

Université de Sherbrooke

RÉGULATION FONCTIONNELLE DU RÉCEPTEUR DE L'ACTH, MC2R.

Par
Simon Roy
Département de Médecine
Service d'Endocrinologie

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 Physiologie (endocrinologie)

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre 2011

Membres du jury d'évaluation

Pr Nicole Gallo-Payet, Service d'Endocrinologie, Département de Médecine, Programme
de Physiologie

Dr Louis Gendron, Département de Physiologie et Biophysique

Dr Richard Leduc, Département de Pharmacologie

et

Dr Michel Bouvier, Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de
Montréal



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: 978-0-494-89659-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-89659-4

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.

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.

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.

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

Table des matières	i
Liste des abréviations	v
Liste des publications	vii
Résumé	
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 La glande surrénale, une glande endocrine	1
1.1.1 Origine embryonnaire des glandes surrénales	1
1.1.2 Le cortex surrénalien	1
1.1.3 Actions de l'ACTH sur le cortex surrénalien	5
1.1.4 Rôles des glucocorticoïdes	8
1.1.5 L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS)	8
1.1.6 Perturbations de l'axe HHS	10
1.2 Signalisation intracellulaire stimulée par l'ACTH	12
1.2.1 L'AMPc : synthèse et dégradation	12
1.2.2 L'AMPc : ses cibles et effecteurs	13
1.2.3 L'AMPc : ses effets sur les cellules	16
1.2.4 L'AMPc : contrôle de sa production par l'ACTH	16
1.2.5 Le calcium	18
1.2.6 Inositols phosphates	19
1.3 Le récepteur de l'ACTH, MC2R	19
1.3.1 Famille des récepteurs aux mélanocortines (MCR)	19
1.3.2 Structure des MCRs	22
1.3.3 MC2R, le «récepteur de l'ACTH»	23
1.4 Régulation fonctionnelle des RCPGs	25
1.4.1 Rôle de la phosphorylation dans la régulation fonctionnelle des RCPGs	25
1.4.2 Trafic intracellulaire des RCPGs internalisés	27
1.4.3 Les arrestines	27
1.4.3.1 Signalisation secondaire des RCPGs internalisés:	28
1.4.4 La clathrine	29
1.4.5 La dynamine	30
1.4.6 Le rôle des Rab GTPases	31
1.5 Régulation fonctionnelle de MC2R	32
1.5.1 Désensibilisation de MC2R	32
1.5.2 Internalisation de MC2R	33
1.6 Dysfonctionnement de MC2R	34
1.6.1 Mutations du promoteur et perte d'hétérozygotie du gène <i>MC2R</i>	35
1.6.2 Mutations activatrices de MC2R	35
1.6.3 Mutations inactivatrices de MC2R	36
1.6.4 Expression cellulaire limitée de MC2R et absence de polymorphismes dans la FGD	36

1.7 MRAP	38
1.7.1 Découverte d'une protéine accessoire à MC2R dont l'absence est responsable de la FGD type 2.....	38
1.7.2 Expression tissulaire des isoformes MRAP1	39
1.7.3 Structure de MRAP	39
1.7.4 Modification de l'activité des RCPGs par des protéines accessoires à un seul domaine transmembranaire	41
 Chapitre 2 - Problématiques et objectifs	44
2.1 Problématique de la régulation fonctionnelle de MC2R	44
 Chapitre 3 - Résultats	47
3.1 Régulation fonctionnelle de MC2R par les isoformes MRAP1	47
3.2 Rôles des parties C-terminales des isoformes MRAP1.....	82
3.3 Internalisation et trafic intracellulaire de MC2R.....	122
3.3.1 Résultats complémentaires sur la désensibilisation de MC2R.....	185
3.3.2 Résultat complémentaire sur le mécanisme d'internalisation de MC2R.....	186
3.3.3 Résultat complémentaire sur la nécessité des MRAPs dans l'expression de surface de certains mutants de MC2R.....	187
 Chapitre 4 – Discussion.....	189
4.1 Expression fonctionnelle de MC2R.....	190
4.2 N-glycosylation de MC2R.....	193
4.3 Rôles des parties C-terminales des isoformes MRAP1	198
4.4 Phosphorylation, désensibilisation, internalisation et recyclage de MC2R.....	203
4.5 Activation des MAPKs par l'ACTH	213
 Chapitre 5 - Conclusion.....	218
 Remerciements	222
 Références	223

Table des tableaux

Tableau 1. Agonistes naturels et distribution tissulaire des MCRs.....	21
--	----

Table des illustrations

Figure 1. Coupe histologique d'une glande surrénale de rat.....	2
Figure 2. Steroïdogénèse surrénalienne.....	4
Figure 3. Mécanisme d'action de l'ACTH.....	6
Figure 4. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	9
Figure 5. Synthèse et hydrolyse de l'AMPc.....	13
Figure 6. Stimulation de la production d'AMPc par des ligands extracellulaires.....	15
Figure 7 Anomalies de la voie de l'AMPc et syndrome de Cushing.....	15
Figure 8. Mécanisme d'action de l'ACTH – régulation de la production d'AMPc.....	17
Figure 9. Clivage de la POMC en mélanocortines et en endorphines.....	21
Figure 10. Propriétés de liaison des MCRs envers l'ACTH et les MSHs.....	23
Figure 11. Désensibilisation, internalisation, dégradation et recyclage des RCPGs.....	26
Figure 12. Signalisation secondaire des RCPGs internalisés.....	29
Figure 13. Internalisation clathrine et dynamine-dépendante	30
Figure 14. Trafic endosomal des récepteurs internalisés.....	32
Figure 15. Structure heptahélicale de MC2R	34
Figure 16. Structure et mutations inactivatrices naturelles de MC2R.....	37
Figure 17. Distribution tissulaire de MC2R, MRAP α et MRAP β chez l'humain	39
Figure 18. Structure de MRAP1	40

Figure 19. Rôle des RAMPs sur le CRLR.....	42
Figure 20. Production d'AMPC en présence ou en absence d'inhibiteur de PDEs	186
Figure 21. Effets des inhibiteurs d'internalisation clathrine- et caveolae-dépendante....	186
Figure 22 L'expression membranaire MRAP1-indépendante est-elle MRAP2-dépendante?	187
Figure 23. Mécanisme d'internalisation et de recyclage de MC2R proposé.....	207
Figure 24. Représentation schématique de la voie potentiellement impliquée dans l'activation de p44/p42 ^{mapk} par l'ACTH et MC2R	216

Liste des abbréviations

AC	Adénylyl cyclase
ACTH	Hormone adrénocorticotrope (<i>Adrenocorticotropin hormone</i>)
Ang II	Angiotensine II
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
AT ₁ R	Récepteur de l'Ang II type 1
ATP	Adénosine triphosphate
βCD	β-hydroxy-cyclodextrine
β ₂ AR	Récepteur β ₂ adrénergique
BFA	Bréfeldine A
C	Sous-unité catalytique de la PKA
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine (<i>Calcitonin gene-related peptide</i>)
CPZ	Chlorpromazine
CRF	Corticolibérine (<i>Corticotropin-releasing factor</i>)
CRLR	Récepteur semblable au récepteur de la calcitonine (<i>Calcitonin receptor-like</i>)
DHEA-S	Déshydroépiandrostérone-sulfate
Endo H	Endoglycosidase H
ERK	Kinase des signaux extracellulaires (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FGD	Déficiencia familiale en glucocorticoïdes (<i>Familial glucocorticoid deficiency</i>)
FRT	Cible de la <i>Flp</i> recombinase (<i>Flp recombinase target</i>)
FSK	Forskoline
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GRK	Kinase des RCPGs activés (<i>GPCR kinase</i>)
HEK	Embryonnaire de rein humain (<i>Human embryonic kidney</i>)
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
GMPC	3',5'-guanosine monophosphate cyclique
IBMX	Isobutyl-3-méthyl-xanthine
LDL	Lipoprotéines de faible densité (<i>Low density lipoprotein</i>)
MAPK	Kinase activée par les mitogènes (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MCR	Récepteur aux mélanocortines (<i>Melanocortin receptor</i>)

MC2R	Récepteur aux mélanocortines-2 (<i>Melanocortin-2 receptor</i>)
MDC	Monodansylcadavérine
MRAP	Protéine accessoire à MC2R (<i>MC2R accessory protein</i>)
PAO	Oxyde de phenylarsine (<i>Phenylarsin oxide</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PKC	Protéine kinase C
PNGase	Peptide: N glycosidase F
POMC	Pro-opiomélanocortine
PRKAR	Sous-unité régulatrice de PKA (<i>PKA regulatory subunit 1A</i> ou RI α)
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory</i>
R	Sous-unité régulatrice de la PKA
RAMP	Protéine modifiant l'activité de récepteurs (<i>Receptor activity-modifying protein</i>)
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G (GPCR en anglais)
REEP	Protéine haussant l'expression de RCPG (<i>Receptor expression-enhancing protein</i>)
RTP	Protéine transportant des récepteurs (<i>Receptor-transporting protein</i>)
ZF	Zone fasciculée
ZG	Zone glomérulée
ZI	Zone intermédiaire
ZR	Zone réticulée

Liste des publications

J'ai choisi de présenter ma thèse sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis pour publication avec révision par comité de pairs. En date du dépôt initial de cette thèse (28 février 2011), 4 articles ont été publiés et 2 autres articles ont été soumis. J'ai décidé d'inclure 3 de ces manuscrits (4, 5 et 6) à la présente thèse de doctorat. Les articles non-compris dans cette thèse sont tout de même abordés en discussion.

Publications

1- Roy S, Pinard S and Gallo-Payet N. Adrenocorticotropin hormone (ACTH) effects on MAPK phosphorylation in human fasciculata cells and in embryonic kidney 293 cells expressing human melanocortin 2 receptor (MC2R) and MC2R accessory protein (MRAP) β . Sous presse. Déc 2010. doi:10.1016/j.mce.2010.12.030.

2- Agulleiro MJ, Roy S*, Sanchez E, Puchol S, Gallo-Payet N, Cerda-Reverter JM. 2010. Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol* 320:145-152.

*Co-premier auteur

3- Roy S, Perron B, Gallo-Payet N. 2010. Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology* 151:660-670.

4- Roy S, Rached M and Gallo-Payet N. 2007. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol* 21:1656-1669.

Articles soumis

5- Roy S, Roy SJ, Pinard S, Rached M, Parent J-L and Gallo-Payet N. Mechanisms of Melanocortin-2 Receptor (MC2R) Internalization and Recycling in Human Embryonic Kidney Cells: Identification of Key *Ser/Thr* Amino Acids. Soumis à *Molecular Endocrinology*, septembre 2011.

6- Roy S, Roy SJ, Pinard S, Agulleiro MJ, Cerda-Reverter JM and Gallo-Payet N. Role of the C-terminal domains of MRAP in their localization and in the tuning of ACTH receptor (MC2R) activity. Soumis à *Molecular Endocrinology* le 14 janvier 2011.

Communications orales

Simon Roy, Maria J Agulleiro, JM Cerda-Reverter et Nicole Gallo-Payet. *Rôle du domaine C-terminal de MC2R Accessory Protein (MRAP) sur sa localisation intracellulaire et sur la fonction du récepteur de l'ACTH (MC2R).* Journée scientifique l'Axe des Maladies Endocriniennes et Métaboliques (AMEM). Sherbrooke, Québec, Canada. 25 mai 2010.

Simon Roy et Nicole Gallo-Payet. *Régulation fonctionnelle du récepteur de l'ACTH (MC2R).* Journée scientifique l'Axe des Maladies Endocriniennes et Métaboliques. Magog, Québec, Canada. 19 mai 2009.

Simon Roy, Mohamed Rached & Nicole Gallo-Payet. *ACTH binding to MC2R is Regulated by Human MRAP Isoforms in HEK293 Isogenic Cell Lines.* The Endocrine Society's 89th Annual Meeting (ENDO 07). Toronto, Ontario, Canada. 2 juin 2007.

Simon Roy, Mohamed Rached & Nicole Gallo-Payet. *Expression Fonctionnelle du Récepteur MC2 de l'ACTH.* Journée scientifique l'Axe des Maladies Endocriniennes et Métaboliques (AMEM). Mont-Tremblant, Québec, Canada. 22 mai 2007.

Simon Roy, Mohamed Rached et Nicole Gallo-Payet. *Différents Phénotypes du Récepteur aux Mélanocortines de type 2.* Journée scientifique de l'Équipe de Physiopathologie Endocrinienne. Magog, Québec, Canada. 23 mai 2006.

Simon Roy et Nicole Gallo-Payet. *La Sensibilité aux Stress : Une Histoire de Partenaire?* Journée de la recherche de l'Université de Sherbrooke. Sherbrooke, Québec, Canada. 7 février 2006.

Communications par affiches

Roy S, Pinard S and Gallo-Payet N. *In human cells, ACTH induces MAPK phosphorylation according to a cAMP/PKA mechanism.* Conference on the Adrenal Cortex XIV. San Diego, CA, USA. 16-18 juin 2010.

Roy S, Pinard S, Roy SJ, Taillefer L-D and Gallo-Payet N. *Desensitization, internalization and desensitization of the ACTH receptor (MC2R) in non-adrenal 293/FRT cells.* The 11th Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires. Rochester, NY, USA. 15-18 octobre 2009.

Roy S, Perron B and Gallo-Payet N. *N-glycosylation of the ACTH receptor (MC2R).* The 10th Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires. Bromont, QC, Canada. 16-18 octobre 2008.

Roy S and Gallo-Payet N. The different C-terminal domains of MC2R accessory protein fine-tune the production of ACTH-induced cAMP through the activation of MC2R. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting (ENDO 08). San Francisco, CA, USA. 15-18 juin 2008.

Roy S and Gallo-Payet N. T143 from the second intracellular loop of the ACTH receptor distinguishes MRAP-dependent from MRAP-independent expression of MC2R at the cell surface. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting (ENDO 08). San Francisco, CA, USA. 15-18 juin 2008.

Roy S, Perron B and Gallo-Payet N. *Biochemical and Functional Analysis of the Tandem N-Glycosylation Sites of the Human ACTH Receptor.* Conference on the Adrenal Cortex XIII. San Francisco, CA, USA. 11-14 juin 2010.

Roy S and Gallo-Payet N. MRAP isoforms : different localizations, topologies, N-linked glycosylation and functional consequences on GPCR functions. 1er congrès du Centre des Neurosciences de Sherbrooke. Orford, QC, Canada. 10 avril 2008.

Roy S and Gallo-Payet N. *The Regulation of the Basal and ACTH-Stimulated Cell Surface Expression of the ACTH Receptor.* The 8th Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires. London, ON, Canada. 27-29 septembre 2007.

Roy S and Gallo-Payet N. *Threonine 143 from the Second Intracellular Loop of MC2R is Critical for Receptor Function.* The 8th Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires. London, ON, Canada. 27-29 septembre 2007.

