., 2005) lending weight to the importance of this motif in GPCR function. Also, an Arg<sup>3.50</sup>-to-His mutation in the vasopressin V2 receptor (V2R) has been shown to lead to a constitutively phosphorylated receptor (R137HV2R) that associates with  $\beta$ -arrestins and is sequestered in intracellular vesicles, thus behaving as a constitutively desensitized receptor (Barak et al., 2001). This mutated receptor has been associated with nephrogenic diabetes insipidus (Bichet, 1998), with R137HV2R acting as a loss-of-function receptor (Barak et al., 2001). These observations along with our results on the R148<sup>3.50</sup>H receptor are of particular interest in light of a reported single nucleotide polymorphism (ID:



rs13305975) replacing Arg<sup>3.50</sup> with His. Whether this polymorphism is linked to or could be a marker of a specific pathology still needs to be addressed.

The urotensin II system has been implicated in the development of pathophysiological conditions such as cardiac hypertrophy (Tzanidis et al., 2003), which involves EGFR transactivation in cardiomyocytes (Onan et al., 2004). Whether UT receptor activation in a normal or mutated genetic background promotes cardiac hypertrophy via a  $G\alpha_{q/11}$ -independent mechanism involving EGFR transactivation, as observed for the AT<sub>1</sub> receptor, remains to be confirmed.

The Y<sup>3.51</sup> residue is the least conserved and studied residue of the E/DRY motif, with cysteinyl, histidyl and serine residues occurring in some GPCRs. Tyrosine residue mutations often do not affect (Gaborik et al., 2001) or only marginally affect (Hawtin, 2005) receptor function. The substitution of Y<sup>3.51</sup> with alanine did not significantly alter the functionality of the UT receptor and only led to a small decrease in inositol phosphate production.

In light of various analyses of mutations, two roles have been proposed for the E/DRY motif in class A GPCRs (Rovati et al., 2007). In a first group of receptors, E/DRY would be involved in constraining GPCRs in their inactive ground state. Within this group, non-conservative E/D<sup>3.49</sup> mutations induce constitutive activity while R<sup>3.50</sup> mutations have variable effects on receptor functions. In the second group, the motif would be involved in mediating G protein coupling/recognition since E/D<sup>3.49</sup> mutations do not induce constitutive activity. However, non-conservative E/D mutations have multiple effects, indicating that this motif plays an important role in stabilizing the conformation of the receptor (Rovati et al., 2007). Moreover, non-conservative R<sup>3.50</sup> mutations invariably

exert strongly disruptive effects on receptor activity and decrease agonist affinity, indicating that R<sup>3.50</sup> is involved in receptor-G protein-coupling/recognition. In light of results obtained in the present study, the ERY motif in the UT receptor can be considered a major determinant involved in shifting the receptor to an active conformation following urotensin II binding and may thus promote G protein coupling/recognition/activation rather than constrain the receptor in its ground state. An in-depth analysis of the ERY motif of the UT receptor will be needed to better clarify its role in receptor function.

## References

- Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* **279**(34):35518-35525.
- Alewijnse AE, Timmerman H, Jacobs EH, Smit MJ, Roovers E, Cotecchia S and Leurs R (2000) The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor. *Mol Pharmacol* **57**(5):890-898.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelech CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ and Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**(6750):282-286.
- Arnis S, Fahmy K, Hofmann KP and Sakmar TP (1994) A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin. *J Biol Chem* **269**(39):23879-23881.
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U and Javitch JA (2001) 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**(31):29171-29177.
- Ballesteros JA and Weinstein H (1995) *Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors*. Academic Press., San Diego, CA.
- Barak LS, Oakley RH, Laporte SA and Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1):93-98.
- Bichet DG (1998) Nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med* **105**(5):431-442.
- Bihoreau C, Monnot C, Davies E, Teutsch B, Bernstein KE, Corvol P and Clauser E (1993) Mutation of Asp74 of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11):5133-5137.

- Bockaert J and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**(7):1723-1729.
- Boucard AA, Sauve SS, 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**(Pt 3):829-838.
- Capra V, Veltri A, Foglia C, Crimaldi L, Habib A, Parenti M and Rovati GE (2004) Mutational analysis of the highly conserved ERY motif of the thromboxane A2 receptor: alternative role in G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* **66**(4):880-889.
- Chung DA, Wade SM, Fowler CB, Woods DD, Abada PB, Mosberg HI and Neubig RR (2002) Mutagenesis and peptide analysis of the DRY motif in the alpha2A adrenergic receptor: evidence for alternate mechanisms in G protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(4):1233-1241.
- Douglas SA, Dhanak D and Johns DG (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* **25**(2):76-85.
- Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH and Willette RN (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**(7):1262-1274.
- Feng W and Song ZH (2003) Effects of D3.49A, R3.50A, and A6.34E mutations on ligand binding and activation of the cannabinoid-2 (CB2) receptor. *Biochem Pharmacol* **65**(7):1077-1085.
- Fraker PJ and Speck JC, Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* **80**(4):849-857.
- Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, Clark AJ and Hunyady L (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol* **59**(2):239-247.
- Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H and Kobilka BK (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* **16**(22):6737-6747.

- Govaerts C, Lefort A, Costagliola S, Wodak SJ, Ballesteros JA, Van Sande J, Pardo L and Vassart G (2001) A conserved Asn in transmembrane helix 7 is an on/off switch in the activation of the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* **276**(25):22991-22999.
- Hawtin SR (2005) Charged residues of the conserved DRY triplet of the vasopressin V1a receptor provide molecular determinants for cell surface delivery and internalization. *Mol Pharmacol* **68**(4):1172-1182.
- Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E and Leduc R (2007) Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* **402**(1):51-61.
- Lanctot PM, Leclerc PC, Escher E, Leduc R and Guillemette G (1999) Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* **38**(27):8621-8627.
- Luttrell LM (2003) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* **30**(2):117-126.
- Marion S, Oakley RH, Kim KM, Caron MG and Barak LS (2006) A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **281**(5):2932-2938.
- Mhaouty-Kodja S, Barak LS, Scheer A, Abuin L, Diviani D, Caron MG and Cotecchia S (1999) Constitutively active alpha-1b adrenergic receptor mutants display different phosphorylation and internalization features. *Mol Pharmacol* **55**(2):339-347.
- Miura S, Zhang J, Matsuo Y, Saku K and Karnik SS (2004) Activation of extracellular signal-activated kinase by angiotensin II-induced Gq-independent epidermal growth factor receptor transactivation. *Hypertens Res* **27**(10):765-770.
- Neve KA, Cox BA, Henningsen RA, Spanoyannis A and Neve RL (1991) Pivotal role for aspartate-80 in the regulation of dopamine D2 receptor affinity for drugs and inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **39**(6):733-739.
- Ohyama K, Yamano Y, Sano T, Nakagomi Y, Wada M and Inagami T (2002) Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2):362-367.

- Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD and Thomas WG (2004) Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* **18**(9):2344-2354.
- Overington JP, Al-Lazikani B and Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**(12):993-996.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.
- Parent JL, Labrecque P, Driss Rochdi M and Benovic JL (2001) Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J Biol Chem* **276**(10):7079-7085.
- Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G and Leduc R (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* **385**(Pt 1):115-123.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC and Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**(5854):1266-1273.
- Rovati GE, Capra V and Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* **71**(4):959-964.
- Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ and Krause DN (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* **406**(2):265-271.
- Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG and Cotecchia S (1996) Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *Embo J* **15**(14):3566-3578.
- Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA and Weinstein H (1995) Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT2A receptor. *J Biol Chem* **270**(28):16683-16688.

- Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M and MacLean MR (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(2):H925-928.
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE and Krum H (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* **93**(3):246-253.
- Urizar E, Claeysen S, Deupi X, Govaerts C, Costagliola S, Vassart G and Pardo L (2005) An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* **280**(17):17135-17141.
- Wise A, Jupe SC and Rees S (2004) The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:43-66.
- Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, Thaisz J, Irie K, Holle E, Yu X, Kupersmidt S, Roden DM, Wagner T, Yatani A, Vatner DE, Vatner SF and Sadoshima J (2005) Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *J Clin Invest* **115**(11):3045-3056.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW and Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* **22**(1-4):155-168.

**Footnotes**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (to E.E., G.G. and R.L.) and the Heart and Stroke Foundation (to R.L.). C.D.P. received a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. E.E. holds a J. C. Edwards Chair in Cardiovascular Research. R.L. is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work is part of the Ph.D. thesis of C.D.P.



## ANNEXE I

L'activation du récepteur UT cause son internalisation vers des compartiments intracellulaires (PROULX *et al.*, 2005). Cette internalisation se fait principalement via les vésicules tapissées de clathrines et l'activation du récepteur UT promeut également la translocation des  $\beta$ -arrestine1 et  $\beta$ -arrestine2 vers la membrane plasmique. Les arrestines colocalisent avec le récepteur UT dans les endosomes intracellulaires ce qui suggère une association forte entre les récepteurs activés et ces arrestines. Finalement, nous avons montré qu'afin d'être internalisé de façon efficace, le récepteur UT nécessitait la présence d'un groupe de sérines situées dans sa portion carboxy-terminale. Les études d'Oakley et al. ont montré qu'une association stable entre certains GPCRs et les arrestines était dépendante de la phosphorylation d'un groupe de sérines/thréonines localisées dans la partie distale de la queue carboxy-terminale de ces récepteurs (OAKLEY *et al.*, 2001; OAKLEY *et al.*, 2000). Il a également été suggéré que cette association forte entre ces GPCRs et les arrestines était dépendante de la phosphorylation de ce motif sérines/thréonines (OAKLEY *et al.*, 2001). Nous avons donc déterminé si l'activation du récepteur UT permet sa phosphorylation et également déterminé quelles régions de la portion carboxy-terminale du récepteur UT était phosphorylées.