Régulation fonctionnelle du récepteur de l'ACTH, MC2R

Simon Roy, Département de Médecine, Service d'Endocrinologie

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 Physiologie (option Endocrinologie). Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'ACTH stimule son récepteur au niveau du cortex surrénalien afin d'enclencher la synthèse et la sécrétion de cortisol chez l'humain. L'hypothèse du projet propose qu'il existe une régulation moléculaire de MC2R (*melanocortin-2 receptor*) qui permet les cellules corticosurréaliennes de s'adapter aux variations physiologiques d'ACTH. Mon projet de doctorat a consisté à utiliser MC2R et MRAP (*MC2R accessory protein*) recombinés dans les cellules embryonnaires de rein humain (HEK) 293/FRT (*Flp recombinase target*). J'ai développé ce modèle entièrement humain afin de contourner les problèmes d'expression fonctionnelle de MC2R (avant 2005) dans le but d'approfondir nos connaissances sur la régulation fonctionnelle de MC2R. Les objectifs spécifiques étaient de : 1) Déterminer le rôle des isoformes MRAP1 dans l'expression fonctionnelle de MC2R. 2) Déterminer les différences entre MRAPs. 3) Analyser l'internalisation et le recyclage de MC2R. 4) Déterminer la contribution des 9 sérines (S) et thréonines (T) intracellulaires de MC2R dans sa régulation fonctionnelle. 5) Déterminer si la phosphorylation des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) induite par l'ACTH est liée au processus d'internalisation de MC2R. Premièrement, MC2R est exprimé à la membrane plasmique des cellules 293/FRT mais de manière non-fonctionnelle. La co-expression de l'une ou l'autre des isoformes MRAP1 (MRAP α ou MRAP β) humaines augmente l'expression membranaire de MC2R. MRAP α n'induit pas autant l'expression membranaire de MC2R que MRAP β , ce qui se répercute sur la capacité de liaison de l'ACTH et aussi sur les réponses maximales d'AMPc. Par contre, MRAP α permet une plus grande affinité pour l'ACTH que MRAP β , ce qui se traduit par une plus grande sensibilité des cellules à l'ACTH (section 3.1). Deuxièmement, MC2R est N-glycosylé sur ses deux sites de N-glycosylation, mais cette-dernière n'est pas requise pour sa fonctionnalité (article non-présenté). Troisièmement, le système ACTH/MC2R/MRAP1/MRAP2 du poisson zèbre a été caractérisé (article non-présenté) et s'est soldé par l'observation que zfMRAP1 procure 10 fois plus de sensibilité à l'ACTH que MRAP α . Quatrièmement, chaque domaine C-terminal semble servir au triage des protéines MRAP1 au niveau de l'appareil de Golgi car MRAP α (pré-Golgi), MRAP β (post-Golgi) et leur version tronquée, MRAPdCT (au Golgi), sont préférentiellement localisées dans différents compartiments cellulaires. Les MRAP1s et les MRAP2 modulent l'expression de MC2R. En retour, MC2R augmente l'expression et le ciblage membranaire des MRAP1s (section 3.2). Cinquièmement, l'internalisation de MC2R est clathrine-, dynamine- et arrestine-dépendente. Le recyclage et la resensibilisation de MC2R permet à l'ACTH d'entretenir une production d'AMPc soutenue. Les isoformes MRAP1 internalisent avec MC2R dans des endosomes positifs pour Rab4, Rab5 et Rab11 (section 3.3). Sixièmement, plusieurs S/T sont susceptibles d'être impliquées dans la désensibilisation, l'internalisation et dans la régulation de l'expression membranaire de MC2R. Le résidu T143, cible potentielle de la protéine kinase C (PKC), est critique à l'expression membranaire de MC2R (section 3.3). Finalement, l'activation des voies MAPK n'est pas liée à l'interaction MC2R-arrestine durant l'internalisation (article non-présenté). **Mots-clés** : MC2R, MRAP, ACTH, désensibilisation, internalisation, recyclage, endosome, localisation.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 La glande surrénale, une glande endocrine

1.1.1 Origine embryonnaire des glandes surrénales

La glande surrénale est composée de deux parties distinctes du point de vue physiologique, histologique et endocrinien. Le cortex surrénalien en périphérie et la médullo-surrénale au centre de la glande. Elles proviennent de deux tissus embryonnaires distincts. Le cortex provient du mésoderme alors que la médullo-surrénale est d'origine neuroectodermique comme le tissu nerveux. Ces différences sont reflétées par des rôles fonctionnels différents.

1.1.2 Le cortex surrénalien

Les glandes surrénales jouent un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme glucidique, des réactions immunitaires, de la gestion du stress (cortisol, corticostérone), de l'équilibre hydrominéral (aldostérone) et de la réaction de défense rapide «*fight or flight*» (catécholamines) et de la sécrétion des précurseurs des androgènes (Chrousos *et al.*, 1998). Entouré d'une capsule conjonctive, le cortex représente environ 80% du poids total d'une glande. Morphologiquement, le cortex de la glande surrénale est formé de trois zones concentriques, la zone glomérulée (ZG), la plus externe et la plus étroite; la zone fasciculée (ZF), la plus large; et la zone réticulée (ZR) (Figure 1) (Vinson, 2003). Entre la ZG et la ZF, il existe aussi la zone intermédiaire (ZI) (Cater and Lever, 1954).

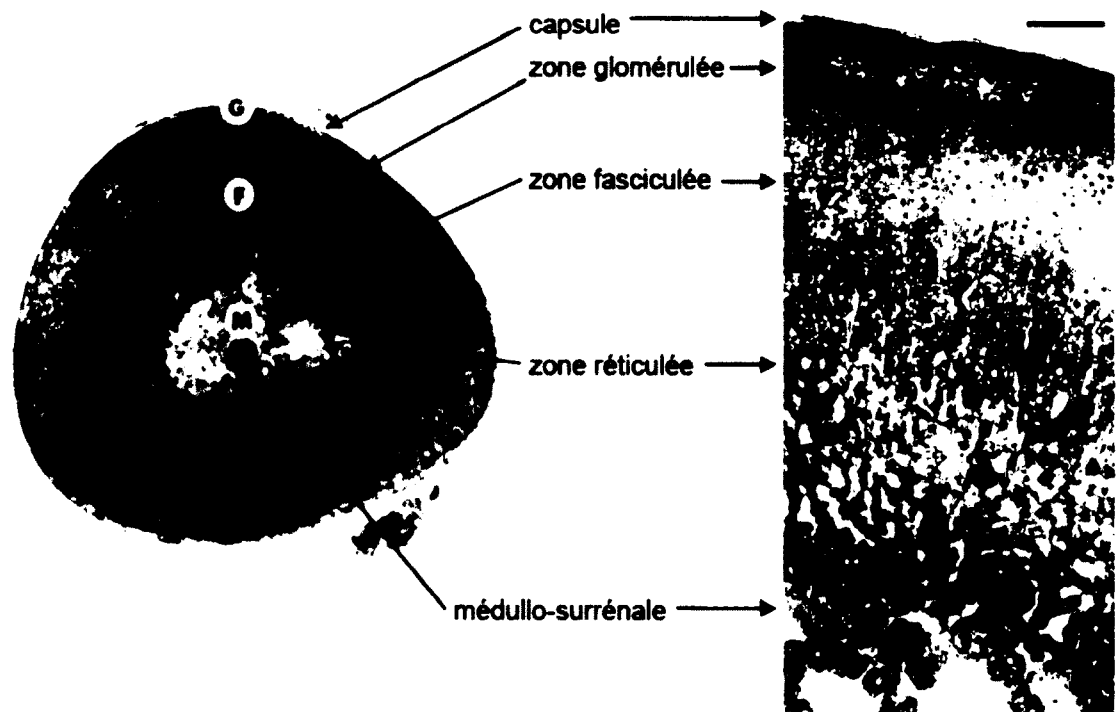


Figure 1. Coupe histologique d'une glande surrénale de rat. A) Glande surrénale de rat montrant le cortex et la médullo-surrénale (tiré de (Gallo-Payet *et al.*, 1987)). B) Cortex surrénalien de rat composé des zones glomérulées, fasciculée et réticulée. Tiré de (Vinson, 2003).

En périphérie du cortex, la ZG est constituée de cellules disposées en glomérules qui entourent un capillaire sanguin. La ZG est responsable de la sécrétion des minéralocorticoïdes dont l'aldostérone (Mulrow and Franco-Saenz, 1996). Ensuite, La ZF représente la zone la plus large du cortex. Les glandes surrénales sont extrêmement bien irriguées. Par exemple, la ZF est composée de cellules qui sont disposées en cordons parallèles, séparés par des sinusoides. Le rôle des cellules fasciculées est de synthétiser les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme, corticosterone chez le rat) (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998). La ZI est décrite comme étant une zone de transition non-stéroïdogénique qui est située entre la ZF et la ZG chez le rat (Mitani *et al.*, 1994). Certains auteurs identifient la ZI comme étant la source des cellules progénitrices du cortex surrénalien (Mitani *et al.*, 1996; Pignatelli *et al.*, 2002; Mitani *et al.*, 2003). Les cellules progénitrices pourraient provenir des cellules embryonnaires qui migrent vers les ZG et ZI à partir de la capsule de la glande surrénale (Kim and Hammer, 2007). Enfin, la couche la plus interne du cortex est nommée

ZR et est adjacente à la médullo-surrénale. Les cellules réticulées forment un réseau irrégulier et synthétisent les précurseurs des androgènes, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté DHEA-S et aussi du cortisol chez l'homme (Vinson and Ho, 1998; Vinson, 2003).

En plus d'être régulée par des axes systémiques (régulation endocrine), la stéroïdogénèse surrénalienne est régulée par des interactions intra-glande (régulations autocrines et paracrines) et des systèmes locaux (section 1.1.5) (Bornstein and Ehrhart-Bornstein, 1992; Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998; Bornstein and Ehrhart-Bornstein, 2000).

La production des différents corticostéroïdes est associée à chacune des zones du cortex et se déroule de façon orchestrée et différente pour la ZF et la ZR par rapport à la ZG (Aguilera and Catt, 1983; Nussdorfer, 1986; Aguilera, 1993; Aguilera *et al.*, 1993). Cependant, tous les corticostéroïdes sont synthétisés à partir du même précurseur, le cholestérol, et plusieurs réactions enzymatiques menant à leur synthèse sont identiques. L'étape limitante de la stéroïdogénèse est la conversion du cholestérol en prégnénolone (Kahnt *et al.*, 1974), étape qui dépend de l'entrée du cholestérol dans les mitochondries (Rainey *et al.*, 1986; Stocco, 1997). Par la suite, des réactions enzymatiques spécifiques à chaque zone du cortex permettent la synthèse d'un stéroïde spécifique (Figure 2).

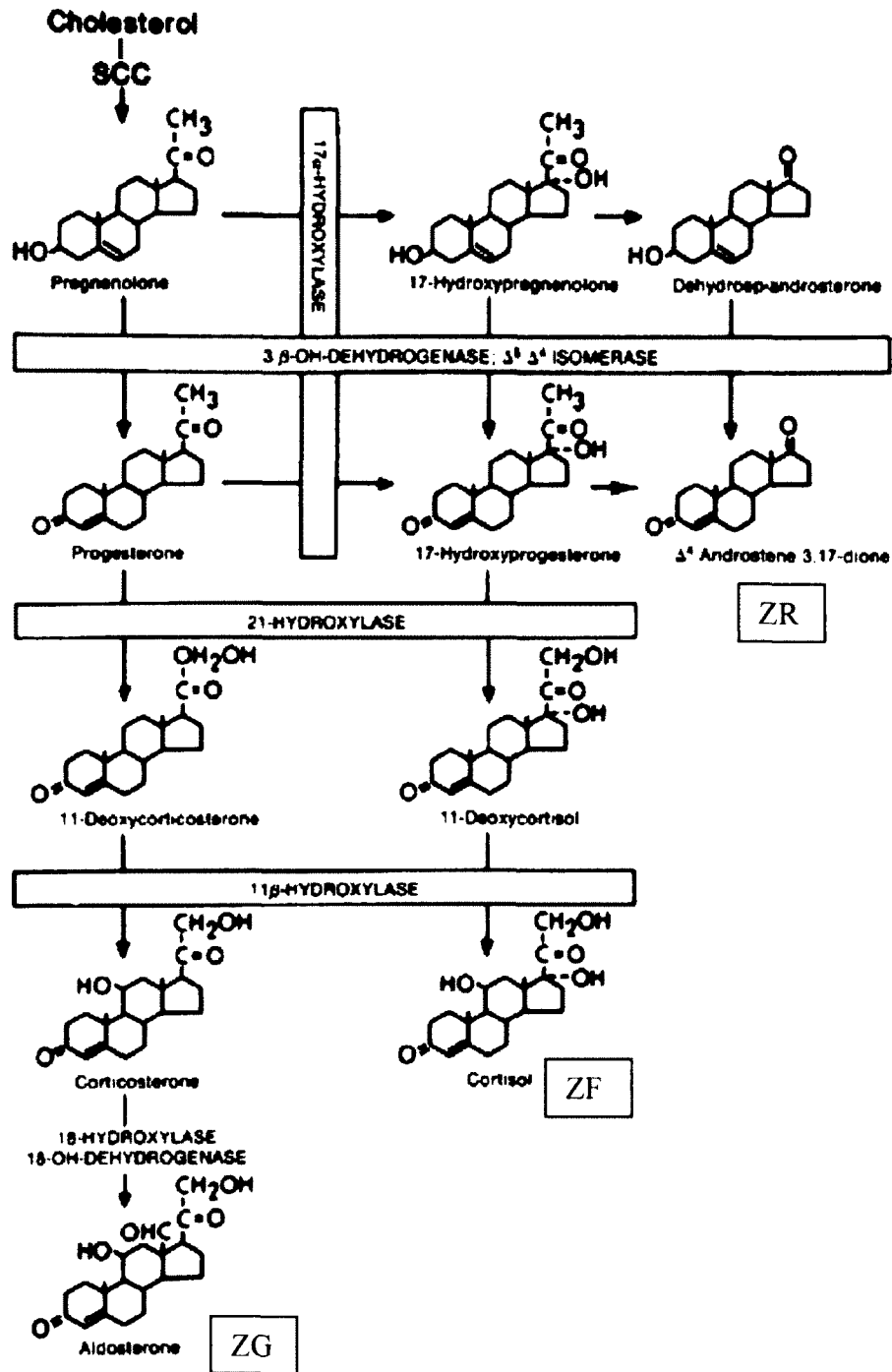


Figure 2. Steroïdogénèse surrénalienne. Étapes enzymatiques qui mènent à la synthèse des corticostéroïdes. SCC, side chain cleavage. D'après (Simpson and Waterman, 1989).

1.1.3 Actions de l'ACTH sur le cortex surrénalien

L'ACTH, libérée dans le sang depuis l'adénohypophyse, est le plus puissant et le plus efficace des stimuli stéroïdogéniques et trophiques du cortex surrénalien. Ces effets induits par l'ACTH sont essentiels au développement et au maintien de la zone fasciculée (Chida *et al.*, 2007). L'ACTH induit l'expression de plusieurs gènes essentiels à l'organisation de la glande, la signalisation et à la stéroïdogénèse (Rainey *et al.*, 1986; Penhoat *et al.*, 1989; Naville *et al.*, 1991; Lebrethon *et al.*, 1994; Mountjoy *et al.*, 1994; Gaillard *et al.*, 2000; Rainey *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2003; Sewer and Waterman, 2003; Huber *et al.*, 2005; Otis *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2010). L'ACTH exerce ses effets majoritairement sur la ZF (cortisol), mais aussi sur la ZG (aldostérone) et la ZR (DHEA) (Gallo-Payet and Payet, 1989; Bornstein *et al.*, 1996). Effectivement, en plus des ions K^+ et du système rénine-angiotensine qui régulent la sécrétion d'aldostérone (Dluhy *et al.*, 1977), l'ACTH peut stimuler la production d'aldostérone dans la ZG (Nicholls *et al.*, 1975; Mulrow and Franco-Saenz, 1996; Mulrow, 1999), toutefois, cet effet est d'une importance secondaire par rapport aux effets qu'exerce l'Ang II (angiotensine II) (Spat and Hunyady, 2004). Néanmoins, l'aldostérone a un cycle diurne et un mode de sécrétion épisodique semblables à ceux du cortisol. L'ACTH exerce des actions immédiates mais aussi soutenues sur le cortex surrénalien en stimulant de façon aiguë la synthèse et la sécrétion des corticostéroïdes et à plus long terme en favorisant la synthèse des enzymes de la stéroïdogénèse (Waterman and Bischof, 1997; Rainey, 1999; Bégeot and Saez, 2000; Sewer and Waterman, 2003) (Figure 2) et celle du récepteur de l'ACTH, MC2R (Penhoat *et al.*, 1989; Mountjoy *et al.*, 1994).

L'ACTH se lie à ses cellules cibles *via* un RCPG (récepteur couplé aux protéines G) nommé MC2R (section 1.3) qui à son tour se couple à une protéine G de type G_s et induit principalement la production d'AMPc et l'activation de la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) comme mode de signalisation (Lefkowitz *et al.*, 1970; Gallo-Payet and Payet, 2003) (section 1.2). Toutes les étapes de la signalisation de l'ACTH sont finement régulées par de nombreux intervenants en amont ou en aval des protéines adénylyl cyclases (ACs) (Gallo-Payet and Payet, 2003) : canaux ioniques (Gallo-Payet and Payet, 1989), ACs (Côté *et al.*, 2001), protéines G (Weinstein *et al.*, 1991; Côté *et al.*,

1997), phosphodiesterases (PDEs) (Côte *et al.*, 1999; Horvath *et al.*, 2006a; Horvath *et al.*, 2006b; Horvath *et al.*, 2008a; Libe *et al.*, 2008) et sous-unités régulatrice IA de la kinase dépendante de l'AMPc (PRKAR1A) (Groussin *et al.*, 2002).

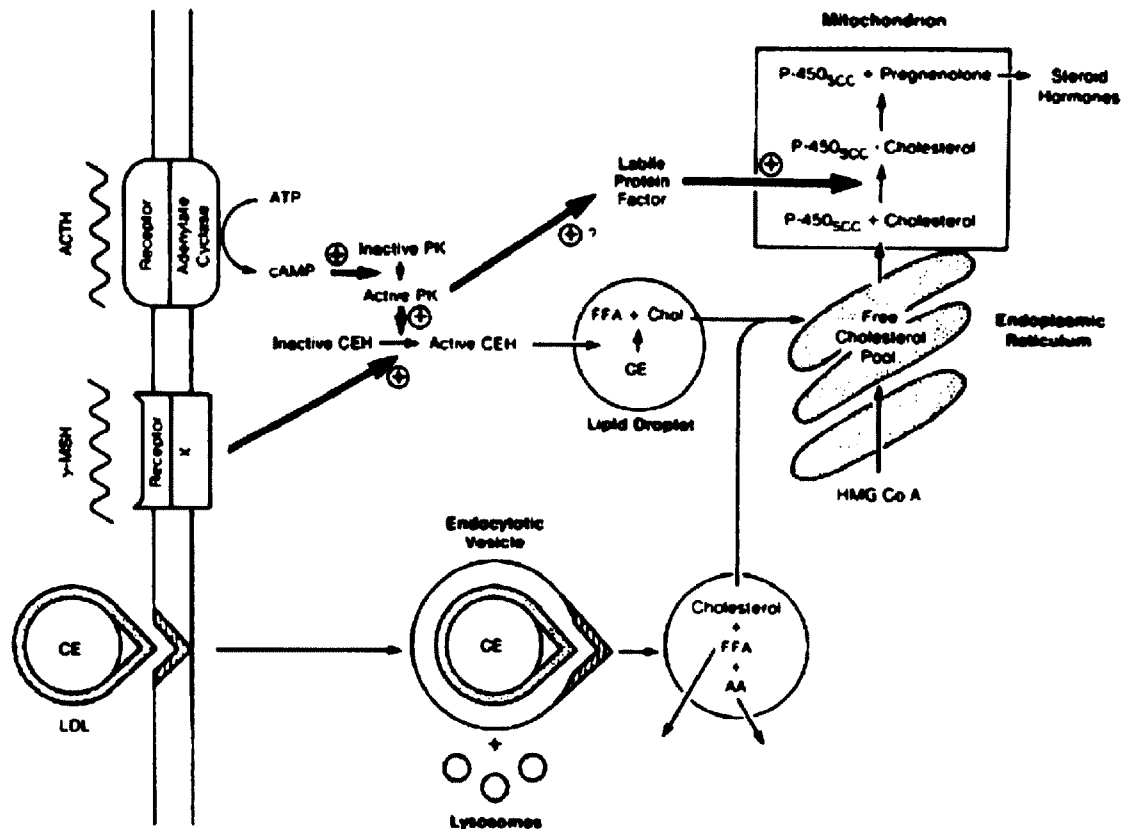


Figure 3. Mécanisme d'action de l'ACTH. PK, protein kinase; CEH, cholesterol ester hydroxylase; FFA, free fatty acids; Chol, cholesterol; CE, cholesterol esters; SCC, side-chain cleavage; HMG CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme; LDL, low-density lipoprotein; AA, amino acids. Tiré de (Simpson and Waterman, 1989).

La réponse aiguë a lieu après quelques minutes de stimulation par l'ACTH et implique la mobilisation du cholestérol emmagasiné dans des gouttelettes lipidiques pour être acheminé à la membrane interne des mitochondries. Ceci est accompagné d'une augmentation rapide de la transcription de la protéine StAR (*steroidogenic acute regulatory*) qui joue un rôle crucial dans la conversion du cholestérol en pregnenolone (Clark *et al.*, 1994; Stocco, 1997). La phase aiguë est particulièrement importante pour la

stimulation rapide des taux de cortisol plasmatique (Simpson and Waterman, 1988). En plus de la phase aiguë qui contrôle la disponibilité du substrat pour la stéroïdogénèse, à plus long terme l'ACTH assure le maintien des niveaux d'expression des enzymes de stéroïdogénèse mais aussi du MC2R (Penhoat *et al.*, 1989; Mountjoy *et al.*, 1994) et d'autres protéines essentielles (Sebag and Hinkle, 2010; Xing *et al.*, 2010). Chaque gène codant pour les enzymes de stéroïdogénèse possède son propre élément de réponse à l'AMPc situé au niveau de son promoteur (Waterman and Bischof, 1997). Ainsi, l'ACTH augmente la transcription des gènes codant pour plusieurs enzymes telles que le cytochrome P450_{scc} (Dubois *et al.*, 1981), P450C11B1 et P450C11B2 (Kramer *et al.*, 1983), P450C21 (Funkenstein *et al.*, 1983), P450C17 (Zuber *et al.*, 1985) et 3 β -HSD (Naville *et al.*, 1991). L'ACTH augmente également la transcription d'autres protéines impliquées dans la stéroïdogénèse, notamment l'HMGC_oA-reductase, l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol (Rainey *et al.*, 1986), et des récepteurs des LDLs (Ohashi *et al.*, 1982) (Figure 3). Aussi, des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la déphosphorylation peuvent être impliquées dans la régulation de l'activité des enzymes de stéroïdogénèse par l'ACTH (Sewer and Waterman, 2003). L'ACTH contribue à augmenter le potentiel stéroïdogénique des cellules fasciculées grâce à une hypertrophie, une hypervascularisation du cortex surrénalien (Vinson *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004).

D'autres stimuli sont capables d'induire ou d'inhiber les fonctions surrénaliennes, notamment de moduler la production de seconds messagers et les voies de signalisation nécessaires à la stéroïdogénèse du cortisol et de l'aldostérone au niveau des cellules de la ZF ou de la ZG. Entre autres, d'autres mélanocortines et dérivés de la POMC, la noradrénaline, la sérotonine, l'adrénomédulline, la vasopressine, la dopamine, la prolactine et l'Ang II sont des hormones ou neurotransmetteurs capables d'induire ou de réprimer la stéroïdogénèse *via* des RCPGs (Lis *et al.*, 1981; Matsuoka *et al.*, 1981; Gullner and Gill, 1983; Guillon *et al.*, 1995; Grazzini *et al.*, 1998; Shah and Murray, 2001; Mazzuco *et al.*, 2007; Jaroenporn *et al.*, 2008).

1.1.4 Rôles des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes ont des effets sur pratiquement tous les tissus. Ils favorisent la gluconéogénèse hépatique, la mobilisation des acides aminés à partir des tissus non-hépatiques, l'inhibition de l'entrée de glucose dans les tissus musculaires et adipeux et la lipolyse dans les tissus adipeux (Boston, 1999; Zimmermann *et al.*, 2010). Ces actions des glucocorticoïdes ont pour but d'élever et de maintenir les concentrations disponibles de glucose dans le sang, de maintenir l'homéostasie glucidique et métabolique. Les glucocorticoïdes sont essentiels à la vie afin de permettre à l'organisme de gérer les stress auquel il peut être soumis (Zhang *et al.*, 2010).

Les glucocorticoïdes ont notamment des actions anti-inflammatoires et immunosuppressives (Bornstein and Rutkowski, 2002; Nussinovitch *et al.*, 2010). Ainsi, utilisés à doses pharmacologiques, les glucocorticoïdes servent à traiter certains cas d'inflammation comme l'arthrite et les dermatites. Les glucocorticoïdes ont aussi des rôles très importants dans le développement fœtal (Lunghi *et al.*, 2010). Notamment, ils permettent le développement des poumons et la sécrétion de surfactant (Alangari, 2010). Toutes ces actions contribuent à inhiber la croissance, le développement et le système immunitaire. Les fonctions thyroïdiennes et gonadiennes sont aussi réprimées par les glucocorticoïdes (Chrousos and Gold, 1992).

1.1.5 L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS)

Sous l'impulsion de la CRH (corticolibérine; «*corticotropin-releasing hormone*») sécrétée par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Mouri *et al.*, 1984; Suda *et al.*, 1984) et aussi de l'arginine vasopressine en cas de stress (Swanson *et al.*, 1983; Debold *et al.*, 1984; Bresson *et al.*, 1985), les cellules corticotropes de l'adénohypophyse effectuent la synthèse et la protéolyse de la pro-opiomélanocortine (POMC) et libèrent l'ACTH selon un rythme circadien (Krieger *et al.*, 1971; Weitzman *et al.*, 1971; Tanaka *et al.*, 1978; Celio *et al.*, 1980; Mains and Eipper, 1980; Walker *et al.*, 2010). Chez l'homme, la concentration d'ACTH plasmatique est maximale tôt le matin et décroît progressivement pour atteindre son minimum vers minuit. La concentration plasmatique chez l'adulte se

situe entre 10 et 80 ng/l (2 à 20 pM) (Tanaka *et al.*, 1978). Une fois stimulées par l'ACTH, les cellules fasciculées activent et/ou synthétisent les enzymes nécessaires à la biosynthèse du cortisol.

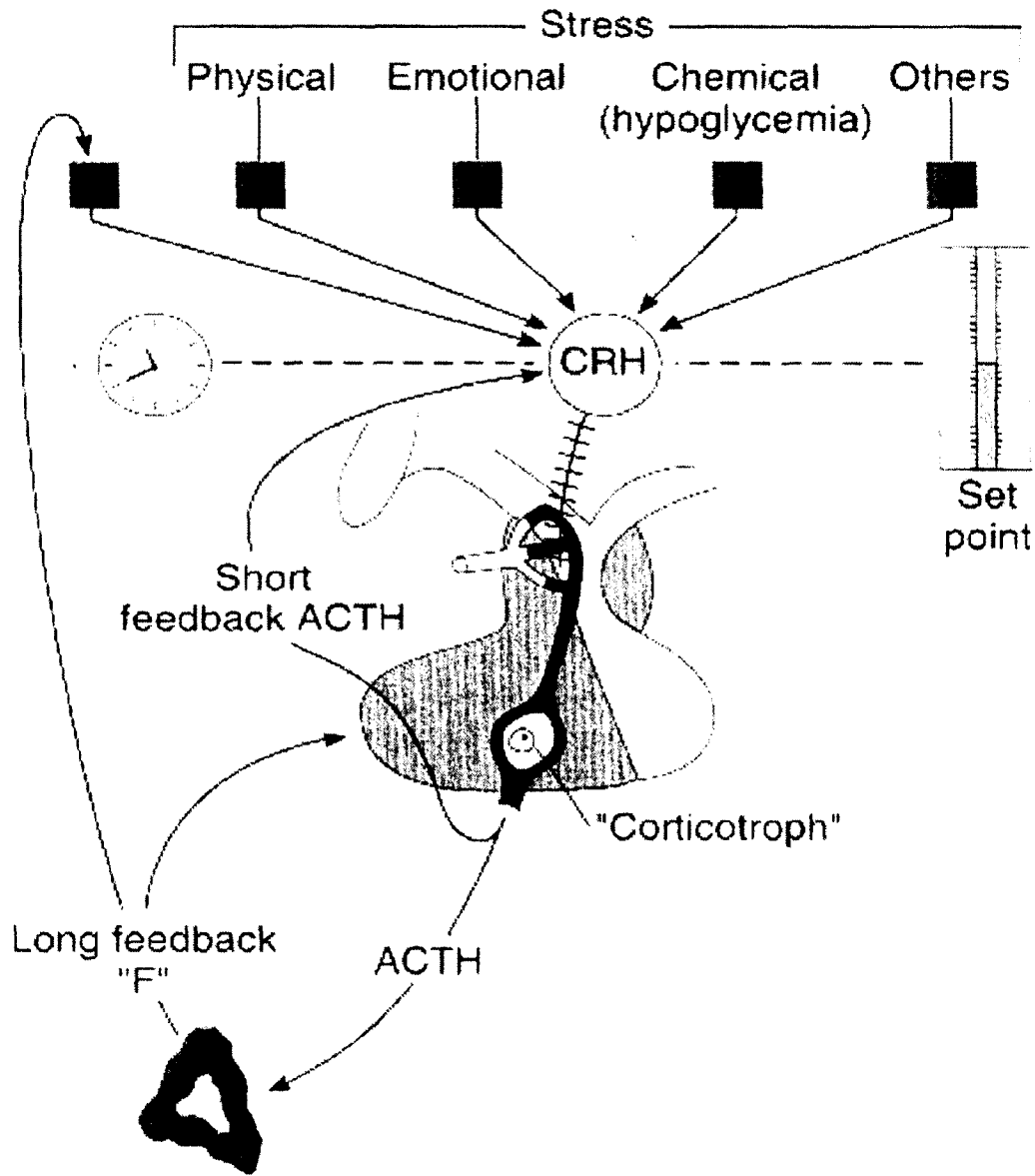


Figure 4. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. En réponses à divers stress et dans un cycle circadien, la CRH relâchée par l'hypothalamus stimule la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. L'ACTH agit sur les glandes surrénales. Le cortisol sécrété par le cortex surrénalien et/ou l'ACTH sécrétée par l'adénohypophyse exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion du CRH (hypothalamus), ainsi que celle de l'ACTH (adénohypophyse). Extrait de Greenspan and Gardner, 2004, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 976 pages.

Après sa sécrétion stimulée par l'ACTH, le cortisol diminue l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par un mécanisme de rétro-contrôle négatif. En se liant sur son récepteur spécifique appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, le cortisol inhibe la transcription de la POMC et de la CRH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse respectivement (Dallman *et al.*, 1987) et diminue ainsi la sécrétion d'ACTH. Ce système de boucles de rétro-contrôle négatif est crucial pour le maintien de la balance fine entre la stimulation et l'inhibition de la sécrétion des glucocorticoïdes (Figure 4).

1.1.6 Perturbations de l'axe HHS

La perturbation des sécrétions de glucocorticoïdes et d'aldostérone sont liées au développement de plusieurs pathologies (Lin *et al.*, 2007; Roberge *et al.*, 2007; Ferraz-De-Souza and Achermann, 2008; Kempna and Fluck, 2008). De façon aiguë (quelques heures), les glucocorticoïdes inhibent directement l'activité de l'axe HHS (rétro-contrôle négatif). En excès chronique, les glucocorticoïdes exercent aussi des effets négatifs sur la croissance longitudinale des os (Lui and Baron, 2010), sur la réparation tissulaire (Grose *et al.*, 2002) et sur la gestion du stress (Dallman *et al.*, 2005).

Au fil des jours, les actions chroniques des glucocorticoïdes sur le cerveau, *via* l'augmentation de sécrétion de sérotonine et d'endocannabinoïdes, sont plutôt excitatrices. À des concentrations élevées et chroniques, les glucocorticoïdes agissent de trois manières qui sont fonctionnellement congruentes. Les glucocorticoïdes augmentent l'expression de l'ARNm de la CRH dans le noyau central de l'amygdale, un point de contrôle des émotions. Le CRH permet le recrutement d'un réseau réponse au stress chronique. Les glucocorticoïdes accroissent la palatabilité des activités agréables ou compulsives (ingestion d'aliments sucrés, d'aliments gras et de médicaments ou de drogues) *via* l'augmentation de la sécrétion de sérotonine et d'endocannabinoïdes, et donc motive l'ingestion de «comfort food» ce qui peut favoriser le dépôt de graisse abdominale (Cammass *et al.*, 1995; Dallman *et al.*, 2003; Dallman *et al.*, 2004; Dallman *et al.*, 2005).

Un excès chronique en glucocorticoïdes peut aussi mener à l'augmentation des perturbations métaboliques et hémodynamiques comme le diabète, l'obésité et l'ostéoporose (Chrousos and Gold, 1992; Chrousos, 1998; Chrousos and Gold, 1998; Roberge *et al.*, 2007).