### **Méthode**

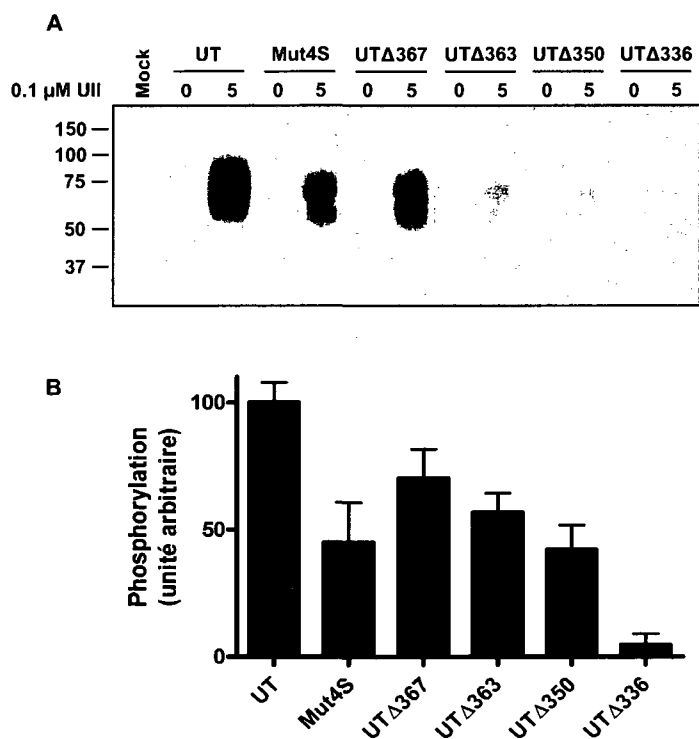
**Expériences de phosphorylation:** Les cellules COS-7, cultivées dans des plats de pétri de 6 cm, ont été transfectées transitoirement avec le récepteur de type sauvage ou chacun des récepteurs mutants. Elles ont ensuite été marquées métaboliquement pendant 4 heures

à 37°C dans 3 ml de DMEM sans phosphore inorganique contenant 40  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{32}\text{P}_i$ . Après trois lavages avec le tampon KRH (118 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 0.1% (w/v) BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4), les cellules ont été incubées dans ce même tampon (3 ml/pétri) pendant 10 min dans un bain d'eau à 37°C. L'UII (0.1  $\mu\text{M}$ ) a ensuite été ajoutée et l'incubation a été poursuivie pendant 5 min. Après incubation, les pétris ont rapidement été déposés sur la glace et les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS à 4°C. Un volume de 800  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse a été ajouté à chacun des pétris (1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 4 mM EDTA). Le tampon de lyse contenait aussi un cocktail d'inhibiteurs de protéases, un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases, 150 mM NaF, 50 mM sodium orthovanadate et 250 mM  $\beta$ -glycérophosphate. Après immunoprécipitation avec 5  $\mu\text{l}$  d'anti-myc et 40  $\mu\text{l}$  de billes A-Sépharose, les protéines, possédant un épitope myc en N-terminal, ont été élués dans le tampon SDS pour échantillons (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.005% bromophénol bleu) et ont été résolus sur un gel 10% acrylamide Tris/glycine. Les bandes correspondant aux récepteurs marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été visualisées par autoradiographie. Afin de quantifier la phosphorylation relative des récepteurs mutants, les lysats cellulaires ont été normalisés pour un nombre équivalent de récepteurs avant l'immunoprécipitation. L'expression des récepteurs a été évaluée par des essais de liaison avec un ligand radiomarké sur des pétris répliqués de cellules COS-7 transfectés transitoirement avec chacun des récepteurs. Les films ont été numérisés et l'intensité des bandes a été quantifiée avec le programme ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## Résultats

Afin de déterminer d'abord si le récepteur subit une phosphorylation induite par la liaison de son agoniste, des cellules COS-7 transfectées transitoirement ont été incubées avec du  $^{32}\text{P}_i$  et exposées à 0.1  $\mu\text{M}$  UII pendant 5 min à 37°C. Le récepteur UT a été immunoprécipité et analysé par SDS-PAGE/autoradiographie. Comme montré à la figure 10, aucune phosphorylation du récepteur UT n'est détectée dans les conditions contrôles. Comme attendu, l'UII cause une augmentation significative du niveau de phosphorylation du récepteur de type sauvage, qui apparaît comme une bande diffuse migrant comme une glycoprotéine avec un  $M_r$  entre 50 et 75 kDa. Ceci est en accord avec le  $M_r$  du récepteur UT démontré précédemment (BOUCARD *et al.*, 2003). Afin de cibler quels sont les parties ou motifs phosphorylés dans la queue carboxy-terminale du récepteur, chacun des mutants de délétion et le mutant Mut4S, dans lequel le groupe de sérines a été remplacé par des alanines (voir (PROULX *et al.*, 2005)), ont été analysés de la même façon. La figure 10 montre qu'aucun des mutants n'est phosphorylé en conditions contrôles. Après la stimulation des cellules avec l'UII, les différents mutants sont phosphorylés mais à des niveaux inférieurs à celui du récepteur de type sauvage. Le niveau de phosphorylation du mutant Mut4S correspond à environ 50% du niveau de phosphorylation du récepteur de type sauvage (Figure 10b). Le mutant UTA367 est aussi moins phosphorylé que le récepteur de type sauvage ce qui suggère que les trois résidus sérines/thréonines présents dans le fragment contenant les 19 derniers résidus du récepteur sont phosphorylés suite à la stimulation avec l'UII. Les sérines/thréonines de la portion située entre les résidus

Ser337 et Leu363 semblent être également phosphorylées. Aucune phosphorylation n'a été observée suite à l'activation du mutant UT $\Delta$ 336, ce qui suggère que la quasi-totalité de la phosphorylation induite par l'Ull se retrouve dans la portion du récepteur contenant les 50 derniers résidus. Ces résultats montrent que le récepteur UT est phosphorylé lors de son activation, que le motif sérine de la portion carboxy-terminale du récepteur semble être responsable de 50% de la phosphorylation de cette portion du récepteur et finalement que l'ensemble de la phosphorylation du récepteur réside dans les 50 derniers résidus.



**Figure 10. Phosphorylation induite par l'agoniste du récepteur de type sauvage et des différents mutants de délétion.**

Les cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec les récepteurs type sauvage et mutants porteurs de l'épitope myc. Après stimulation des cellules transfectées pour 5 min à 37°C avec 0.1  $\mu$ M UII, les récepteurs ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-myc de souris et la phosphorylation a été déterminée comme décrit dans les méthodes. A. Une autoradiographie représentative de trois expériences indépendantes est montrée. B. Les bandes ont été analysées par densitométrie et les résultats sont présentés comme la phosphorylation induite par la stimulation avec l'UII. La phosphorylation des mutants est comparée au récepteur de type sauvage qui est établi 100% de façon arbitraire. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

## DISCUSSION

Les GPCRs forment la plus importante famille de protéines exprimées chez l'humain avec quelques 900 membres. De ce nombre, les GPCRs de la classe A forment la plus importante sous-famille de GPCRs, avec près de 300 membres (<http://www.iupharbb.org/receptorList/results.php>). Un large éventail de ligands de différentes tailles, allant de l'ion calcium jusqu'aux grosses glycoprotéines, lient et activent ces récepteurs afin de réguler finement un grand nombre de processus biologiques importants pour maintenir l'homéostasie générale de l'organisme (BOCKAERT et PIN, 1999). Par conséquent, les GPCRs forment des cibles thérapeutiques importantes alors que plus de 25% des produits pharmaceutiques vendus sous ordonnances ciblent les GPCRs de classe A (OVERINGTON *et al.*, 2006). De façon plus spécifique, les maladies reliées au système cardiovasculaire sont parmi les causes principales de mortalité dans le monde occidental (<http://www.cdc.gov/nchs/FASTATS/deaths.htm>). Les GPCRs exprimés dans ce système représentent donc des cibles importantes afin de pouvoir intervenir lors de divers troubles du système cardiovasculaire. Il est maintenant clair que l'urotensine II joue un rôle dans la régulation physiologique du système cardiovasculaire chez les mammifères, y compris chez l'humain (ZHU *et al.*, 2006). De plus, de nombreux résultats démontrent maintenant l'implication du système urotensine II dans le développement de pathologies cardiovasculaires chez l'humain (DOUGLAS *et al.*, 2004a). Ceci a donc conduit plusieurs groupes de recherche à explorer plus à fond les mécanismes de régulation de l'activité de l'UII, le plus puissant vasoconstricteur connu. Dans le cadre des travaux décrits dans cette

thèse, nous avons dirigé nos recherches sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la signalisation et de la fonctionnalité du récepteur UT. Ainsi, par des études de mutagenèse dirigée, de mesure d'internalisation et des analyses des voies de signalisation, nous avons été les premiers à déterminer l'importance de la portion carboxy-terminale dans l'internalisation du récepteur UT ainsi que du rôle clé de certains résidus conservés dans les mécanismes d'activation et de signalisation de ce récepteur.