L'établissement de l'état dépressif, le déclin des fonctions cognitives et le développement de maladies neurodégénératives sont dus aux effets des GC qui diminuent l'activité synaptique, puis la mort des neurones de l'hippocampe et de l'amygdale contrôlant la mémoire et l'état affectif (Feng *et al.*, 2009; Conrad and Bimonte-Nelson, 2010; Jauregui-Huerta *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2010; Yirmiya and Goshen, 2010). Le stress chronique peut être à l'origine de psychose, de troubles affectifs et de maladies neurodégénératives (Phillips *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2009; Conrad and Bimonte-Nelson, 2010; Jauregui-Huerta *et al.*, 2010; Yirmiya and Goshen, 2010) puisque la réponse sérotoninergique des neurones de l'hippocampe devient élevée et anormale et affecte, entre autre, l'expression des récepteurs des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes.

Les conséquences d'une faible activité de l'axe HHS (glucocorticoïdes bas ou absents) sont aussi défavorables. La dépression saisonnière, la fatigue chronique, la fibromyalgie et l'hypothyroïdisme en sont des conséquences majeures (Chrousos and Gold, 1992). Une perte des sécrétions adénohypophysaires d'ACTH ou une insensibilité des glandes surrénales à répondre à l'ACTH causent une atrophie des glandes surrénales et une perte du potentiel stéroïdogénique des cellules fasciculées. Ces manifestations sont visibles la déficience familiale en glucocorticoïdes (FGD), le syndrome du triple A et autres pathologies intimement reliées (Yamaoka *et al.*, 1992; Clark and Weber, 1998; Clark *et al.*, 2005; Metherell *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Ferraz-De-Souza and Achermann, 2008; Kempna and Fluck, 2008; Clark *et al.*, 2009).

En absence de cortisol, l'ACTH est sécrétée massivement et de manière exagérée. Les glandes surrénales sont donc hyperstimulées sans pouvoir répondre par une sécrétion correspondante en stéroïdes (Speiser). Ainsi, la sécrétion exagérée d'ACTH stimule plutôt la sécrétion exagérée de DHEA et autres androgènes, ce qui entraîne un excès de

testostérone chez l'homme (New, 2010). En retour, l'excès d'androgènes comme la testostérone entraîne plusieurs complications physiologiques (Nebesio and Eugster, 2010).

1.2 Signalisation intracellulaire stimulée par l'ACTH

Même si l'AMPc est considéré depuis 1958 comme le second messenger intracellulaire nécessaire pour l'action de l'ACTH et l'activation de la PKA (Haynes, 1958; Lefkowitz *et al.*, 1970), plusieurs travaux montrent l'implication de différentes voies de signalisation qui agissent en interaction avec l'AMPc et expliquent probablement les actions variées et soutenues de l'ACTH (Spat, 1988; Gallo-Payet and Payet, 2003). Le premier indice de l'implication d'autres médiateurs intracellulaires dans le mécanisme d'action de l'ACTH vient du fait que l'ACTH peut stimuler la stéroïdogénèse dans des conditions où aucune production d'AMPc n'est détectable (Kojima *et al.*, 1985). Par exemple, il a été rapporté que l' EC_{50} de l'ACTH pour stimuler la sécrétion d'aldostérone dans les cellules glomérulées de rat en culture est de 50 pM, alors que l' EC_{50} pour la production d'AMPc est de 10 nM (Gallo-Payet and Payet, 1989). D'autres seconds messagers tels que le Ca^{2+} et les inositols phosphates sont aussi activés par l'ACTH (Farese *et al.*, 1986; Gallo-Payet and Payet, 1989; Spat *et al.*, 1991).

1.2.1 L'AMPc : synthèse et dégradation

L'3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est un second messenger classique impliqué dans l'action de plusieurs hormones et neurotransmetteurs. Sa synthèse est catalysée grâce à l'activité lyase des ACs (AC1 à 10) membranaires (Hanoune and Defer, 2001) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) (Figure 5). Les RCPGs couplés à $G\alpha_s$ (comme MC2R) stimulent l'activité des ACs, tandis que les RCPGs couplés à une protéine de type $G\alpha_i$ l'inhibe. La dégradation de l'AMPc est catalysée par des protéines cytoplasmiques nommées phosphodiésterases (PDE) (EC 3.1.4.1) spécifiques pour l'AMPc. Le produit de l'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs est l'adénosine 5'-monophosphate (AMP) (Figure 5). Certaines PDEs sont spécifiques pour l'AMPc (PDE4,

7 et 8) et certaines peuvent aussi hydrolyser le 3',5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (PDE1, 2, 3, 10 et 11). Ainsi, certaines mutations des isoformes PDE8B et PDE11A sont impliquées dans l'hyperplasie surrénalienne (Horvath *et al.*, 2006b; Horvath *et al.*, 2008a; Stratakis, 2009).

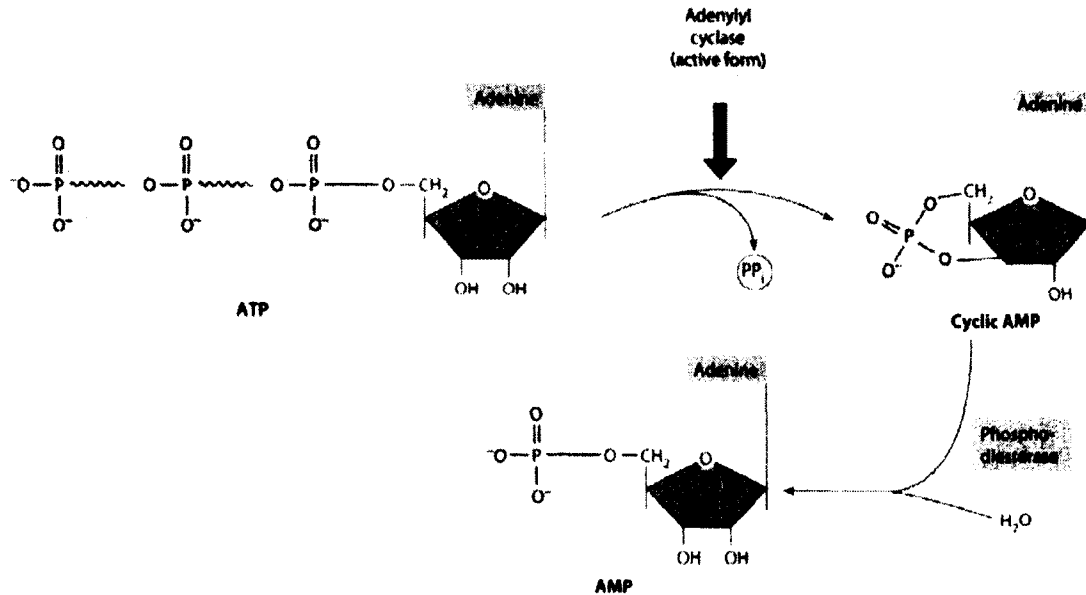


Figure 5. Synthèse et hydrolyse de l'AMPc.
(Copyright de Pearson Education Inc.)

La production d'AMPc peut être stimulée par des ligands tels que des odeurs, des peptides, des hormones (comme l'ACTH), des ions ou encore des lipides extracellulaires qui lient de façon spécifique certains RCPGs couplés aux protéines $G\alpha_s$. À l'inverse, certains signaux extracellulaires peuvent lier des RCPGs couplés aux protéines $G\alpha_i$ et peuvent donc inhiber ou réduire la production d'AMPc (Figure 6).

1.2.2 L'AMPc : ses cibles et effecteurs

La cible la mieux connue de l'AMPc est la PKA. La PKA est un holoenzyme tétramérique constituée de deux sous-unités catalytiques (C) et de deux régulatrices (R), globalement R_2C_2 . Les sous-unités R servent de pseudo-substrat aux sous-unités C et bloquent ainsi le site catalytique. Tout comme certains inhibiteurs de la PKA (ex : Rp-

cAMP), l'AMPc se lie à des sites spécifiques des sous-unités R de la PKA, ce qui dissocie les sous-unités R des sous-unités C et ainsi permet l'activité catalytique de la PKA de prendre place sur diverses cibles. D'autres inhibiteurs comme le H89 agissent comme pseudo-substrats et bloquent plutôt le site catalytique des sous-unités C. Les cibles de la PKA comprennent certaines ACs, PDEs, canaux ioniques, des facteurs de transcriptions et d'autres substrats membranaires ou cytoplasmiques (Figure 6). Chez l'humain, les mutations de PRKAR1A (PKA regulatory subunit 1A ou RI α) sont impliquées dans les carcinomes surrenaliens comme la maladie cortico-surrénalienne nodulaire pigmentée primaire, le syndrome de Cushing et dans le complexe de Carney (Kirschner *et al.*, 2000; Groussin *et al.*, 2002; Stratakis, 2009). L'équilibre des sous-unités de la PKA est critique pour le contrôle de la signalisation de l'AMPc (basale et stimulée) et aux modifications liées à la prolifération cellulaire (Nesterova *et al.*, 2008). La PKA est aussi soumise à une régulation spatiale par les «*A-kinase anchoring proteins*» qui permettent d'établir des liens physiques entre plusieurs protéines (PKA, PDEs, phosphatases, etc) et leurs cibles (canaux ioniques, PKC, MAPK) afin de les localiser dans des micro-domaines intracellulaires et ainsi réguler finement les fonctions cellulaires (Coghlan *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2004; Malbon *et al.*, 2004; Wong and Scott, 2004; Szaszak *et al.*, 2008).

Une défectuosité de la voie de signalisation AMPc-PKA est la voie moléculaire principale qui conduit à des tumeurs surrenaliennes bénignes et hyperplasies (Rosenberg *et al.*, 2002; Stratakis, 2009). Il est notamment plus fréquent d'observer des hyperplasies surrenaliennes dues à l'expression ectopique d'ACTH par des tumeurs, à l'expression illégitime de RCPGs, aux mutations de *Gas*, de PDEs ou de PRKAR1A (Lacroix *et al.*, 1992; Lebrethon *et al.*, 1998; N'diaye *et al.*, 1998; Willenberg *et al.*, 1998; Lacroix *et al.*, 2001; Groussin *et al.*, 2002; Mune *et al.*, 2002; Rosenberg *et al.*, 2002; Horvath *et al.*, 2006a; Vezzosi *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2008a; Horvath *et al.*, 2008b; Lacroix *et al.*, 2009) (Figure 7), que par des mutations activatrices du récepteur de l'ACTH, MC2R (section 1.6) (Latronico *et al.*, 1995; Light *et al.*, 1995).

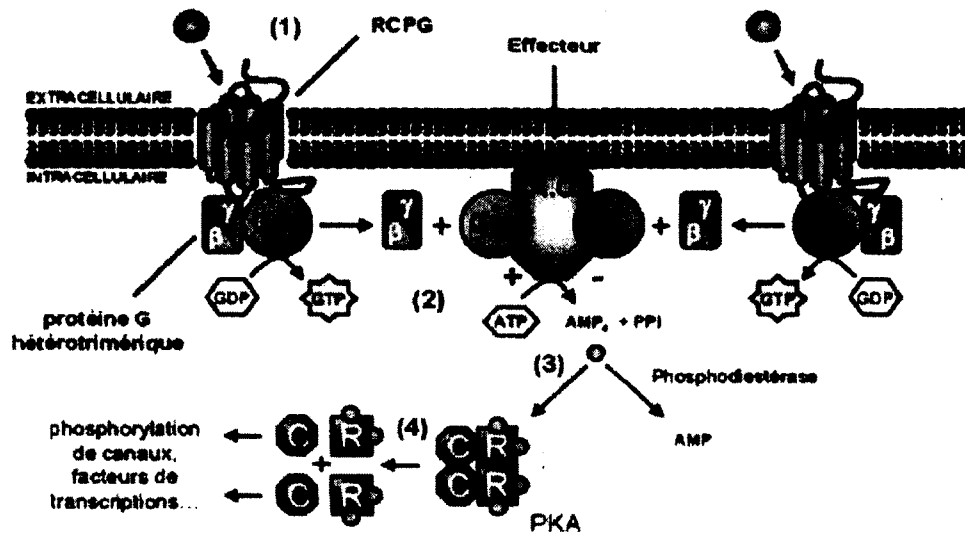


Figure 6. Stimulation de la production d'AMPc par des ligands extracellulaires. (1) Liaison du ligand à son RCPG. (2) Couplage aux protéines G et découplage de la sous-unité α_s . (3) Production d'AMPc par les ACs. (4) Activation de PKA lorsque l'AMPc lie les sous-unités R (régulatrices) et relâche des sous-unités C (catalytiques). Inspiré de Cabrera-Vera et al., 2003.

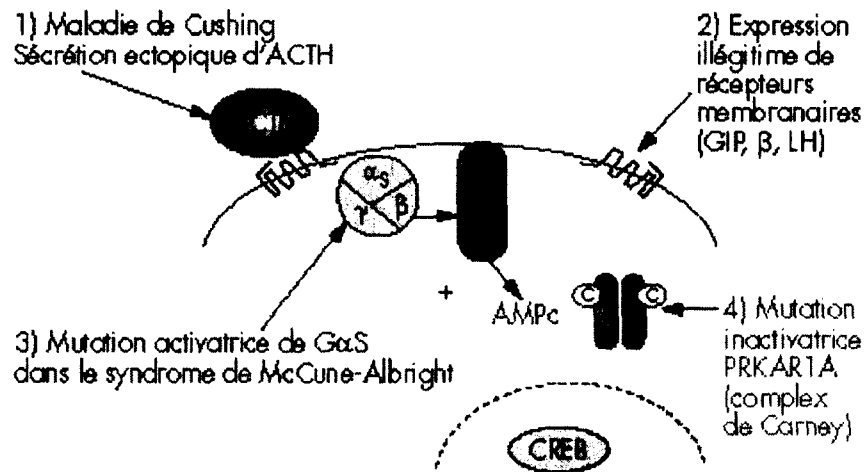


Figure 7 Anomalies de la voie de l'AMPc et syndrome de Cushing. Les différentes anomalies touchant la voie de signalisation de l'AMPc observées à ce jour dans différentes étiologies de syndrome de Cushing sont dues à 1) une sécrétion inappropriée d'ACTH dans la maladie de Cushing ou à la sécrétion tumorale ectopique d'ACTH; 2) l'expression exagérée (surexpression ou expression ectopique) de récepteurs membranaires de type RCPG (GIP, β -adrénergique, LH ou autres RCPGs couplés à G_s); 3) des mutations activatrices de la protéine G_s; 4) des mutations inactivatrices de (PRKAR1A). Tiré et traduit de (Rosenberg *et al.*, 2002).

1.2.3 L'AMPc : ses effets sur les cellules

L'AMPc exerce une action complexe sur la prolifération et l'hypertrophie cellulaire (Roger *et al.*, 1995). Alors que dans de nombreux tissus l'AMPc inhibe la prolifération cellulaire, dans certains tissus endocriniens comme la thyroïde, les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure et dans les cellules de la ZF de la glande surrénale, il exerce au contraire un effet prolifératif et souvent hypertrophique, ce qui peut mener à une augmentation du volume des glandes. L'activation de la voie de signalisation de l'AMPc est nécessaire, de la membrane cellulaire jusqu'au noyau, pour le développement et/ou la prolifération de ces tissus endocriniens (Roger *et al.*, 1995).

Dans la ZF de la glande surrénale, les analogues de l'AMPc (ex : 8-Br-AMPc) et la stimulation de la production d'AMPc par la forskoline (FSK; un activateur spécifique des ACs) ou par l'ACTH (*via* MC2R) entraînent tous une activation et une relocalisation de la PKA (Liu *et al.*, 2006; Poderoso *et al.*, 2008). Lorsque transloquée au niveau du noyau, la PKA phosphoryle certains facteurs de transcription régulant l'expression des gènes sensibles à l'AMPc. Le facteur de transcription CREB (*cAMP response element binding protein*) est un des exemples les mieux étudiés des cibles nucléaires de la PKA. Cette action de PKA permet l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la stéroïdogénèse comme entre autres la 21-hydroxylase, la 11 β -hydroxylase et la 3 β -HSD (Vinson *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004). Au niveau des mitochondries, l'un des rôles importants de la PKA est de phosphoryler la protéine StAR pour permettre l'entrée du cholestérol dans les mitochondries (Stocco, 1997; Hauet *et al.*, 2002; Spat and Hunyady, 2004).