### **Mécanismes d'internalisation et son implication dans la signalisation du récepteur UT**

La signalisation d'un GPCR se doit d'être finement régulée et orchestrée afin de promouvoir des effets qui lui sont spécifiques. Le routage des GPCRs vers des compartiments intracellulaires est un mécanisme responsable de l'atténuation de certaines voies de signalisation alors qu'il permettra l'activation de certaines autres voies comme celles des MAPKs. Par des mesures d'internalisation du ligand UII marqué à l'iode radioactif, nous avons été les premiers à montrer que suite à son activation, UT est internalisé vers des compartiments intracellulaires. Ce processus a été confirmé avec une approche de microscopie confocale en utilisant un récepteur conjugué à la protéine fluorescente GFP (PROULX *et al.*, 2005). Cette internalisation se produit principalement via les vésicules tapissées de clathrines puisqu'elle est diminuée de 65% en présence de 0.45 M sucrose. Ces résultats suggèrent que le récepteur UT est internalisé via les vésicules tapissées de clathrines et ceci est tout à fait en accord avec les résultats de Giebing *et al.* qui ont montré que le récepteur UT colocalise avec le récepteur de la transferrine, un marqueur reconnu des vésicules de clathrines. Cependant, le sucrose ne bloque pas complètement l'internalisation du récepteur UT, ce qui suggère que celui-ci

peut internaliser par des voies alternatives. L'homologue de rat du récepteur UT contient, dans sa portion proximale de la queue carboxy-terminale, un motif de liaison à la clathrine (Figure 1 de l'introduction) (ONAN *et al.*, 2004a). Les cavéoles sont des régions spécialisées de la membrane plasmique où récepteurs et effecteurs colocalisent. Les cavéoles sont importantes pour la régulation du routage et de la signalisation de plusieurs GPCRs (CHINI et PARENTI, 2004). Parmi les molécules enrichies dans les cavéoles et impliquées dans la signalisation des GPCRs, on retrouve différents sous-types de protéines G hétérotrimériques, c-Src, EGFR et Raf. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que l'intégrité des cavéoles soit importante dans la transactivation du EGFR et/ou l'activation de la voie des MAPKs et ce pour plusieurs récepteurs comme les récepteurs AT<sub>1</sub> (USHIO-FUKAI *et al.*, 2001), ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> (HUA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 1999), GnRH (NAVRATIL *et al.*, 2003) ou le récepteur B2 de la bradykinine (JU *et al.*, 2000). Le mécanisme de transduction du récepteur UT passe principalement par l'activation de la protéine G $\alpha_{q/11}$  (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2000), mais certaines études ont également montré un couplage à la protéine G $\alpha_{i/o}$  pour une signalisation vers la voie des ERKs (ZILTENER *et al.*, 2002). Nous avons également montré que le récepteur UT active la voie des MAPKs par un mécanisme dépendant de la protéine G $\alpha_{q/11}$  et aussi par un mécanisme indépendant de G $\alpha_{q/11}$ , soit la transactivation du EGFR (PROULX *et al.*, 2008). Ces deux mécanismes semblent être indépendants l'un de l'autre. Nos résultats suggèrent l'implication des cavéoles dans le routage et/ou la signalisation du récepteur UT. D'ailleurs, le récepteur UT possède un motif de liaison à la cavéoline (voir Figure 1). Jusqu'à présent, aucune étude n'a montré d'association entre le récepteur UT et sa localisation dans les cavéoles.



Le  $t_{1/2}$  d'internalisation du récepteur UT est de 20 min et son niveau maximal d'internalisation est de 31 % après 90 minutes de stimulation. L'internalisation du récepteur UT se fait relativement lentement par rapport à celle d'autres GPCRs de classe A comme le récepteur AT1 de l'angiotensine II ou le récepteur V2 de la vasopressine (LAPORTE *et al.*, 1996; PFEIFFER *et al.*, 1998). Lors de nos études d'internalisation du ligand  $^{125}\text{I}$ -UII, nous avons constaté que pour dissocier complètement le ligand UII, il faut prolonger le lavage acide pour au moins 120 minutes (PROULX *et al.*, 2005). La durée de ce lavage acide est passablement plus longue que celle nécessaire pour dissocier les ligands peptidiques d'autres récepteurs (LAPORTE *et al.*, 1996). La liaison d'UII aux récepteurs présents à la surface des myoblastes squelettiques humains a également été décrite comme étant résistante à un lavage acide (QI *et al.*, 2005). Des études de contraction de vaisseaux artériels par l'UII ont montré que ce peptide produit une contraction puissante et prolongée qui persiste même après plusieurs heures de lavage (CAMARDA *et al.*, 2002). La faible propension du récepteur UT à internaliser, combinée à la très grande force de liaison du ligand UII, qui est quasi-irréversible, pourraient expliquer, du moins en partie, la contraction forte et soutenue médiée par le récepteur UT. Ainsi, une fois activé, le récepteur UT présent à la surface des cellules musculaires lisses, serait peu internalisé donc moins efficacement désensibilisé et ceci permettrait de maintenir une contraction soutenue.

Nous avons montré que l'activation du récepteur UT promeut le recrutement des  $\beta$ -arrestine1 et  $\beta$ -arrestine2 pour ensuite colocaliser avec ces dernières dans des vésicules intracellulaires (PROULX *et al.*, 2005). La colocalisation du récepteur UT et des arrestines dans les vésicules intracellulaires est stable et persiste pour une longue période.

L'association des récepteurs de classe B, décrits à la section 3.2.2.2.1., est dépendante de la présence d'un groupe de sérines situées dans la queue carboxy-terminale de ces GPCRs (OAKLEY *et al.*, 2001). Ainsi, la phosphorylation de ce groupe de sérines par certaines GRKs, principalement GRK2 et GRK3, serait nécessaire pour maintenir cette forte association avec les arrestines. Le remplacement de ce groupe de sérines chez plusieurs GPCRs de classe B diminue la force d'interaction avec les arrestines (OAKLEY *et al.*, 2001). L'association forte entre les récepteurs de classe B et les arrestines dicterait leur vitesse de recyclage (OAKLEY *et al.*, 2000). En effet, un GPCR est soit rapidement recyclé, soit maintenu longtemps à l'intérieur de la cellule avant d'être recyclé par une voie lente de recyclage, soit dégradé aux lysosomes (OAKLEY *et al.*, 1999). Le récepteur UT a la caractéristique particulière de demeurer longtemps associé aux arrestines même si l'on remplace le groupe de sérines de sa queue carboxy-terminale par un groupe d'alanines (PROULX *et al.*, 2005). Bien que ce groupe de sérines soit nécessaire pour une internalisation efficace du récepteur UT, il ne semble pas obligatoire pour maintenir une association soutenue aux arrestines. Cette observation suggère que la forte association aux arrestines est modulée par d'autres sites de phosphorylation ou encore dictée par une conformation particulière du récepteur adoptée lors de son activation par l'UII. Ceci suggère également que suite à son internalisation, le récepteur UT est soit lentement recyclé vers la membrane plasmique ou encore directement dirigé vers les voies de dégradation. Récemment, Giebing *et al.* (2005) ont montré que l'internalisation du récepteur UT dans des cellules HEK-293 est arrestine-indépendante et qu'UT est recyclé vers la membrane plasmique. Ils ont suggéré que nos résultats démontrant une colocalisation entre le récepteur UT et les arrestines (PROULX *et al.*, 2005) peuvent être

expliqués par un phénomène d'homodimérisation des protéines GFP, une propriété qui leur est reconnue. Cependant, nos études de colocalisation entre la  $\beta$ -arrestine2-GFP et le récepteur myc-UT ont aussi montré une colocalisation entre UT et la  $\beta$ -arrestine2. Nous sommes donc en mesure de conclure que lors de son activation, le récepteur UT colocalise vraiment avec les arrestines (PROULX *et al.*, 2008). De plus, la coexpression des  $\beta$ -arrestine1 et  $\beta$ -arrestine2 augmente de façon significative l'internalisation du récepteur UT ce qui supporte davantage l'implication des arrestines dans le mécanisme d'internalisation du récepteur UT (PROULX *et al.*, 2008; PROULX *et al.*, 2005). Des différences dans les mécanismes d'internalisation du récepteur AT1 de l'angiotensine II ont également été observées. En effet, l'internalisation homologue du récepteur AT1 est soit dépendante ou indépendante de l'arrestine selon la concentration d'angiotensine II utilisée (GABORIK *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1996). Il est donc possible que, de façon similaire au récepteur AT1, l'internalisation du récepteur UT soit médiée par différentes voies ou mécanismes. Des expériences additionnelles seront nécessaires pour clairement définir les mécanismes d'internalisation du récepteur UT.

Les arrestines ne sont pas uniquement responsables de l'internalisation des GPCRs, mais sont également impliquées dans l'échafaudage de complexes protéiques autour des GPCRs afin de promouvoir certaines voies de signalisation. Les arrestines sont responsables du recrutement des petites protéines kinases non-réceptorielles comme c-Src, Hck, Fgr ou Yes et de plusieurs membres de la cascade de la voie des MAPKs (ERK1, ERK2, MEK, Raf) ce qui permet d'activer les protéines ERKs (MCDONALD *et al.*, 2000). La voie classique d'activation des MAPKs par les protéines G est généralement

associée à la différenciation et à la prolifération cellulaire (MORRISON et DAVIS, 2003). Par contre, l'activation des MAPKs par les arrestines est associée à des phénomènes comme la relâche de granules de sécrétion chez les neutrophiles (CXCR1) (BARLIC *et al.*, 2000), à un effet anti-apoptotique lié à l'activation du récepteur NK1 (DEFEA *et al.*, 2000) ou encore à la motilité cellulaire et la migration médiée par le récepteur CXCR4 (FONG *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2002). L'activation de la voie des MAPKs est donc un mécanisme complexe qui nécessite une fine régulation afin de produire les effets cellulaires désirés. Le récepteur UT active la voie des MAPKs, ce qui est responsable d'une panoplie de réponses cellulaires aussi bien en situations normales que pathologiques (voir section 1.4.). Mieux comprendre les mécanismes d'activation de cette voie par le récepteur UT permettra assurément d'établir comment ce récepteur peut moduler l'activité de la voie des MAPKs et ainsi peut-être mieux comprendre comment l'activation de cette voie peut être impliquée dans le développement de certaines pathologies. Nous avons montré que le remplacement d'une arginine, présente dans le motif hautement conservé du motif ERY, par une alanine ou une histidine (R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H) a produit des récepteurs UT mutants incapables d'activer la protéine  $G\alpha_{q/11}$ , incapables d'internaliser et incapables de s'associer aux arrestines (PROULX *et al.*, 2008). Par contre, ces mutants arginines ont conservé la capacité d'activer les MAPKs, par un mécanisme impliquant la transactivation du récepteur à l'EGF et indépendant de la protéine  $G\alpha_{q/11}$ . Ces résultats ont montré que le récepteur UT peut signaler vers la voie des MAPKs de deux façons complètement indépendantes. Dans les cellules COS-7, l'activation des MAPKs par le récepteur UT semble être médiée par une voie précoce dépendante de la PKC et aussi par une voie dépendante de la transactivation du EGFR.

Ces voies semblent médier l'essentiel de l'activation des MAPKs puisque l'inhibition de ces deux voies a pratiquement aboli l'activation des ERK1/2 (PROULX *et al.*, 2008). De plus, l'activation de la voie des MAPKs par les mutants arginines (R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H) ne nécessite pas l'internalisation du récepteur, une étape obligatoire pour activer les MAPKs via les arrestines (LUTTRELL *et al.*, 1999). Donc, dans les cellules COS-7, le récepteur UT ne semble pas nécessiter les arrestines pour activer la voie des MAPKs. Cependant, l'activation de la voie des MAPKs varie non seulement d'un GPCR à l'autre, mais varie également pour un même récepteur selon le contexte cellulaire (LUTTRELL, 2002). Il est donc fort probable que le récepteur UT utilise l'échafaudage des arrestines pour l'activation des ERKs lors d'activités cellulaires comme la migration des monocytes (SEGAIN *et al.*, 2007). Cependant, l'implication des arrestines dans la signalisation du récepteur UT demeure à être confirmée.

### **Importance de la portion carboxy-terminale du récepteur UT dans son internalisation et sa signalisation**

Afin de déterminer l'importance de la portion carboxy-terminale du récepteur UT, nous avons produit différents mutants de délétion de cette région du récepteur. Nous avons également remplacé le groupe de sérines présent dans la portion distale de la queue terminale du récepteur par des alanines pour déterminer son importance dans la régulation de l'activité du récepteur. Le mutant UTΔ336 est caractérisé par le retrait des 50 derniers résidus de la portion carboxy-terminale d'UT. Des études de fonctionnalité ont montré que cette importante portion du récepteur n'était pas impliquée dans le couplage et l'activation

de la protéine  $G\alpha_{q/11}$  (PROULX *et al.*, 2005). La délétion de cette portion de récepteur n'a également pas influencé la capacité du récepteur à activer les protéines ERK1/2. Le couplage des GPCRs à leur protéine G est généralement via leurs boucles intracellulaires 2 et 3 alors que la boucle intracellulaire 1 et la portion carboxy-terminale sont rarement responsables de ce couplage (OLDHAM et HAMM, 2008). Il n'est donc pas étonnant d'observer que la délétion de la portion terminale du récepteur UT n'a pas eu d'influence sur la signalisation protéine G-dépendante.

Comme mentionné précédemment, le récepteur UT a besoin du groupe de sérines de la portion carboxy-terminale afin d'être internalisé efficacement (PROULX *et al.*, 2005). La délétion des 50 derniers résidus de la portion carboxy-terminale du récepteur n'a pas altéré davantage l'internalisation du récepteur que le simple remplacement du groupe de sérine. Ceci suggère que le groupe de sérines est le motif principal des 50 derniers résidus impliqué dans l'internalisation du récepteur UT (PROULX *et al.*, 2005). La chose étonnante observée ici, par l'utilisation du mutant Mut4S, est la propriété de toujours demeurer associé aux arrestines une fois internalisé dans les vésicules intracellulaires. Il a été montré chez plusieurs autres GPCRs que l'association forte entre les récepteurs et les arrestines était dépendante de ce groupe de sérines/thréonines et le remplacement de ce motif empêchait cette association stable qui persiste dans les vésicules intracellulaires (OAKLEY *et al.*, 2001). Des études préliminaires de phosphorylation avec le récepteur UT montrent, bien que le groupe de sérines soit nécessaire afin d'être pleinement phosphorylé lors de son activation, que d'autres sérines et thréonines de la portion terminale du récepteur sont également phosphorylées (Figure 10). Ceci suggère que d'autres sites de phosphorylation pourraient être responsables de l'association stable avec

les arrestines. Cependant, nos études de phosphorylation montrent que la totalité de la phosphorylation du récepteur UT réside dans les 50 derniers résidus puisque l'activation du mutant UT $\Delta$ 336 n'a montré aucune phosphorylation du récepteur. Comme ce mutant internalise de façon équivalente au mutant Mut4S, il est probable que l'association stable entre le récepteur UT et les arrestines soit plutôt dépendante d'une conformation active du récepteur plutôt que d'un état phosphorylé de celui-ci, bien que cette phosphorylation soit requise afin de promouvoir une internalisation pleinement efficace du récepteur. Plusieurs études, notamment avec la rhodopsine, ont montré que pour obtenir une association forte entre un GPCR et une arrestine, le GPCR doit être sous une forme active et aussi dans un état phosphorylé (GUREVICH et GUREVICH, 2006). Marion *et al.* (2006) ont récemment proposé un modèle où les dix résidus proximaux de la deuxième boucle intracellulaire, comprenant le motif conservé E/DRY, fournissent les éléments responsables de la reconnaissance et de la liaison aux arrestines (MARION *et al.*, 2006). Il a été proposé que les changements conformationnels de la deuxième boucle intracellulaire, lors de l'activation des récepteurs, agissent comme un interrupteur responsable de la transition de l'état inactif à l'état actif de l'arrestine qui ainsi s'associe aux récepteurs. De façon intéressante, le remplacement du résidu E147<sup>3.49</sup>, du motif ERY du récepteur UT, par une alanine (mutant E147<sup>3.49</sup>A) a significativement amélioré son internalisation (PROULX *et al.*, 2008). Le remplacement du résidu E147<sup>3.49</sup> par une alanine pourrait donc influencer l'orientation des résidus de la deuxième boucle intracellulaire du récepteur UT et ainsi permettre une reconnaissance des arrestines et une augmentation d'affinité pour celles-ci. Nos résultats suggèrent donc que l'association entre le récepteur UT et les arrestines serait plutôt dépendante d'un état actif du récepteur,

vraisemblablement via la modulation de l'orientation de la deuxième boucle intracellulaire. Les arrestines ont la propriété d'interagir avec une panoplie de protéines cytoplasmiques (SHENOY et LEFKOWITZ, 2003). En interagissant avec plusieurs protéines simultanément donc en agissant comme protéine d'échafaudage, les arrestines peuvent orchestrer la signalisation dans le temps et l'espace et permettent de localiser spécifiquement certains effecteurs dans différents compartiments cellulaires où réside différentes protéines cibles. Les récepteurs liés aux arrestines servent donc de protéines d'échafaudage pour les membres de la voie des MAPKs (LUTTRELL, 2003; MCDONALD *et al.*, 2000), la phosphatase MKP7 (WILLOUGHBY et COLLINS, 2005), la protéine AKT et la sérine/thréonine phosphatase PP2A (BEAULIEU *et al.*, 2005) pour ne nommer que quelques exemples. L'activation du récepteur UT promeut une colocalisation persistante avec les arrestines suggérant une association stable entre ces protéines. Il reste à clarifier si cette association est impliquée dans la signalisation du récepteur UT. Selon toute vraisemblance, l'implication des arrestines dans les mécanismes de signalisation intracellulaire du récepteur UT pourrait avoir une grande signification d'un point de vue physiologique.