1.2.4 L'AMPc : contrôle de sa production par l'ACTH

Dans les ZF et ZG, la stimulation du récepteur de l'ACTH entraîne une production d'AMPc intracellulaire accrue et soutenue qui permet la synthèse et la sécrétion de glucocorticoïdes ou d'aldostérone respectivement (Lefkowitz *et al.*, 1970; Koritz *et al.*, 1977; Saez *et al.*, 1984). Il est reconnu que dans les cellules corticosurréaliennes, la production soutenue d'AMPc est due en partie à une activation séquentielle de différentes

ACs. En effet, les isoformes sensibles au Ca^{2+} (AC1/3), les ACs insensibles au Ca^{2+} (AC5/6) et les isoformes modulées par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines Gi (AC2 et AC4) sont exprimées à la fois dans la ZF et dans la ZG de glandes surrénales humaines (Côté *et al.*, 2001) et de rat (Shen *et al.*, 1997). Selon Côté *et al.*, l'ACTH activerait tout d'abord les cyclases AC5/6, par la suite activerait AC1/AC3 (AC3 seulement dans la ZF) et finalement AC2/AC4 (Côté *et al.*, 2001) par l'entremise tardive d'un couplage de MC2R à une protéine Gi. L'activation de différentes isoformes des ACs induit des augmentations des niveaux d'AMPc selon des cinétiques séquentielles résultant ainsi en une production d'AMPc soutenue (Gallo-Payet and Payet, 2003) (Figure 8). Ce mécanisme pourrait être différent entre la ZF et la ZG.

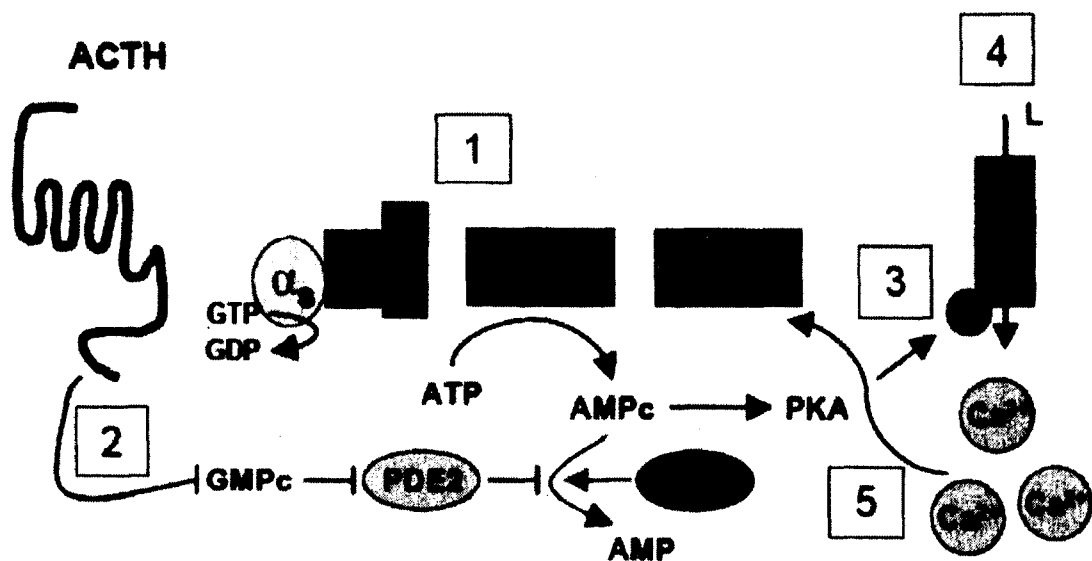


Figure 8. Mécanisme d'action de l'ACTH – régulation de la production d'AMPc. L'ACTH induit une production d'AMPc via la protéine Gs et activation des AC5/6 insensibles au Ca^{2+} (1). Parallèlement (dans la ZG), la production de GMPc est inhibée et entraîne une inhibition de l'activité de la PDE2 (2). L'AMPc est plutôt dégradé par la PDE3. L'AMPc généré active la PKA qui phosphoryle les canaux calciques de type L (3) et permet un influx de Ca^{2+} (4). Finalement, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire a pour effet d'activer les AC1/3 qui sont sensibles au Ca^{2+} (5). L'activation séquentielle des ACs de concert avec l'inhibition de la PDE2 (dans la ZG) sont responsables de l'accumulation importante d'AMPc dans les cellules corticosurrénales. Schéma intégratif basé sur les travaux de (Gallo-Payet *et al.*, 1996; Côté *et al.*, 1999; Gallo-Payet *et al.*, 1999; Côté *et al.*, 2001; Gallo-Payet and Payet, 2003).

Dans la ZG, l'ACTH induit la sécrétion d'aldostérone. La stimulation par l'ACTH de cultures primaires de cellules glomérulées de rat ou humaines provoque une diminution de la production de GMPc et par conséquent, une inhibition de PDE2 responsable de la dégradation d'AMPc (Côte *et al.*, 1999). Étant donné que PDE2 est la PDE prédominante exprimée au niveau de la glande surrénale (Sonnenburg *et al.*, 1991), son inhibition par l'ACTH contribue à la stimulation soutenue des niveaux d'AMPc dans la ZG. Dans un deuxième temps, une forte augmentation des niveaux d'AMPc active la PDE3 ce qui permet un contrôle négatif sur les niveaux d'AMPc intracellulaire et en même temps termine le signal induit par l'ACTH (Côte *et al.*, 1999) (Figure 8).

1.2.5 Le calcium

Plusieurs travaux ont rapporté le rôle crucial du Ca^{2+} dans les sécrétions d'aldostérone ou de corticostérone induites par l'ACTH dans les cellules de la ZG de rat (Neher and Milani, 1978; Fakunding *et al.*, 1979; Kojima *et al.*, 1985; Schiebinger *et al.*, 1985). La hausse intracellulaire de la concentration de Ca^{2+} affecte la distribution cellulaire de StAR, du cytochrome P450_{scc} et de la 3β -HSD, trois enzymes clés de la stéroïdogénèse (Cherradi *et al.*, 1997).

Ainsi, certains auteurs ont attribué aux ions Ca^{2+} le rôle de « second » second messenger de l'ACTH (Schiebinger *et al.*, 1985). Cependant, dans la plupart des études réalisées les auteurs décrivent la nécessité du Ca^{2+} extracellulaire pour enclencher la stéroïdogénèse, lui donnant alors le rôle de premier second messenger. Certaines études indiquent que le Ca^{2+} est nécessaire pour la liaison de l'ACTH à son récepteur (Cheitlin *et al.*, 1985), alors que d'autres ne l'ont pas confirmé (Lefkowitz *et al.*, 1970; Gallo-Payet *et al.*, 1996). Les travaux effectués par plusieurs groupes avec des cellules de la ZG de rat ou de bœuf ont montré que le Ca^{2+} provient du milieu extracellulaire, grâce à une dépolarisation de la membrane plasmique induite par l'inhibition des canaux K^+ et par la phosphorylation PKA-dépendante des canaux calciques voltage-dépendants de type L induite par l'ACTH (Kojima *et al.*, 1985; Payet *et al.*, 1987; Durroux *et al.*, 1991; Spat *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, 1991; Gallo-Payet *et al.*, 1996) (Figure 8). D'autres ont décrit

que la sécrétion de corticostérone par la ZF, impliquait plutôt la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, et non pas l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire (Schiebinger *et al.*, 1985). Globalement, il est bien accepté que le Ca^{2+} est surtout nécessaire pour la ZG et sa sécrétion d'aldostérone induite par l'Ang II ou par l'ACTH, plutôt que dans la sécrétion de glucocorticoïdes par l'ACTH dans la ZF.

1.2.6 Inositols phosphates

Quelques études ont montré que l'ACTH induit aussi la production d'inositols phosphates et que cette production n'est pas liée à la libération de Ca^{2+} intracellulaire (Farese *et al.*, 1986; Gallo-Payet *et al.*, 1999; Gallo-Payet and Payet, 2003). Par exemple, la préincubation avec le U73122, un inhibiteur de PLC, réduit la sécrétion d'aldostérone et les concentrations d' IP_3 induites sont si faibles qu'il a été suggéré que leur production serait plutôt assurée par le diacylglycérol, la PKC (Cozza *et al.*, 1990) ou les sous-unités $\beta\gamma$ d'une protéine G_i , plutôt que par G_q et les PLCs (Chorvátová *et al.*, 2000; Côté *et al.*, 2001).

1.3 Le récepteur de l'ACTH, MC2R.

1.3.1 Famille des récepteurs aux mélanocortines (MCR).

Clonés en 1992, les MCRs (récepteurs aux mélanocortines; *melanocortin receptors*) appartiennent à la grande famille des RCPGs (Mountjoy *et al.*, 1992 ; Cone, 2000). Ils lient tous des peptides dérivés de la POMC (Figure 9). La stimulation de tous les MCRs par les dérivés de la POMC, l'ACTH et les MSHs, entraîne le couplage positif à la production d'AMPc *via* les protéines G hétérotrimériques et les ACs (Abdel-Malek, 2001; Gantz and Fong, 2003; Dores, 2009). Plusieurs caractéristiques distinguent les MCRs des autres RCPGs (Wikberg *et al.*, 2000; Schioth, 2001; Schioth *et al.*, 2003). Parmi les MCRs, on compte premièrement MC1R (Garcia-Borron *et al.*, 2005), le récepteur impliqué dans la pigmentation de la peau et des poils chez l'homme et les mammifères (Cone *et al.*, 1996). MC2R est le plus petit RCPG humain connu (297 aa,

masse moléculaire prédite de 33 kDa) (Penhoat *et al.*, 1993; Clark, 2000a) et est surtout exprimé au niveau des glandes surrénales afin de permettre la stéroïdogénèse (Bégeot and Saez, 2000; Clark, 2000b ; Chida *et al.*, 2007). Parmi les autres membres, les récepteurs MC3R et MC4R sont associés à la régulation de la prise alimentaire (MC4R), du métabolisme lipidique et de la dépense énergétique (MC3R) (Cone, 1999; Schwartz *et al.*, 2000; Schioth, 2001; Harmer and Bicknell, 2004; Butler, 2006) et autres fonctions reliées à la dépression, l'anxiété et le comportement sexuel (Van Der Ploeg *et al.*, 2002; Pfaus *et al.*, 2004; Chaki and Okuyama, 2005). MC5R quant à lui est aussi exprimé dans les glandes surrénales où son rôle reste moins bien défini. MC5R a été montré comme étant important dans le développement des glandes sébacées (Zhang *et al.*, 2006) et dans l'immunité oculaire (Taylor *et al.*, 2006). Certains MCRs sont impliqués dans la formation des os, dans les fonctions sexuelles, la peur et la perception de la douleur (Rossler *et al.*, 2006; Wikberg and Mutulis, 2008; Dawson, 2010; Delaney *et al.*, 2010). Certains MCRs sont donc impliqués dans plusieurs systèmes physiologiques importants (Table 1). En plus de leurs agonistes naturels (mélanocortines), les MCRs possèdent aussi des antagonistes naturels, l'agouti et l'«*agouti-related protein*» (Abdel-Malek, 2001). Ceux-ci sont maintenant connus comme étant des agonistes inverses pour MC1R, MC3R, MC4R et MC5R, mais pas pour MC2R (Chai *et al.*, 2003).

Du côté de la structure primaire de l'ACTH, en plus du motif HFRW commun à toutes les melanocortines, le motif KKRRP dans ACTH semble être indispensable à la liaison de ACTH sur MC2R (Veo *et al.*, 2011).

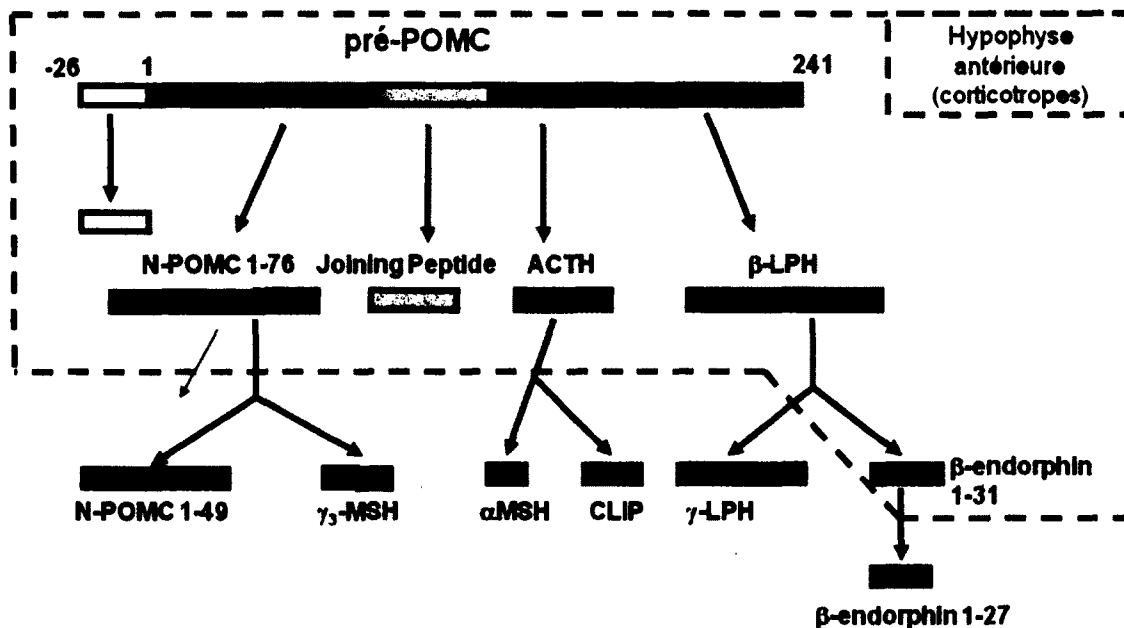


Figure 9. Clivage de la POMC en mélanocortines et en endorphines. La synthèse et le clivage de la POMC en ACTH s'effectue au niveau des cellules corticotropes de l'adénohypophyse en réponse au CRH provenant de l'hypothalamus (section 1.1.5). Le schéma montre les produits dérivés de la POMC tel que retrouvés dans plusieurs régions du cerveau. Simplifié de (Raffin-Sanson *et al.*, 2003).

Tableau 2. Agonistes naturels et distributions tissulaires des MCRs.

Type de récepteur	Agonistes endogènes	Distribution tissulaire
MC1R	α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH	mélanocytes, cellules immunitaires (monocytes, neutrophils), cellules endothéliales, cellules de Sertoli
MC2R	ACTH	cortex surrénalien >> adipocytes, peau
MC3R	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	SNC - hypothalamus, thalamus, hippocampe, amygdale antérieure périphérie - myocarde, estomac, duodénum, placenta
MC4R	α -MSH = ACTH > β -MSH >> γ -MSH	cortex, thalamus, hypothalamus, tronc cérébral
MC5R	α -MSH > ACTH = β -MSH >> γ -MSH	tissus périphériques - peau, glande surrénale, moëlle osseuse, thymus, muscle squelettique, testicules, ovaires, poumons, thyroïde, estomac, rein, glandes exocrines SNC - cortex, cerebellum

D'après (Cone *et al.*, 1996; Cone, 2000; Abdel-Malek, 2001; Schioth, 2001; Butler and Cone, 2002; Dore, 2009; Cooray and Clark, 2010).

1.3.2 Structure des MCRs

Selon le «GPCR database» (GPCRDB; <http://www.gpcr.org/7tm>) et selon leurs propriétés structurales, la nature peptidique de leurs ligands et selon des analyses phylogénétiques, les MCRs appartiennent la classe A «rhodopsin-like» et à la sous-classe A12 des RCPGs, tout comme le β_2 AR (sous-classe A17) et le AT₁R (sous-classe A3).

Les séquences des MCRs possèdent 40-60% d'homologie et présentent certaines caractéristiques représentatives des RCPGs de classe A. Leurs structures primaires sont parmi les plus petites des RCPGs et varient de 297 et 360 aa comparativement à 413 pour le β_2 AR par exemple. Ils possèdent des sites de N-glycosylation dans leurs domaines N-terminaux, leurs parties C-terminales possèdent également au moins une Cys qui, pour plusieurs RCPGs, permet la palmitoylation qui peut servir à l'ancrage des domaines C-terminaux aux membranes. Parmi les éléments structuraux conservés des RCPGs de classe A, notons le motif (D/E)RY, situé à l'interface du second domaine transmembranaire (TM2) et de la 2^e boucle intracellulaire (Arora *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2002; Yamano *et al.*, 2004). Le motif DPxxY, situé à l'interface du 7^e domaine transmembranaire et de la partie C-terminale, est aussi une structure conservée entre la plupart des RCPGs et les MCRs. Comme la plupart des RCPGs, les MCRs possèdent des sites de phosphorylation compatibles pour une phosphorylation par PKA et par PKC (Kennelly and Krebs, 1991). Ces sites sont situés au niveau de leurs boucles intracellulaires.