### **Analyse mutationnelle du résidu conservé Asp97<sup>2.50</sup> et des résidus du motif ERY**

Parmi les GPCRs de classe A, il existe très peu d'homologie de séquence mis à part la conservation de quelques résidus et motifs très conservés. Ces résidus et motifs ont donc vraisemblablement des rôles importants dans le maintien d'une forme inactive ou encore dans l'établissement de formes actives des GPCRs (SMIT *et al.*, 2007). Afin



d'éclaircir le rôle joué par les résidus D97<sup>2.50</sup> et E147<sup>3.49</sup>, R148<sup>3.50</sup> et Y149<sup>3.51</sup> dans la fonctionnalité du récepteur UT, nous avons muté chacun de ces résidus par un alanine, un résidu non-chargé. La recherche de polymorphismes ponctuels pour le récepteur UT nous a permis de constater qu'il existe une mutation, présente chez l'humain, où l'arginine du motif ERY est remplacée par une histidine. Une mutation similaire chez le récepteur V2 de la vasopressine est observée chez certains patients souffrant de diabète insipide (BICHET *et al.*, 1998). Il a été montré que cette mutation produit un récepteur V2 constitutivement phosphorylé et internalisé vers les compartiments intracellulaires et donc inaccessible à la vasopressine (BARAK *et al.*, 2001). Nous avons donc remplacé le résidu arginine du motif ERY par une histidine et déterminé sa fonctionnalité afin de voir comment ce polymorphisme pouvait se manifester chez les individus ayant cette mutation.

Le modèle dominant actuel expliquant le rôle joué par le motif E/DRY fait intervenir la modulation d'un *ionic lock* où le résidu R<sup>3.50</sup> forme des interactions ioniques avec les résidus E<sup>3.49</sup> et E<sup>6.30</sup> ce qui limite le mouvement de la portion cytoplasmique des TMD3 et TMD6. Le bris de ce lien ionique, lors de l'activation des récepteurs, permet le mouvement des TMD3 et TMD6 et permet l'ouverture de la portion cytoplasmique des récepteurs, ce qui fournit un site de liaison pour la protéine G et permet son activation (BALLESTEROS *et al.*, 2001). Parmi les évidences supportant ce mécanisme d'activation des GPCRs de classe A, la mutation des résidus E<sup>3.49</sup> et/ou E<sup>6.30</sup> produit des récepteurs constitutivement actifs, donc capables de lier et d'activer la protéine G sans activation par un agoniste. Deux constatations nous permettent d'affirmer que ce modèle d'activation ne convient pas au récepteur UT. D'abord, le récepteur UT ne possède pas de résidu

glutamate dans sa troisième boucle intracellulaire (E<sup>6.30</sup>), mais plutôt une asparagine. Deuxièmement, le remplacement du résidu E<sup>3.49</sup> par une alanine n'a pas mené à de l'activité constitutive (PROULX *et al.*, 2008). Un modèle d'activation alternatif a été proposé par Scheer *et al.* (1996) où, dans la forme inactive du récepteur, la R<sup>3.50</sup> est contrainte dans une pochette polaire formée par les résidus N<sup>1.50</sup>, D<sup>2.50</sup>, N<sup>7.49</sup> et Y<sup>7.53</sup> (SCHEER *et al.*, 1996). Ainsi pour le récepteur UT, la contrepartie ionique de la R<sup>3.50</sup> serait la D<sup>2.50</sup> et l'interaction entre ces deux résidus serait brisée lors de l'activation du récepteur. La libération de la R<sup>3.50</sup> permettrait ainsi l'isomérisation de la deuxième boucle intracellulaire et le couplage et l'activation de la protéine G.

La mutation du résidu arginine, du motif ERY du récepteur UT, nous a mis en lumière une signalisation biaisée du récepteur UT. La mutation de ce résidu a complètement aboli la capacité du récepteur UT à activer la protéine G $\alpha_{q/11}$  en plus de complètement abolir la capacité du récepteur à internaliser et à promouvoir une translocation de la  $\beta$ -arrestine2-GFP vers la membrane plasmique. Cependant, les mutants R148<sup>3.50</sup>A et R148<sup>3.50</sup>H ont démontré une capacité à transactiver le EGFR et à signaler vers la voie des MAPKs (PROULX *et al.*, 2008). Le remplacement de ce résidu arginine conservé, le résidu le plus conservé chez les récepteurs de la classe A (SMIT *et al.*, 2007), a donc grandement limité les changements conformationnels du récepteur induits par la liaison de son agoniste, mais certains changements conformationnels demeurent afin de permettre une transactivation de l'EGFR. Dans la structure du récepteur UT, il semble donc y avoir certains domaines, indépendants l'un de l'autre, qui permettent d'activer certains effecteurs intracellulaires de façon complètement indépendante, c'est ce que l'on désigne une signalisation biaisée ou de la sélectivité fonctionnelle (MAILMAN, 2007). Ce type de

signalisation est grandement étudié chez les GPCRs. Il est maintenant reconnu que l'activation des GPCRs par un agoniste n'est pas un phénomène rigide, mais plutôt un phénomène très plastique comme le montre nos résultats et potentiellement modulable par certains agonistes (BAKER et HILL, 2007; KOBILKA et DEUPI, 2007). Ce dernier point est au centre d'une multitude d'études qui ont pour but ultime de moduler l'activité des récepteurs avec certaines interventions pharmacologiques qui produiront des effets très spécifiques et qui diminueront ainsi les effets secondaires associés à la plupart des médicaments utilisés actuellement (BOSIER et HERMANS, 2007; KENAKIN, 2007; MAILMAN, 2007).

Le mutant R148<sup>3.50</sup>H est, selon toute vraisemblance, retrouvé chez certains individus de la population humaine. Quelle est la conséquence de l'expression d'un récepteur UT muté à ce résidu arginine? Ce mutant est d'abord relié à une activation du EGFR qui mène à l'activation de la voie des MAPKs. Le groupe de Thomas a montré que l'activation du récepteur UT, surexprimé dans des cardiomyocytes, causait l'hypertrophie cellulaire, phénomène dépendant de la transactivation du EGFR et de l'activation de la voie des MAPKs (ONAN *et al.*, 2004b). L'U11 et le récepteur UT sont tous deux exprimés au niveau du cœur et leur expression est augmentée dans diverses pathologies cardiaques (DOUGLAS *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2003). Certaines études ont corrélé le système urotensine II et le développement de l'hypertrophie cardiaque chez l'humain (TZANIDIS *et al.*, 2003). Il est donc possible que l'activation d'un récepteur UT-R148<sup>3.50</sup>H soit responsable du développement de l'hypertrophie cardiaque via l'activation du EGFR. De plus, ce mutant n'internalise pas, ce qui suggère qu'il est peu ou

pas désensibilisé et donc que ses effets persisteraient et seraient ainsi amplifiés. La surexpression de ce récepteur mutant dans des cardiomyocytes permettrait de vérifier cet hypothétique effet hypertrophique dans un contexte plus physiologique.

## **Directions futures**

Les résultats obtenus durant mes études graduées ont permis de faire la lumière sur quelques mécanismes de régulation du récepteur UT. Ce récepteur, tout récemment découvert, n'a pratiquement pas été étudié d'un point de vue moléculaire. Comme la régulation cellulaire de l'activité d'un récepteur est la base d'une régulation plus physiologique, il est évident qu'il est important de poursuivre la caractérisation moléculaire du récepteur UT.

Comme décrit précédemment, bien que le récepteur UT soit internalisé par un mécanisme dépendant des puits de clathrines, l'ensemble de cette internalisation semble faire intervenir d'autres voies menant au retrait des récepteurs de la membrane plasmique. Il serait important de déterminer si les cavéoles ont un rôle à jouer dans l'internalisation ou le routage du récepteur UT car l'échafaudage de complexes protéiques s'effectue dans cette région spécialisée de la membrane plasmique. La localisation du récepteur UT dans les cavéoles pourrait être responsable de la transactivation du récepteur à l'EGF ou encore de l'activation de la eNOS.

Une caractéristique importante observée dans nos études est l'interaction forte et stable du récepteur UT activé avec les arrestines. L'interaction GPCR-arrestine est importante pour l'activation des différentes voies de signalisation. Donc il serait important de vérifier si les

arrestines sont responsables de l'échafaudage de complexes protéiques autour du récepteur UT et si de tels complexes peuvent moduler les réponses cellulaires. Comment est régulée l'interaction stable avec les arrestines? Nous avons montré que cette interaction ne semblait pas être modulée de façon importante par la phosphorylation du récepteur UT. Donc quel motif ou encore quelle conformation active du récepteur peut favoriser cette interaction? Nos résultats obtenus avec l'approche de mutagenèse du motif ERY semblent suggérer l'implication probable de la deuxième boucle intracellulaire du récepteur UT dans cette association. L'étude de Marion *et al.* a également souligné l'importance d'un résidu proline dans la deuxième boucle des récepteurs  $\beta$ -adrénergique et sérotoninergique pour leur association avec les arrestines (MARION *et al.*, 2006). Le récepteur UT possède aussi une proline dans sa deuxième boucle intracellulaire (Pro<sup>357</sup>) et cette proline pourrait donc faire partie d'un motif de liaison à l'arrestine.