Les MCRs présentent quelques particularités uniques parmi les RCPGs. Par exemple, les MCRs ne possèdent pas de Cys dans leurs boucles extracellulaires 1 et 2 qui, pour de nombreux RCPGs, permettent la formation de ponts disulfures. De plus, les alignements comparatifs avec les autres RCPGs ont montré que les MCRs possèdent des domaines N- et C-terminaux, ainsi que des deuxième boucles extracellulaires, plus courtes. Globalement, les MCRs possèdent des structures primaires essentiellement similaires entre elles, mais pour lesquelles les distributions tissulaires, les propriétés pharmacologiques et les rôles physiologiques sont très différents (Wikberg *et al.*, 2000;

Schioth, 2001; Schioth *et al.*, 2003) (Table 1). Le MC2R est le moins étudié des MCRs à cause des difficultés à l'exprimer dans un modèle cellulaire hétérologue (section 2.1)

1.3.3 MC2R, le «récepteur de l'ACTH»

L'ACTH possède une haute affinité pour tous les MCRs. Cependant, et contrairement aux autres MCRs, MC2R n'est sélectif que pour l'ACTH (Wikberg *et al.*, 2000 ; Schioth, 2001; Schioth *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2007) (Figure 10). Son domaine N-terminal extracellulaire et sa 3^e boucle intracellulaire (qui contient normalement des sites de phosphorylation) sont différents des autres MCRs en terme de structure primaire, ce qui pourrait expliquer sa sélectivité pour l'ACTH et suggère une régulation fonctionnelle différente des autres MCRs.

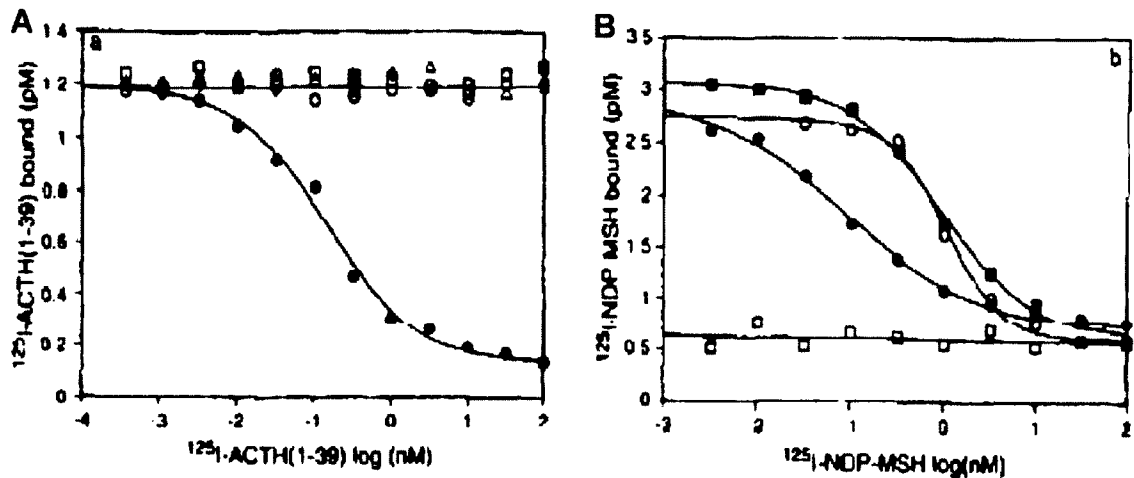


Figure 10. Propriétés de liaison des MCRs envers l'ACTH et les MSHs. A) Liaison de l'ACTH sur les cellules de corticosurrénales tumorales de souris Y1. Les cellules ont été incubées avec 60 pM d' ^{125}I -ACTH(1-39) en présence de différentes concentrations d'ACTH (1-39) (cercles noirs), d' α -MSH (carrés blancs), de β -MSH (cercles blancs), de γ 1-MSH ou de NDP-MSH (losanges blancs). B) Effet du NDP-MSH à différentes concentrations sur la liaison du ^{125}I -NDP-MSH dans les cellules Y1 natives (carrés blancs) ou transfectées avec MC1R (cercles noirs), MC3R (carrés noirs) ou MC4R (cercles blancs). Traduit de (Schioth *et al.*, 1996).

Le gène du MC2R humain a été localisé à l'extrémité distale du bras court du chromosome 18 (18p11.2) (Gantz *et al.*, 1993). Le gène est constitué de deux exons séparés par un large intron de 1.8 kb. Le premier exon de 49 pb contient le site d'initiation de la transcription, tandis que l'exon 2 comprend la séquence codante pour le MC2R (Naville *et al.*, 1994).

Cloné en 1992 en même temps que MC1R (Chhajlani and Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992), MC2R est exprimé principalement dans le cortex surrénalien (Mountjoy *et al.*, 1992; Mountjoy *et al.*, 1994; Cammas *et al.*, 1995; Liakos *et al.*, 1998). Bien avant le clonage de MC2R, plusieurs études ont été effectuées sur la caractérisation de sites de liaisons pour l'ACTH dans les glandes surrénales. Lefkowitz *et al.* avaient utilisé l'ACTH 1-39 iodé sur la Tyr2 pour déterminer le liaison de l'ACTH à son récepteur et avait montré sa capacité à induire une production d'AMPc dans les membranes de cellules corticosurrénales (Lefkowitz *et al.*, 1970). Cependant, un niveau de liaison non-spécifique non-négligeable a été rapporté et le niveau de stimulation de la production d'AMPc était faible. En effet, la présence du volumineux atome d'iode sur la Tyr2 diminuait l'activité biologique de l'ACTH radioactive (Lowry *et al.*, 1973). De plus, la Met4 avait tendance à s'oxyder rapidement au cours de la réaction d'iodation (Rae and Schimmer, 1974). La solution à ces difficultés a été de substituer la Tyr2 par une Phe et de substituer la Met4 par une nor-Leu de l'ACTH 1-39 et d'ioder la Tyr23. Ainsi, en utilisant le peptide (Phe2, Nle4)-ACTH1-39 mono-marqué sur la Tyr23, les études effectuées sur des membranes et des cellules surrénales de plusieurs espèces ont mis en évidence deux types de liaisons spécifiques - un de haute affinité (10 pM) et l'autre de plus faible affinité (10 nM) (Buckley *et al.*, 1981; Cheitlin *et al.*, 1985; Gallo-Payet and Escher, 1985; Penhoat *et al.*, 1989). L'identité de ces sites ainsi que leurs importances physiologiques demeurent controversées. En effet, il n'est pas connu à quoi ces différents sites de liaisons sont attribuables. Par contre, il est possible que des protéines accessoires en soient responsables (sections 1.7 et 3.1). Ce n'est qu'après son clonage que MC2R a été désigné «récepteur de l'ACTH» car des études ont montrées que MC2R ne liait que l'ACTH et pas les hormones stimulant les mélanocytes (MSHs) (Schioth *et al.*, 1996; Abdel-Malek, 2001) (Figure 10).

1.4 Régulation fonctionnelle des RCPGs

1.4.1 Rôle de la phosphorylation dans la régulation fonctionnelle des RCPGs

La phosphorylation des RCPGs est souvent impliquée dans l'inactivation fonctionnelle du récepteur (Ferguson, 2001; Kohout and Lefkowitz, 2003; Ren *et al.*, 2005). Celle-ci s'opère en trois grandes étapes: 1) la désensibilisation du récepteur, son internalisation et sa régulation négative. Le découplage fonctionnel du récepteur de la protéine G hétérotrimérique est causé par la phosphorylation rapide (secondes ou minutes) du récepteur par des kinases spécifiques des récepteurs activés (*GPCR kinase*; GRK) (désensibilisation homologue) ou encore par des kinases dépendantes des seconds messagers (PKA et PKC) (désensibilisation hétérologue), suivie rapidement du recrutement de protéines cytosoliques nommées arrestines qui bloquent encore mieux le couplage aux protéines G. Ensuite survient l'internalisation du récepteur dans des compartiments intracellulaires (minutes), et finalement une régulation négative (*down-regulation*) du nombre de récepteurs à la membrane cellulaire (heures) (Ferguson, 2001; Kohout and Lefkowitz, 2003; Ren *et al.*, 2005). L'inactivation des récepteurs (désensibilisation et internalisation) nécessite également dans la plupart des cas la liaison de la protéine arrestine au récepteur activé causant un découplage physique du RCPG de sa protéine G (Kohout and Lefkowitz, 2003) (Figure 11).

Après leur désensibilisation et leur internalisation, les RCPGs sont acheminés vers différents compartiments intracellulaires. Certains récepteurs sont dirigés vers la voie de dégradation, tandis que d'autres sont recyclés à la surface cellulaire (Ferguson *et al.*, 1998a). Les voies d'internalisation les plus connues sont la voie clathrine-dépendante et la voie cavéolae-dépendante (Wikberg *et al.*, 2000; Chini and Parenti, 2004; Le Roy and Wrana, 2005). La voie clathrine-dépendante est la plus fréquente et la mieux documentée. Premièrement, les GRKs (Ren *et al.*, 2005; Sanchez-Mas *et al.*, 2005a) les protéines AP2 et les arrestines (Laporte *et al.*, 1999; Claing *et al.*, 2002; Lefkowitz and Shenoy, 2005; Shenoy and Lefkowitz, 2005c; Shenoy and Lefkowitz, 2005a; Shenoy and Lefkowitz, 2005b) acheminent les récepteurs dans les puits de clathrine. Ensuite, la formation des

puits tapissés de clathrine (Rapoport *et al.*, 1997) implique une activité et des interactions coordonnées de plusieurs protéines comme la dynamine (Song and Schmid, 2003), et les GTPases Rabs (Seachrist *et al.*, 2000; Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000; Zerial and McBride, 2001; Claing *et al.*, 2002; Seachrist and Ferguson, 2003; Dale *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2007; Parent *et al.*, 2009) (Figure 11).

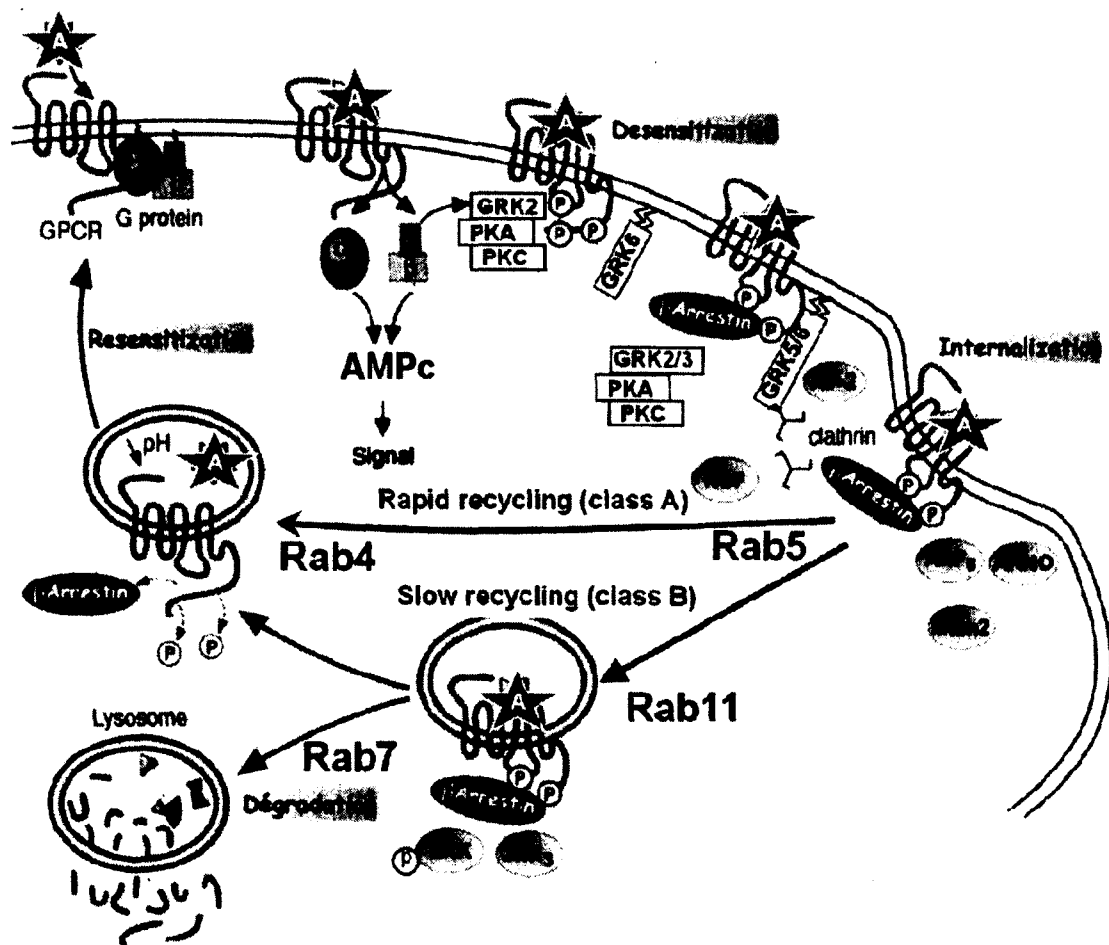


Figure 11. Désensibilisation, internalisation, dégradation et recyclage des RCPGs. L'étoile A représente un agoniste pour le RCPG illustré. Les cercles P représentent des résidus S/T phosphorylés. Adapté de (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

1.4.2 Trafic intracellulaire des RCPGs internalisés

Après leur internalisation induite par leurs agonistes respectifs, les RCPGs sont acheminés vers différents compartiments intracellulaires. Certains récepteurs sont dirigés vers une voie de dégradation, tandis que d'autres sont recyclés et resensibilisés à la surface cellulaire où ils peuvent être utilisés pour une nouvelle stimulation. La resensibilisation a été décrite pour la première fois pour le β_2 AR (Yu *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997). La resensibilisation exige que les RCPGs soient déphosphorylés par des phosphatases lors de leur parcours dans les endosomes. La déphosphorylation a lieu dans des compartiments endosomaux où le pH est acide (Krueger *et al.*, 1997), ce qui facilite l'activité des phosphatases comme la phosphatase de type 2A (Pippig *et al.*, 1995). Le récepteur déphosphorylé retourne alors dans sa conformation inactive, est donc resensibilisé et peut regagner la membrane plasmique à l'état fonctionnel grâce à certaines protéines impliquées dans le transport des endosomes.

1.4.3 Les arrestines

La phosphorylation en soi n'est pas toujours suffisante pour induire une inactivation complète des RCPGs. Une recherche intense de la protéine responsable de la désensibilisation totale des RCPGs a permis l'identification de l'arrestine visuelle et ensuite du clonage subséquent des autres membres de la famille (Craft and Whitmore, 1995). Six arrestines ont été identifiées et divisées en quatre sous-groupes en fonction de l'homologie de séquence et de la distribution tissulaire. L'arrestine visuelle (ou antigène S) a été la première découverte dans les bâtonnets de la rétine et lie la rhodopsine (récepteur de la lumière) (Kuhn *et al.*, 1984). Les β -arrestines 1 et 2, aussi appelées arrestine 2 et arrestine 3 (abréviées arr2 et arr3), ont été ainsi appelées à cause de leur rôle dans la désensibilisation du β_2 AR (Lohse *et al.*, 1990; Attramadal *et al.*, 1992). Ces dernières sont exprimées de façon ubiquitaire. L'arrestine-C (ou arrestine 4 et arrestine-X) est retrouvée dans les cellules en cône de l'oeil (Murakami *et al.*, 1993; Craft *et al.*, 1994). Finalement, l'arrestine-D et l'arrestine-E sont peu caractérisées (Craft *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1998b).

Le rôle des arrestines dans la désensibilisation consiste en leur liaison au récepteur activé et phosphorylé par les GRKs. Ainsi, l'arrestine permet un découplage physique du RCPG de sa protéine G en empêchant leur contact par ses effets stériques (Kohout and Lefkowitz, 2003) et en permettant la liaison avec la clathrine (Goodman *et al.*, 1996) avec l'aide de protéines nommées AP2. Les arrestines sont des protéines cytosoliques qui se trouvent phosphorylées dans l'état inactif. Dans le cas des différents RCPGs, les arrestines coopèrent avec les GRKs et/ou les kinases dépendantes des seconds messagers pour assurer leur désensibilisation (Lefkowitz, 1998; Claing *et al.*, 2002; Kohout and Lefkowitz, 2003).

1.4.3.1 Signalisation secondaire des RCPGs internalisés:

L'initiation de la croissance cellulaire (prolifération et synthèse protéique/hypertrophie) nécessite l'activation des voies MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*), principalement de p44/p42^{mapk} aussi appelées ERK1/2. L'activation de ces cascades par des RCPG, peut se faire directement *via* le couplage aux protéines G (Tian *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999) en activant indirectement des récepteurs de facteurs de croissance ou encore par le recrutement de molécules telles que Src par l'entremise de PKC (Linseman *et al.*, 1995; Luttrell *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2004). De nouveaux mécanismes d'activation des voies MAPK (ERK1/2, JNK, p38) sont maintenant bien acceptées (Lefkowitz and Shenoy, 2005; Shenoy and Lefkowitz, 2005c). Ces mécanismes font intervenir les mêmes arrestines qui servent normalement à découpler définitivement les RCPG des protéines G et à initier leur internalisation (Oakley *et al.*, 1999; Oakley *et al.*, 2001). Les RCPGs couplés aux arrestines peuvent former des modules de signalisation alternative vers les voies MAPKs (Luttrell *et al.*, 2001 ; Le Roy and Wrana, 2005; Lefkowitz and Shenoy, 2005 ; Shenoy and Lefkowitz, 2005c). L'activation des MAPKs par les RCPGs internalisés peut mener à la survie et à la croissance cellulaire, à la motilité, à la chimiotaxie, à la réponse au stress ou encore à l'apoptose (Pierce and Lefkowitz, 2001) (Figure 12). La β -arrestine recrutée au niveau du récepteur AT₁, suite à une stimulation avec l'Ang II, est nécessaire à la production d'aldostérone *in vitro* et *in vivo* (Lympelopoulos *et al.*, 2009), et à induire la formation de fibres de stress dans les cellules HEK293 par l'entremise de Gq et de RhoA, une petite GTPase (Barnes *et al.*,

2005). Dans la surrénale de rat, l'Ang II stimule ERK1/2 et p38 (Otis *et al.*, 2005). L'ACTH active la voie p38 (Otis *et al.*, 2007) et ERK1/2 par un mécanisme peu exploré mais qui, à première vue, semble nécessiter l'internalisation de MC2R (Janes *et al.*, 2008). Il existe des ligands synthétiques pour AT₁R, conçus spécialement pour activer uniquement la voie (agoniste biaisé) des protéines G ou celle des MAPKs (Wei *et al.*, 2003; Galandrin *et al.*, 2008) ou encore, qui font varier l'efficacité à activer ces voies de signalisation (Shenoy and Lefkowitz, 2005b; Galandrin and Bouvier, 2006; Moore *et al.*, 2007).

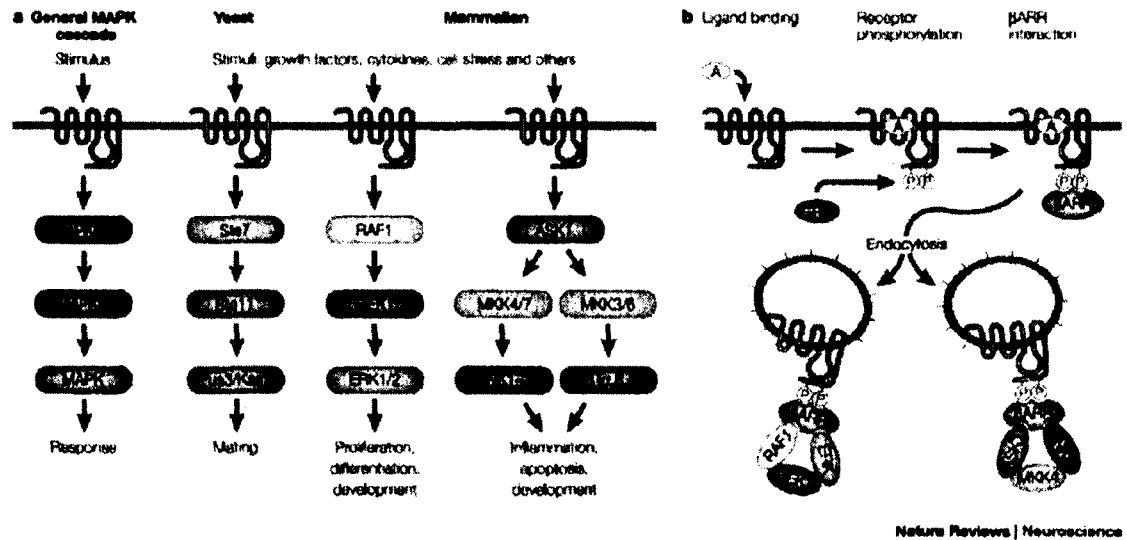


Figure 12. Signalisation secondaire des RCPGs internalisés. Tiré de (Pierce and Lefkowitz, 2001).

1.4.4 La clathrine

La voie d'internalisation des RCPGs dans les puits tapissés de clathrine (Von Zastrow and Kobilka, 1994) est un mécanisme amplement utilisé par la cellule afin d'internaliser une variété de molécules comme les nutriments, les hormones, différentes protéines et même les virus (Le Roy and Wrana, 2005). La clathrine, la constituante principale des vésicules d'endocytose, correspond à un complexe protéique composé de 3 chaînes lourdes et de 3 chaînes légères arrangées en triskélion et qui une fois polymérisées

autour d'une vésicule lipidique forment un polyédre (Brodsky *et al.*, 2001). La communication entre les différentes organelles d'une cellule est assurée par le transport vésiculaire, qui permet de transporter des molécules au sein du cytoplasme. La charpente de ces vésicules est formée par des protéines comme la clathrine qui forment une enveloppe autour de ces vésicules lipidiques (Figure 13). La clathrine est ensuite dépolymérisée lors de la fusion entre deux vésicules.

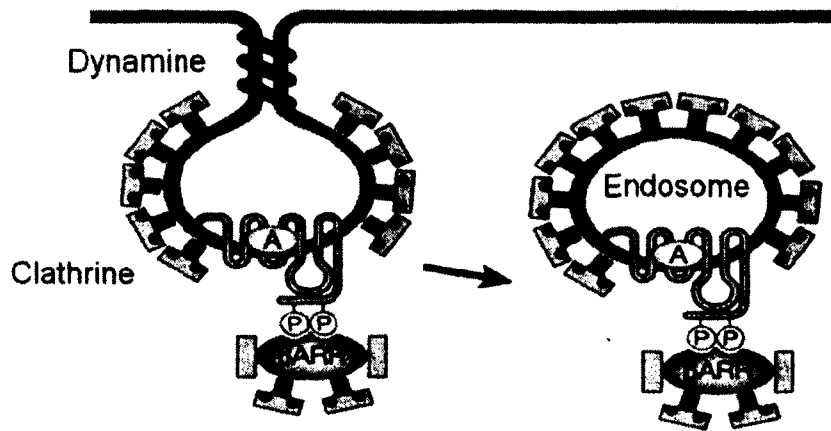


Figure 13. Internalisation clathrine et dynamine-dépendante. Le symbole A représente un agoniste pour un RCPG en question. Les symboles P représentent des résidus S/T phosphorylés par des kinases.

1.4.5 La dynamine

La scission, ou le détachement, des vésicules d'endocytose depuis la membrane plasmique des cellules est assurée par une volumineuse GTPase de 100 kDa nommée dynamine. La dynamine se retrouve autour du socle de la vésicule bourgeonnante et crée une extension de celle-ci vers le cytoplasme (Figure 13). Ceci crée une tension responsable de la séparation de la vésicule par la dynamine (Song and Schmid. 2003). Le mutant dynamine-K44A est défectueux dans son site de liaison pour le GTP et donc sa surexpression bloque l'internalisation des vésicules de clathrine (Zhang *et al.*, 1996).

1.4.6 Le rôle des Rab GTPases

Les RCPGs internalisés cheminent à travers différents compartiments intracellulaires nommés endosomes (tapissés de clathrine). Le contrôle des différentes étapes du transport vésiculaire est exercé par les protéines de la famille des GTPases Rab (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000; Zerial and McBride, 2001). La compartimentalisation des GTPases Rab au niveau de différentes organelles intracellulaires est à la base de leur capacité à guider la spécificité du transport intracellulaire. De plus, cette localisation restreinte de différents membres de la famille des Rab GTPases permet une identification précise des différentes organelles. Rab5 est localisée au niveau des endosomes précoces (*early endosomes*), ceux qui se détachent ou viennent de se détacher de la membrane plasmique. Le cargo peut ensuite quitter les endosomes précoces pour d'autres types d'endosomes. Les endosomes Rab4-positifs représentent un chemin direct pour le recyclage rapide des RCPGs (Seachrist *et al.*, 2000), tandis que les endosomes de triage (*slow perinuclear endosomes* ou *sorting endosomes*) positifs pour Rab11 sont impliqués dans le recyclage lent qui passe par les régions périnucléaires comme l'appareil de Golgi (Dale *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2009). Finalement, les récepteurs destinés à la dégradation sont transportés vers les endosomes tardifs Rab7-positifs (*late endosomes*) et ensuite vers les lysosomes (Li *et al.*, 2000). Ainsi, la diversité des voies de trafic intracellulaire rajoute un autre niveau de complexité à la régulation des RCPGs (Seachrist and Ferguson, 2003; Gaborik and Hunyady, 2004) (Figure 14).

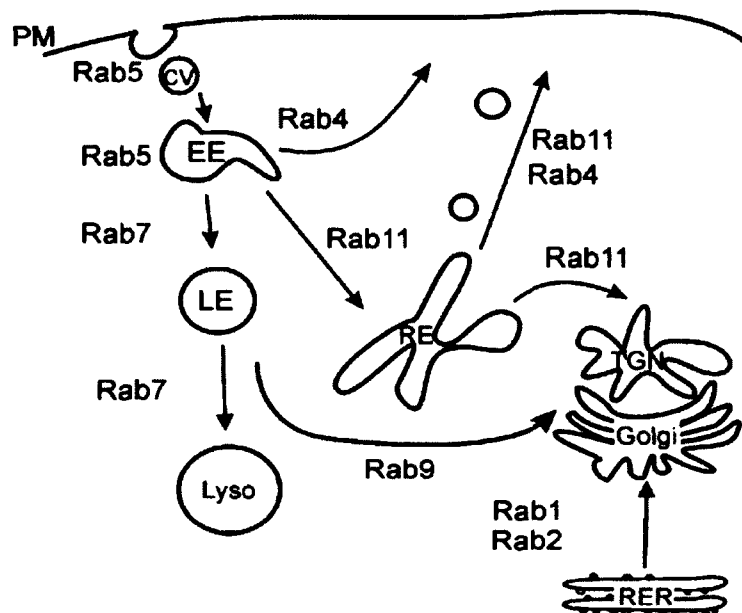


Figure 14. Trafic endosomal des récepteurs internalisés. Abréviations : (PM) membrane plasmique; (EE) *early endosomes* ou endosomes précoces; (RE) *slow perinuclear recycling endosomes* ou endosomes provenant des endosomes périnucléaires à recyclage lent; (TGN) réseau du *trans*-Golgi; (LE) *late endosome* ou endosomes tardifs; (Lyso) lysosome. Tiré de (Seachrist and Ferguson, 2003).

1.5 Régulation fonctionnelle de MC2R

1.5.1 Désensibilisation de MC2R

Comme pour d'autres RCPGs, MC2R possède des sites potentiels de phosphorylation par la PKA et par la PKC (Kennelly and Krebs, 1991) dans ses 2^e et 3^e boucles intracellulaires et dans sa région C-terminale (Figure 15). Parmi les différentes études portant sur les propriétés de liaison et la capacité du récepteur à induire la production d'AMPC (Weber *et al.*, 1993; Cammas *et al.*, 1995; Kapas *et al.*, 1996; Naville *et al.*, 1996; Naville *et al.*, 1997), un groupe a montré que MC2R de souris pouvait être désensibilisé par la PKA (Swords *et al.*, 2002) et par GRK2 (Baig *et al.*, 2001). À titre de comparaison, des travaux récents indiquent que les MC1R humain et murin subissent une

désensibilisation assurée par des GRKs (Sanchez-Mas *et al.*, 2005a). Cependant, avec MC2R humain transfecté dans les cellules M3 (mélanome de souris), notre laboratoire a observé que la PKA, mais aussi la PKC, étaient impliquées dans le phénomène de désensibilisation, et que la préincubation des cellules avec les inhibiteurs de PKA (H89) ou de PKC (GF109203X) annulait en partie cette désensibilisation (Kilianova *et al.*, 2006). Les analyses de mutagenèse dirigée ont aussi indiqué que la phosphorylation par PKA de la S208 était impliquée dans la désensibilisation de MC2R (Baig *et al.*, 2001). Ainsi, les sites de régulation et les kinases impliquées dans la désensibilisation de MC2R demeurent controversés. Ceci est largement dû à l'absence d'un modèle propice pour l'étude de la régulation fonctionnelle de MC2R (section 1.6.4).

1.5.2 Internalisation de MC2R

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la stimulation des cellules M3 transfectées avec MC2R induisait l'internalisation MC2R, suivi d'un recyclage partiel à la membrane. MC2R internalisé colocalisait avec la β -arrestine2 (arrestine3) (Kilianova *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que l'internalisation de MC2R était faible et s'accompagnait d'une diminution de 20 % de la capacité de liaison de l'ACTH iodée en 30 min dans les cellules Y1 (Baig *et al.*, 2002). Alors que dans les cellules M3 l'internalisation de MC2R semble être dépendante de l'activité de PKA (Kilianova *et al.*, 2006) d'autres travaux ont suggéré un mécanisme PKA-indépendant et plutôt GRK2-dépendant (Baig *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003). Cependant, toutes les études antérieures s'entendent pour affirmer que le mécanisme d'internalisation de MC2R et des autres MCRs a lieu dans des puits tapissés de clathrine (Baig *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2006; Kilianova *et al.*, 2006). Malgré tout, les sites de régulation et les kinases impliquées dans l'internalisation de MC2R demeurent controversés. Ceci est largement dû à l'absence d'un modèle propice pour l'étude de la régulation fonctionnelle de MC2R (section 1.6.4).

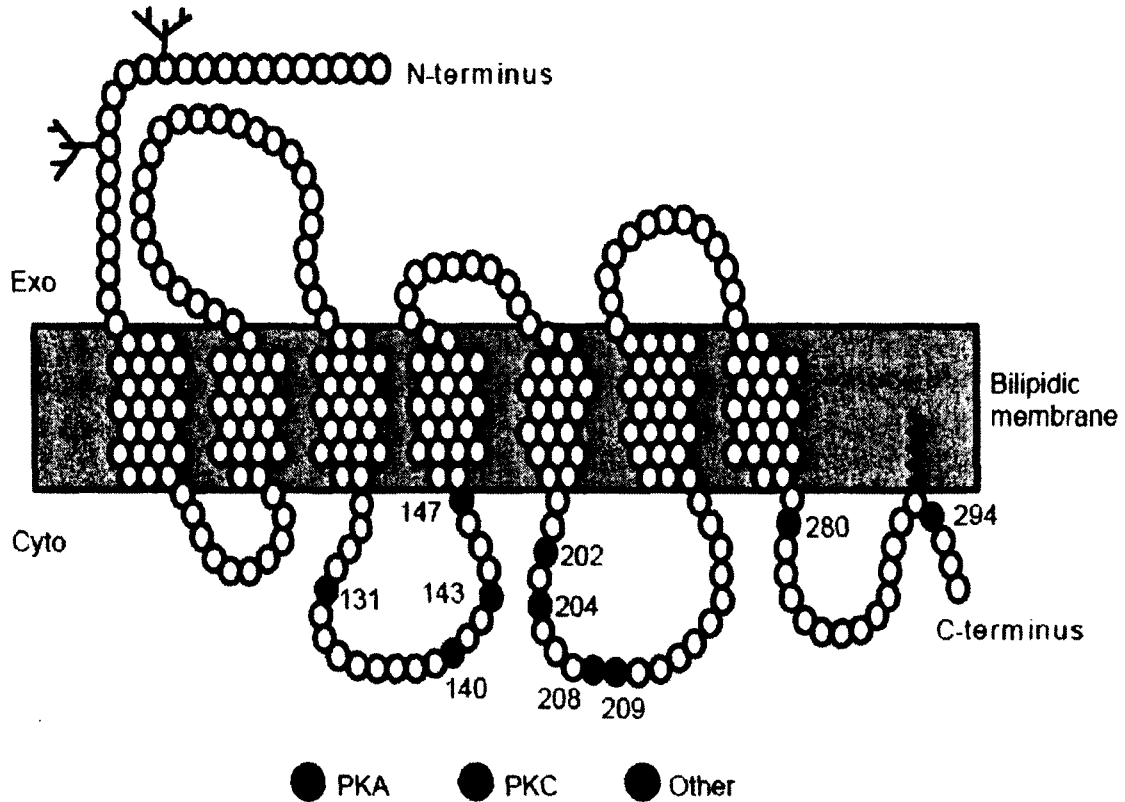


Figure 15. Structure heptahélicale de MC2R. A) Les sites de N-glycosylations sont identifiés par des arborisations et les sites de phosphorylation potentiels ainsi que les kinases pouvant en être responsables sont indiquées par des ronds de couleur. Les prédictions des sites de phosphorylation ont été faites avec NetPhosK 1.0 avec ESS filtering (www.cbs.dtu.dk/services).