Comment les mutants arginines transactivent le EGFR? Le groupe de Ullrich a été le premier à démontrer que l'activation d'un GPCR pouvait mener à l'activation du EGFR par un mécanisme qu'ils ont décrit "transactivation" (DAUB *et al.*, 1996). Dans un premier cas, l'activation d'un GPCR peut mener à l'activation de métalloprotéases de la famille des ADAMs (a desintegrin and metalloprotease). Les ADAMs sont ancrées dans la membrane plasmique et elles pourraient cliver la forme latente du HB-EGF (*Heparin-binding-EGF*), elle aussi ancrée dans la membrane plasmique. Ce clivage relâche la forme active du EGF qui peut par la suite lier et activer le EGFR (ASAKURA *et al.*, 2002; PIERCE *et al.*, 2001). Les détails de l'activation des métalloprotéases ne sont pas clairement connus, mais pourraient impliquer la relâche des sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines  $G\alpha_{i/o}$  hétérotrimériques. Dans un deuxième cas, un GPCR peut mener à l'activation du

EGFR par un mécanisme impliquant sa phosphorylation via la protéine kinase non réceptorielle Src (BISCARDI *et al.*, 1999). Src peut donc phosphoryler et activer le EGFR ce qui mène à l'activation de la cascade de la MAPK. Il a été montré que le  $\beta$ 3AR active les ERKs par un mécanisme nécessitant l'interaction directe de Src avec la portion C-terminale du récepteur. Cette association est dépendante de la présence du motif PxxP du  $\beta$ 3AR. Le récepteur UT possède aussi un motif PxxP dans sa portion C-terminale. Il serait donc intéressant de vérifier si le récepteur UT peut interagir avec Src et l'activer. Aussi, l'interaction directe entre le récepteur AT1 et EGFR a été proposée afin de mener à l'activation de la voie des ERKs (HUNYADY et CATT, 2006). L'activation de la voie des MAPKs a des influences majeures sur la régulation d'une panoplie de phénomènes cellulaires et le processus emprunté par les GPCRs pour activer cette voie dicte comment et où les protéines ERKs exerceront leurs fonctions. Il est donc important de clarifier comment cette voie est régulée par le récepteur UT.

## CONCLUSIONS

La régulation de l'activité des différents GPCRs est un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs protéines intracellulaires afin d'enclencher différentes voies de signalisation, de désensibiliser la réponse spécifique ou encore de contrôler l'expression ou la localisation cellulaire du récepteur. Toute cette régulation dicte comment un GPCR signale de façon spécifique dans un contexte cellulaire précis. C'est ce qui explique que la stimulation de différents GPCRs couplés à la même protéine G hétérotrimérique et exprimés dans un même contexte cellulaire peut produire différents effets très spécifiques. Très peu d'études ont déterminé quels étaient les différents mécanismes de régulation de l'activité du récepteur UT. Bien qu'il est évident que le système urotensine II/récepteur UT est associé au développement de diverses pathologies chez l'humain, particulièrement du système cardiovasculaire, aucun rôle de ce système n'a encore été établi dans la régulation normale de l'organisme. Une meilleure compréhension de la régulation de l'activité du récepteur UT aidera certainement à mieux comprendre comment ce système peut jouer son rôle dans la régulation de l'homéostasie normale de l'organisme.

Nous avons été les premiers à déterminer que l'activation du récepteur UT mène à son internalisation via principalement les puits tapissés de clathrine. De plus, l'activation du récepteur UT lui fait établir une interaction très stable avec les arrestines ce qui devrait moduler son activité. Notre étude sur le rôle de la portion carboxy-terminale du récepteur UT a révélé que bien que le motif polysérines soit important pour permettre une internalisation efficace, ce motif ne semble pas nécessaire pour favoriser une association forte avec les arrestines.

L'analyse mutationnelle de certains résidus conservés chez les récepteurs de classe A nous a permis de constater que le motif ERY du récepteur UT n'est pas impliqué dans le processus classique d'activation faisant intervenir le *ionic lock*, mais pourrait plutôt être impliqué dans la formation d'une pochette polaire tel que décrit par Scheer *et al.*. Ainsi, l'activation du récepteur UT permettrait une isomérisation de la deuxième boucle intracellulaire qui pourrait être responsable du couplage/activation de la protéine  $G\alpha_{q/11}$ . Finalement, la mutation de la R<sup>3.50</sup> du motif ERY nous a permis de mettre en lumière une signalisation biaisée ou une sélectivité fonctionnelle du récepteur UT qui est responsable de l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire.



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de recherche, les Drs Richard Leduc et Gaétan Guillemette. Vous avez su, chacun à votre façon, me diriger et m'orienter tout au long de mes recherches. Merci à Richard pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire lors de mes stages au baccalauréat, lors de mes crédits de recherche, de ma maîtrise et finalement de ne pas m'avoir jeté dehors avant la fin de mon doctorat. Merci de m'avoir inculqué l'importance des contrôles, de m'avoir appris l'importance de décrire correctement les phénomènes observés. Merci de m'avoir permis de voyager lors de congrès et stages. Merci à Gaétan pour m'avoir dirigé lors de mes études graduées, pour les discussions, pas assez nombreuses, mais qui ont influencé grandement ma façon de voir la recherche en science. Finalement, merci à vous deux de m'avoir laissé toute la latitude et l'indépendance nécessaire qui m'a permis de me développer autant comme scientifique que comme personne.

Merci à ma famille, spécialement ma mère Mireille, mon père Lucien et surtout mes Grands-Parents, Pa pis Man, qui ont tenu le fort lors des soubresauts de ma folle jeunesse. Merci de m'avoir inculqué l'importance de toujours poursuivre mes études jusqu'à l'obtention des objectifs fixés.

Merci à tous les collègues rencontrés durant ces études graduées. Merci spécial à Patrice (El'patou), Antony (Tony), Antoine (Toinos), François (FrankyFrank ou DirtyFrank), Philip (Doudoune), Danny (Dan ou Dany avec juste un "n"), Jean-Michel (Jim), Pascal (Pascoual), Mannix (Monni). Merci pour le fun et d'avoir enduré toutes mes niaiseries, généralement faites à vos dépends.

Merci aux Drs Fournier, Gendron et Boulay pour avoir généreusement accepté de corriger ma thèse et de m'avoir soumis vos précieux commentaires. Vos corrections ont grandement contribuées à l'amélioration de ma thèse.

Finalement, un merci immense à ma petite famille à moi, Maryse ma coéquipière de vie, et mes p'tits tanants, Félix, Jeanne et Charlie. Merci à Maryse de me suivre dans mes "folleries", merci pour les encouragements nécessaires afin de finalement finir de finir mon doctorat. Merci pour être là parce que les épreuves sont toujours plus faciles en équipe. Merci de partager ta vie avec la mienne. Merci à Félix, Jeanne et Charlie pour me démontrer à tous les jours la simplicité de la vie et la nécessité de toujours s'émerveiller aux petites choses que la vie nous donne.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABDELRAHMAN, A. M. et PANG, C. C. (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life Sci* 71: 819-25
- 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
- ARNIS, S., FAHMY, K., HOFMANN, K. P. et SAKMAR, T. P. (1994) A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin. *J Biol Chem* 269: 23879-81
- ASAKURA, M., KITAKAZE, M., TAKASHIMA, S., LIAO, Y., ISHIKURA, F., *et al.* (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8: 35-40
- ASHTON, N. (2006) Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int* 70: 624-9
- BAKER, J. G. et HILL, S. J. (2007) Multiple GPCR conformations and signalling pathways: implications for antagonist affinity estimates. *Trends Pharmacol Sci* 28: 374-81
- BALLESTEROS, J. A., JENSEN, A. D., LIAPAKIS, G., RASMUSSEN, S. G., SHI, L., *et al.* (2001) 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. 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.
- BARAK, L. S., OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A. et CARON, M. G. (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 93-8
- BARGMANN, C. I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282: 2028-33
- BARLIC, J., ANDREWS, J. D., KELVIN, A. A., BOSINGER, S. E., DEVRIES, M. E., et al. (2000) Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat Immunol* 1: 227-33
- BEAULIEU, J. M., SOTNIKOVA, T. D., MARION, S., LEFKOWITZ, R. J., GAINETDINOV, R. R. et CARON, M. G. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122: 261-73
- BENOVIC, J. L., BOUVIER, M., CARON, M. G. et LEFKOWITZ, R. J. (1988) Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* 4: 405-28
- BENOVIC, J. L., PIKE, L. J., CERIONE, R. A., STANISZEWSKI, C., YOSHIMASA, T., et al. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor

- phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 260: 7094-101
- 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
- BICHET, D. G., TURNER, M. et MORIN, D. (1998) Vasopressin receptor mutations causing nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Assoc Am Physicians* 110: 387-94
- BISCARDI, J. S., MAA, M. C., TICE, D. A., COX, M. E., LEU, T. H. et PARSONS, S. J. (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274: 8335-43
- BOCKAERT, J., FAGNI, L., DUMUIS, A. et MARIN, P. (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103: 203-21
- BOCKAERT, J. et PIN, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18: 1723-9
- BOHM, F. et PERNOW, J. (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *Br J Pharmacol* 135: 25-7
- BOSIER, B. et HERMANS, E. (2007) Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol Sci* 28: 438-46
- BOTTRILL, F. E., DOUGLAS, S. A., HILEY, C. R. et WHITE, R. (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 130: 1865-70

- BOUCARD, A. A., SAUVE, S. S., GUILLEMETTE, G., ESCHER, E. et LEDUC, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem J* 370: 829-38
- BOUSETTE, N., HU, F., OHLSTEIN, E. H., DHANAK, D., DOUGLAS, S. A. et GIAID, A. (2006) Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 41: 285-95
- 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
- BRZOSTOWSKI, J. A. et KIMMEL, A. R. (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* 26: 291-7
- BUHL, A. M., JOHNSON, N. L., DHANASEKARAN, N. et JOHNSON, G. L. (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* 270: 24631-4
- CAMARDA, V., RIZZI, A., CALO, G., GENDRON, G., PERRON, S. I., *et al.* (2002) Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365: 141-9
- CAPRA, V., VELTRI, A., FOGLIA, C., CRIMALDI, L., HABIB, A., *et al.* (2004) Mutational analysis of the highly conserved ERY motif of the thromboxane A2 receptor: alternative role in G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* 66: 880-9

- CARMAN, C. V., PARENT, J. L., DAY, P. W., PRONIN, A. N., STERNWEIS, P. M., *et al.* (1999) Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274: 34483-92
- CHAREST, P. G., OLIGNY-LONGPRE, G., BONIN, H., AZZI, M. et BOUVIER, M. (2007) The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal* 19: 32-41
- 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, Y., ZHAO, M. et XIA, C. (2000) [Effect of urotensin II on the airway smooth muscle cell proliferation and its mechanism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 80: 928-30
- 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
- CHEUNG, B. M., LEUNG, R., MAN, Y. B. et WONG, L. Y. (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* 22: 1341-4
- CHINI, B. et PARENTI, M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 32: 325-38
- CHUNG, D. A., WADE, S. M., FOWLER, C. B., WOODS, D. D., ABADA, P. B., *et al.* (2002) Mutagenesis and peptide analysis of the DRY motif in the alpha2A adrenergic receptor: evidence for alternate mechanisms in G protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1233-41

- CLAING, A., CHEN, W., MILLER, W. E., VITALE, N., MOSS, J., *et al.* (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276: 42509-13
- CLAING, A., LAPORTE, S. A., CARON, M. G. et LEFKOWITZ, R. J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66: 61-79
- CONLON, J. M. (2008) "Liberation" of urotensin II from the teleost urophysis: An historical overview. *Peptides* 29: 651-7
- 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
- DAI, H. Y., GE, Z. M. et LI, Y. H. (2006) [Effect of urotensin II on proliferative potential and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 of adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rat]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 28: 776-80
- DAUB, H., WEISS, F. U., WALLASCH, C. et ULLRICH, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-60
- DEFEA, K. A., VAUGHN, Z. D., O'BRYAN, E. M., NISHIJIMA, D., DERY, O. et BUNNETT, N. W. (2000) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11086-91



- DOUGLAS, S. A., DHANAK, D. et JOHNS, D. G. (2004a) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 25: 76-85
- DOUGLAS, S. A., NASELSKY, D., AO, Z., DISA, J., HEROLD, C. L., *et al.* (2004b) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Pharmacol* 142: 921-32
- DOUGLAS, S. A. et OHLSTEIN, E. H. (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 10: 229-37
- 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
- DOUGLAS, S. A., TAYARA, L., OHLSTEIN, E. H., HALAWA, N. et GIAID, A. (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 359: 1990-7
- 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*

- DUTT, P., KJOLLER, L., GIEL, M., HALL, A. et TOKSOZ, D. (2002) Activated Galphaq family members induce Rho GTPase activation and Rho-dependent actin filament assembly. *FEBS Lett* 531: 565-9
- EISENMANN, D. M. (2005) Wnt signaling. *WormBook*: 1-17
- FENG, W. et SONG, Z. H. (2003) Effects of D3.49A, R3.50A, and A6.34E mutations on ligand binding and activation of the cannabinoid-2 (CB2) receptor. *Biochem Pharmacol* 65: 1077-85
- FERGUSON, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24
- FERGUSON, S. S. et CARON, M. G. (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 9: 119-27
- FONG, A. M., PREMONT, R. T., RICHARDSON, R. M., YU, Y. R., LEFKOWITZ, R. J. et PATEL, D. D. (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7478-83
- 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
- GABILONDO, A. M., HEGLER, J., KRASEL, C., BOIVIN-JAHNS, V., HEIN, L. et LOHSE, M. J. (1997) A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic

receptor is involved in receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12285-90

GABORIK, Z., SZASZAK, M., SZIDONYA, L., BALLA, B., PAKU, S., *et al.* (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol* 59: 239-47

GARDINER, S. M., MARCH, J. E., KEMP, P. A., DAVENPORT, A. P. *et* BENNETT, T. (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 132: 1625-9

GARDINER, S. M., MARCH, J. E., KEMP, P. A., MAGUIRE, J. J., KUC, R. E., *et al.* (2006) Regional heterogeneity in the haemodynamic responses to urotensin II infusion in relation to UT receptor localisation. *Br J Pharmacol* 147: 612-21

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

GOHLA, A., OFFERMANN, S., WILKIE, T. M. *et* SCHULTZ, G. (1999) Differential involvement of  $\alpha$ 12 and  $\alpha$ 13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 274: 17901-7

GOODMAN, O. B., JR., KRUPNICK, J. G., SANTINI, F., GUREVICH, V. V., PENN, R. B., *et al.* (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383: 447-50

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

- GRUSON, D., ROUSSEAU, M. F., AHN, S. A., VAN LINDEN, F. et KETELSLEGGERS, J. M. (2006) Circulating urotensin II levels in moderate to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers. *Peptides* 27: 1527-31
- GUREVICH, E. V. et GUREVICH, V. V. (2006) Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol* 7: 236
- HAUSDORFF, W. P., BOUVIER, M., O'DOWD, B. F., IRONS, G. P., CARON, M. G. et LEFKOWITZ, R. J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264: 12657-65
- HAY, D. L., POYNER, D. R. et SEXTON, P. M. (2006) GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109: 173-97
- HAYFLICK, J. S. (2000) A family of heptahelical receptors with adhesion-like domains: a marriage between two super families. *J Recept Signal Transduct Res* 20: 119-31
- HELLER, J., SCHEPKE, M., NEEF, M., WOITAS, R., RABE, C. et SAUERBRUCH, T. (2002) Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 37: 767-72
- HIRSHMAN, C. A. et EMALA, C. W. (1999) Actin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq and Gi-2 activation of Rho. *Am J Physiol* 277: L653-61
- HOON, M. A., ADLER, E., LINDEMEIER, J., BATTEY, J. F., RYBA, N. J. et ZUKER, C. S. (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96: 541-51

- HUA, H., MUNK, S. et WHITESIDE, C. I. (2003) Endothelin-1 activates mesangial cell ERK1/2 via EGF-receptor transactivation and caveolin-1 interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F303-12
- HUNYADY, L. et CATT, K. J. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20: 953-70
- 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*
- 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
- JU, H., VENEMA, V. J., LIANG, H., HARRIS, M. B., ZOU, R. et VENEMA, R. C. (2000) Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* 351: 257-64
- KATANO, Y., ISHIHATA, A., AITA, T., OGAKI, T. et 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
- KENAKIN, T. (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-15

- KJELSBURG, M. A., COTECCHIA, S., OSTROWSKI, J., CARON, M. G. et LEFKOWITZ, R. J. (1992) Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 267: 1430-3
- KOBILKA, B. K. et DEUPI, X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 397-406
- KRISTIANSEN, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80
- 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
- LACZA, Z. et D, W. B. (2006) Urotensin-II is a nitric oxide-dependent vasodilator in the pial arteries of the newborn pig. *Life Sci* 78: 2763-6
- 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., OAKLEY, R. H., ZHANG, J., HOLT, J. A., FERGUSON, S. S., et al. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3712-7
- LAPORTE, S. A., SERVANT, G., RICHARD, D. E., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (1996) The tyrosine within the NPXnY motif of the human

angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. *Mol Pharmacol* 49: 89-95

LECLERC, P. C., AUGER-MESSIER, M., LANCTOT, P. M., ESCHER, E., LEDUC, R. et GUILLEMETTE, G. (2002) A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 143: 4702-10

LEFKOWITZ, R. J. et SHENOY, S. K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512-7

LI, J., EDWARDS, P. C., BURGHAMMER, M., VILLA, C. et SCHERTLER, G. F. (2004) Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* 343: 1409-38

LIN, L., DING, W. H., JIANG, W., ZHANG, Y. G., QI, Y. F., et al. (2004) Urotensin-II activates L-arginine/nitric oxide pathway in isolated rat aortic adventitia. *Peptides* 25: 1977-84

LIN, S. W. et SAKMAR, T. P. (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 IIDA, M. (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
- LUTTRELL, L. M. (2002) Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 375-82
- LUTTRELL, L. M. (2003) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* 30: 117-26
- LUTTRELL, L. M., FERGUSON, S. S., DAAKA, Y., MILLER, W. E., MAUDSLEY, S., *et al.* (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283: 655-61
- 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
- MAGUIRE, J. J., KUC, R. E., WILEY, K. E., KLEINZ, M. J. et DAVENPORT, A. P. (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* 25: 1767-74
- MAILMAN, R. B. (2007) GPCR functional selectivity has therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* 28: 390-6



- MARCHESE, A., CHEN, C., KIM, Y. M. et BENOVIC, J. L. (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28: 369-76
- MARCHESE, A., PAING, M. M., TEMPLE, B. R. et TREJO, J. (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 601-29
- MARION, S., OAKLEY, R. H., KIM, K. M., CARON, M. G. et BARAK, L. S. (2006) A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 281: 2932-8
- MARTIN, N. P., LEFKOWITZ, R. J. et SHENOY, S. K. (2003) Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem* 278: 45954-9
- MATSUSAKA, S. et WAKABAYASHI, I. (2006) Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373: 381-6
- 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
- MCDONALD, P. H., CHOW, C. W., MILLER, W. E., LAPORTE, S. A., FIELD, M. E., *et al.* (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290: 1574-7
- MENTLEIN, R., HELD-FEINDT, J. et KRISCH, B. (2001) Topology of the signal transduction of the G protein-coupled somatostatin receptor sst2 in human glioma cells. *Cell Tissue Res* 303: 27-34

- MOORE, C. A., MILANO, S. K. et BENOVIC, J. L. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 451-82
- 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
- MORRISON, D. K. et DAVIS, R. J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118
- MOYLE, W. R., LIN, W., MYERS, R. V., CAO, D., KERRIGAN, J. E. et BERNARD, M. P. (2005) Models of glycoprotein hormone receptor interaction. *Endocrine* 26: 189-205
- NAVRATIL, A. M., BLISS, S. P., BERGHORN, K. A., HAUGHIAN, J. M., FARMERIE, T. A., *et al.* (2003) Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J Biol Chem* 278: 31593-602
- NICHOLS, B. J. et LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11: 406-12
- NOTHACKER, H. P. et CLARK, S. (2005) From heart to mind. The urotensin II system and its evolving neurophysiological role. *Febs J* 272: 5694-702
- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., BARAK, L. S. et CARON, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274: 32248-57

- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., BARAK, L. S. et CARON, M. G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem* 276: 19452-60
- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., CARON, M. G. et BARAK, L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275: 17201-10
- OLDHAM, W. M. et HAMM, H. E. (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39: 117-66
- 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. (2004a) Urotensin II: the old kid in town. *Trends Endocrinol Metab* 15: 175-82
- ONAN, D., PIPOLO, L., YANG, E., HANNAN, R. D. et THOMAS, W. G. (2004b) Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 18: 2344-54
- 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
- OSTROM, R. S., VIOLIN, J. D., COLEMAN, S. et INSEL, P. A. (2000) Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 57: 1075-9

- 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
- PAPADOPOULOS, P., BOUSETTE, N. et GIAID, A. (2008) Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* 29: 764-9
- PARK, J. H., SCHEERER, P., HOFMANN, K. P., CHOE, H. W. et ERNST, O. P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454: 183-7
- 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 U S A* 77: 5021-4
- PELLETIER, G., LIHRMANN, I., DUBESSY, C., LUU-THE, V., VAUDRY, H. et LABRIE, F. (2005) Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 132: 689-96
- PFEIFFER, R., KIRSCH, J. et FAHRENHOLZ, F. (1998) Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp Cell Res* 244: 327-39
- PIERCE, K. L., TOHGO, A., AHN, S., FIELD, M. E., LUTTRELL, L. M. et LEFKOWITZ, R. J. (2001) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for

- identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* 276: 23155-60
- 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
- PREMONT, R. T. et GAINETDINOV, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 511-34
- PROULX, C. D., HOLLERAN, B. J., BOUCARD, A. A., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2008) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol Pharmacol*
- PROULX, C. D., SIMAAN, M., ESCHER, E., LAPORTE, S. A., GUILLEMETTE, G. et LEDUC, R. (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* 385: 115-23
- QI, J. S., MINOR, L. K., SMITH, C., HU, B., YANG, J., *et al.* (2005) Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* 26: 683-90
- REITER, E. et LEFKOWITZ, R. J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17: 159-65
- ROSEBERRY, A. G. et HOSEY, M. M. (2001) Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J Cell Sci* 114: 739-46

- 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
- ROSSOWSKI, W. J., CHENG, B. L., TAYLOR, J. E., DATTA, R. et COY, D. H. (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 438: 159-70
- 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
- RUPRECHT, J. J., MIELKE, T., VOGEL, R., VILLA, C. et SCHERTLER, G. F. (2004) Electron crystallography reveals the structure of metarhodopsin I. *Embo J* 23: 3609-20
- RUSSELL, F. D. (2004) Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 103: 223-43
- RUSSELL, F. D. et MOLENAAR, P. (2004) Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovasc Res* 63: 673-81
- RUSSELL, F. D., MOLENAAR, P. et O'BRIEN, D. M. (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *Br J Pharmacol* 132: 5-9
- SAETRUM OPGAARD, O., NOTHACKER, H., EHLERT, F. J. et KRAUSE, D. N. (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 406: 265-71

- SAUZEAU, V., LE MELLIONNEC, E., BERTOGLIO, J., SCALBERT, E., PACAUD, P. et LOIRAND, G. (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 88: 1102-4
- SCHEER, A., FANELLI, F., COSTA, T., DE BENEDETTI, P. G. et COTECCHIA, S. (1996) Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *Embo J* 15: 3566-78
- SCHWARTZ, T. W. (1994) Locating ligand-binding sites in 7TM receptors by protein engineering. *Curr Opin Biotechnol* 5: 434-44
- 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
- SEALFON, S. C., CHI, L., EBERSOLE, B. J., RODIC, V., ZHANG, D., *et al.* (1995) Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J Biol Chem* 270: 16683-8
- 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
- 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

- SHENOY, S. K., DRAKE, M. T., NELSON, C. D., HOUTZ, D. A., XIAO, K., *et al.* (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281: 1261-73
- SHENOY, S. K. et LEFKOWITZ, R. J. (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375: 503-15
- 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
- SIBLEY, D. R., PETERS, J. R., NAMBI, P., CARON, M. G. et LEFKOWITZ, R. J. (1984) Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. Beta-adrenergic receptor phosphorylation is correlated with attenuation of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* 259: 9742-9
- 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
- SOMLYO, A. P. et SOMLYO, A. V. (2003) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-58
- STERNE-MARR, R., DHAMI, G. K., TESMER, J. J. et FERGUSON, S. S. (2004) Characterization of GRK2 RH domain-dependent regulation of GPCR coupling to heterotrimeric G proteins. *Methods Enzymol* 390: 310-36



- 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., FONG, T. M., GRAZIANO, M. P. *et* TOTA, M. R. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 9: 745-54
- STRULOVICI, B., CERIONE, R. A., KILPATRICK, B. F., CARON, M. G. *et* LEFKOWITZ, R. J. (1984) Direct demonstration of impaired functionality of a purified desensitized beta-adrenergic receptor in a reconstituted system. *Science* 225: 837-40
- SUGO, T. *et* MORI, M. (2008) Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14 Discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides* 29: 809-12
- 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
- SUN, Y., CHENG, Z., MA, L. *et* PEI, G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277: 49212-9
- TANOWITZ, M. *et* VON ZASTROW, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem* 277: 50219-22
- TASAKI, K., HORI, M., OZAKI, H., KARAKI, H. *et* WAKABAYASHI, I. (2004) Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci* 94: 376-83

- TEIXEIRA, A., CHAVEROT, N., SCHRODER, C., STROSBURG, A. D., COURAUD, P. O. et CAZAUBON, S. (1999) Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J Neurochem* 72: 120-8
- 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
- TZANIDIS, A., HANNAN, R. D., THOMAS, W. G., ONAN, D., AUTELITANO, D. J., et al. (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* 93: 246-53
- 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
- USHIO-FUKAI, M., HILENSKI, L., SANTANAM, N., BECKER, P. L., MA, Y., et al. (2001) Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J Biol Chem* 276: 48269-75
- VASSILATIS, D. K., HOHMANN, J. G., ZENG, H., LI, F., RANCHALIS, J. E., et al. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4903-8

- 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
- VON ZASTROW, M. et KOBILKA, B. K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* 267: 3530-8
- WANG, H., MEHTA, J. L., CHEN, K., ZHANG, X. et LI, D. (2004) Human urotensin II modulates collagen synthesis and the expression of MMP-1 in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 577-81
- 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
- WATANABE, T., PAKALA, R., KATAGIRI, T. et BENEDICT, C. R. (2001a)  
Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104: 16-8
- WATANABE, T., PAKALA, R., KATAGIRI, T. et BENEDICT, C. R. (2001b)  
Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 19: 2191-6
- WATANABE, T., SUGURO, T., KANOME, T., SAKAMOTO, Y., KODATE, S., *et al.* (2005) Human urotensin II accelerates foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *Hypertension* 46: 738-44
- 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

- WEI, H., AHN, S., SHENOY, S. K., KARNIK, S. S., HUNYADY, L., *et al.* (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10782-7
- WILLOUGHBY, E. A. et COLLINS, M. K. (2005) Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2. *J Biol Chem* 280: 25651-8
- WOLFE, B. L. et TREJO, J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8: 462-70
- 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, J., BARAK, L. S., ANBORGH, P. H., LAPORTE, S. A., CARON, M. G. et FERGUSON, S. S. (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274: 10999-1006
- ZHANG, J., FERGUSON, S. S., BARAK, L. S., MENARD, L. et CARON, M. G. (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271: 18302-5
- ZHANG, Y., LI, J., CAO, J., CHEN, J., YANG, J., *et al.* (2002) Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium. *Heart Vessels* 16: 64-8

- ZHOU, P., WU, S. Y., YU, C. F., WANG, H., TANG, C. S., *et al.* (2003) [Effects of urotensin II on isolated rat hearts under normal perfusion and ischemia reperfusion]. *Sheng Li Xue Bao* 55: 442-8
- ZHU, Y. C., ZHU, Y. Z. *et* MOORE, P. K. (2006) The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br J Pharmacol* 148: 884-901
- ZILTENER, P., MUELLER, C., HAENIG, B., SCHERZ, M. W. *et* NAYLER, O. (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 22: 155-68
- ZOU, Y., NAGAI, R. *et* YAMAZAKI, T. (2001) Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Lett* 508: 57-60
- ZOZULYA, S., ECHEVERRI, F. *et* NGUYEN, T. (2001) The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol* 2: RESEARCH0018