1.6 Dysfonctionnement de MC2R

MC2R est considéré comme un suppresseur de tumeur, puisque la perte d'une des deux allèles du gène *MC2R* dans les tumeurs corticosurréaliennes entraîne souvent une perte de différenciation cellulaire, un trait caractéristique de la tumorigenèse qui est associée à l'expansion clonale de cellules malignes (Beuschlein *et al.*, 2001).

1.6.1 Mutations du promoteur et perte d'hétérozygoté du gène *MC2R*

Certains polymorphismes situés dans le promoteur du gène *MC2R* sont liés à l'abus de drogues comme l'héroïne (Proudnikov *et al.*, 2008), aux spasmes infantiles (Ding *et al.*, 2010) et à l'adrénarchie prématurée (Lappalainen *et al.*, 2008). La perte d'hétérozygoté pour le gène *MC2R* cause une dé-différenciation de la glande et sa croissance cellulaire, d'où la considération de *MC2R* comme un gène suppresseur de tumeur (Beuschlein *et al.*, 2001).

1.6.2 Mutations activatrices de *MC2R*

Au contraire de plusieurs RCPGs et des autres MCRs, il est bien connu que *MC2R* est un RCPG qui ne possède pas d'activité constitutive pour la production d'AMPc en absence de ligand, signifiant que l'équilibre des récepteurs présents à la membrane plasmique tend fortement vers la conformation inactive plutôt que vers la conformation active. En effet, si *MC2R* possédait une activité constitutive (couplage constitutif à la production d'AMPc), les conséquences de certaines pathologies (celles où la sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse est supprimée) seraient moins graves sur la santé des gens et n'engendreraient pas une atrophie du cortex surrénalien et une insuffisance surrénalienne aussi importante. Il existe très peu de mutations (naturelles ou synthétiques) répertoriées qui procurent un phénotype hyperactif à *MC2R*. Ainsi très peu de mutations du *MC2R* sont associées à une hyperplasie des surrénales, à des tumeurs ou à un syndrome de Cushing. Seules les mutations naturelles C21R/S247G et F278C ont été identifiées à ce jour (Latronico *et al.*, 1995; Light *et al.*, 1995) et caractérisées (Swords *et al.*, 2002; Swords *et al.*, 2004). La mutation C21R/S247G se caractérise par une hypersensibilité du récepteur pour l'ACTH et par une activité constitutive du récepteur en absence d'ACTH (Swords *et al.*, 2004). Les patients décrits ont des taux d'ACTH circulants extrêmement bas au repos, une sécrétion faible d'ACTH par l'adénohypophyse en réponse à la CRH, mais des taux circulants de cortisol normaux (Latronico *et al.*, 1995; Light *et al.*, 1995). De la même façon, la mutation F278C entraîne un manque de désensibilisation suite à une stimulation par l'ACTH en plus de conférer une activité constitutive au récepteur en absence d'ACTH. Cette mutation cause un syndrome de Cushing ACTH-indépendant. Le

syndrome de Cushing et le phénotype induit par les mutations C21R/S247G et F278C s'expliquent largement par l'activité constitutive du récepteur (production constitutive d'AMPc) et/ou un défaut de la régulation fonctionnelle de MC2R (désensibilisation), caractérisé physiologiquement par une hyperréactivité de la glande surrénale.

1.6.3 Mutations inactivatrices de MC2R

Tout comme pour un excès en glucocorticoïdes, l'hypoplasie des surrénales et la FGD peuvent être le résultat de défauts de la voie de l'AMPc ou d'un défaut en amont ou en aval du récepteur de l'ACTH. À l'inverse du faible nombre de mutations activatrices de MC2R retrouvées naturellement, plusieurs mutations inactivatrices de MC2R ont été répertoriées et sont responsables d'environ 20% des cas de FGD (Yamaoka *et al.*, 1992; Clark and Weber, 1998; Clark *et al.*, 2005; Metherell *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2009). La majorité des mutations de MC2R retrouvées dans la FGD de type 1 affectent son adressage à la membrane plasmique (Chung *et al.*, 2008) (Figure 16).

1.6.4 Expression cellulaire limitée de MC2R et absence de polymorphismes dans la FGD

Les informations sur la régulation de MC2R sont peu nombreuses, en raison de son faible niveau d'expression et de la difficulté de l'exprimer dans un système hétérologue. Avant 2005, plus de 75 % des cas de FGD étaient inexplicables; aucune mutation dans le gène *MC2R* ne pouvait expliquer la pathologie. Jusqu'en 2005, l'expression fonctionnelle de MC2R n'était possible que dans des modèles cellulaires exprimant un autre type de MCR (comme les cellules M3 qui expriment MC1R d'une façon endogène ou les cellules Y6 dans lesquelles l'expression du MC2R endogène est supprimée). Étiqueté à la GFP (*green fluorescent protein*), MC2R-GFP transfecté dans les cellules HEK est retenu dans un compartiment intracellulaire (Noon *et al.*, 2002; Rached *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007). Les auteurs en ont déduit que l'expression fonctionnelle de MC2R nécessitait soit des cellules d'origine surrénalienne, soit la coexpression d'un autre MCR ou nécessitait l'expression d'une protéine chaperone ou facteur inconnu.

1.7 MRAP

1.7.1 Découverte d'une protéine accessoire à MC2R dont l'absence est responsable de la FGD type 2

En 2005, une protéine nommée MRAP (MC2R Accessory Protein) a été identifiée comme étant essentielle à l'expression fonctionnelle de MC2R (Metherell *et al.*, 2005). Sa découverte a été faite grâce à l'étude de polymorphismes chez des patients atteints de déficience familiale en glucocorticoïdes, pour lesquels aucune cause moléculaire ou génétique précise n'avait été identifiée auparavant. La plupart de ces individus possédaient des mutations qui écourtaient la traduction de la protéine MRAP ou encore causait un changement du cadre de lecture de l'ARN messager. Les auteurs ont montré dans les cellules SK-N-SH que la surexpression de Mrap avec MC2R augmentait la réponse en AMPc de l'ACTH (Metherell *et al.*, 2005). MRAP, anciennement nommée FALP (fat adipose tissue low molecular weight protein) avait été identifiée en 2002 comme étant une protéine de fonction inconnue exprimée lors de la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 (Xu *et al.*, 2002).

Pour être fonctionnel, MC2R nécessite donc la présence d'une protéine accessoire nommée MRAP. En effet, les sécrétions adénohypophysaires d'ACTH et l'expression conjointe de MC2R et MRAP, ainsi que d'autres facteurs encore inconnus (Clark *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2008) sont indispensables à la production d'AMPc (Metherell *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007; Sebag and Hinkle, 2007; Cooray *et al.*, 2008) et à la sécrétion de glucocorticoïdes. La perte de fonction d'une des composantes du système ligand/récepteur/protéine accessoire (ACTH/MC2R/MRAP) conduit à une forte déficience en glucocorticoïdes. Par contre, il semble certains que d'autres facteurs sont importants puisqu'à eux deux, les mutations de *MC2R* et de *MRAP*, n'expliquent qu'environ 50 % des causes de FGD.

1.7.2 Expression tissulaire des isoformes MRAP1

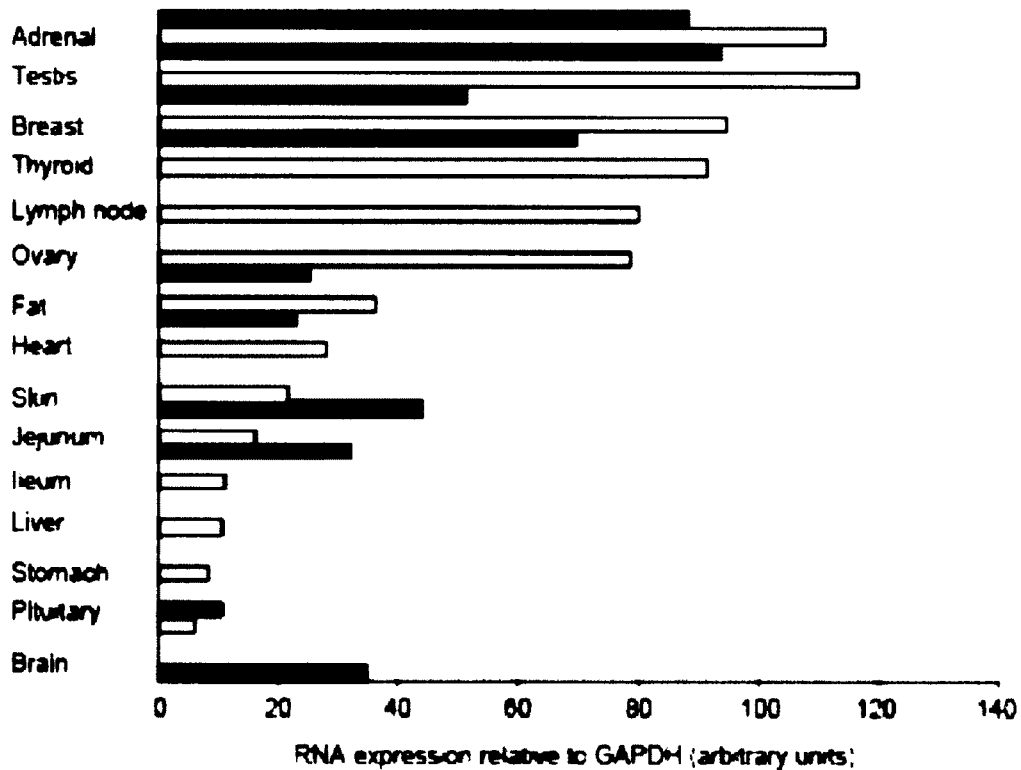


Figure 17. Distribution tissulaire de MC2R (gris), MRAP α (blanc) et MRAP β (noir) chez l'humain. Tiré de (Metherell *et al* 2005.).

Les fonctions des isoformes MRAP1 dans les nombreux tissus où elles sont exprimées (Figure 17) sont inconnues, mais leurs expressions tissulaires laissent présager que les isoformes MRAP1 pourraient jouer d'autres rôles que d'assister MC2R dans la réponse à l'ACTH dans les glandes surrénales.

1.7.3 Structure de MRAP

Les MRAPs connues à ce jour (février 2011) existent sous 2 formes. Les MRAP1s permettent l'adressage de MC2R à la membrane plasmique ainsi que sa fonctionnalité. Les MRAP2s ne permettent que le transport de MC2R vers la membrane plasmique. Chez

l'humain, il existe 2 isoformes MRAP1 issues de l'épissage alternatif du gène *MRAP* situé sur le chromosome 21 (21q22.1) (Xu *et al.*, 2002) et une seule forme de MRAP2 (Metherell *et al.*, 2005). L'isoforme MRAP α est issue des exons 3, 4 et 5 (172 acides aminés) tandis que l'isoforme MRAP β est issue des exons 3, 4 et 6 (102 acides aminés). Leurs domaines N-terminaux et transmembranaires (acides aminés 1-68), produits des exons 3 et 4, sont donc identiques et leurs domaines C-terminaux sont entièrement différents. En tant que protéines à un passage transmembranaire, les MRAP1s et les MRAP2 ont l'étrange propriété structurelle de pouvoir adopter deux orientations possibles dans les membranes biologiques (double-topologie membranaire; type II et type I) et forment des dimères anti-parallèles (Sebag and Hinkle, 2007; Sebag and Hinkle, 2010) suggérant un mécanisme d'action original et particulier.

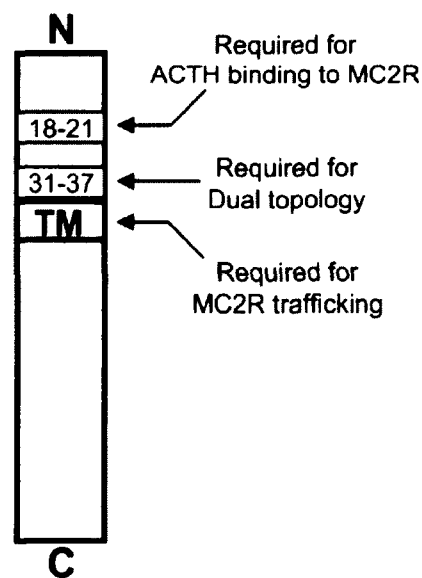


Figure 18. Structure de MRAP1. N, extrémité N-terminale; C, extrémité C-terminale; TM, domaine transmembranaire. Tiré de (Sebag and Hinkle, 2009).

Certains motifs ou segments d'acides aminés du domaine N-terminal et du domaine transmembranaire ont été identifiés (revus dans (Hinkle and Sebag, 2009)). Les acides aminés 18 à 21 (LDYI) de MRAP souris sont requis pour la liaison de l'ACTH à MC2R mais pas pour son transport jusqu'à la membrane plasmique. Les acides aminés

31 à 37 sont requis pour la double-topologie de MRAP et la double-topologie en elle-même est essentielle à la fonction de MC2R. De plus, le domaine transmembranaire complet est requis pour l'export de MC2R à la membrane plasmique et donc aussi à sa fonction (Sebag and Hinkle, 2009) (Figure 18). Selon quelques études, il n'y a pas encore de consensus à savoir si la principale localisation cellulaire des MRAPs est à la membrane plasmique puisqu'une forte proportion est retrouvée dans le cytoplasme des cellules et que la détection à la membrane plasmique est limitée dans certains cas (Roy *et al.*, 2007; Sebag and Hinkle, 2007). Les protéines MRAPs sont des protéines nouvellement identifiées pour lesquelles plusieurs controverses et questions subsistent encore. Au moment du début de ce projet de thèse en 2006, rien n'était connu sauf qu'elles permettaient la fonction de MC2R (Metherell *et al.*, 2005). Par exemple, les informations contenues dans la figure 18 n'étaient pas connues.

1.7.4 Modification de l'activité des RCPGs par des protéines accessoires à un seul domaine transmembranaire

Afin d'illustrer l'impact que l'étude des MRAPs pourrait avoir sur la régulation de MC2R ou d'autres récepteurs, le texte qui suit résume les fonctions et les propriétés d'autres protéines accessoires à un seul domaine transmembranaire connues.

En 1998, un nouveau paradoxe est né lorsque les protéines nommées RAMPs (*receptor activity-modifying protein 1, 2 et 3*) ont été identifiées comme des protéines à un passage transmembranaire de type I, capables de moduler l'expression membranaire et le phénotype pharmacologique du CRLR (*calcitonin receptor-like receptor*) (Mclatchie *et al.*, 1998). L'interaction entre RAMP1 et CRLR procure une sélectivité pour le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) (Heroux *et al.*, 2007a; Heroux *et al.*, 2007b), tandis que RAMP2/CRLR et RAMP3/CRLR procurent une sélectivité pour un ligand différent, l'adrénomédulline (Mclatchie *et al.*, 1998; Hay *et al.*, 2005). RAMP1, RAMP3 et à moindre niveau RAMP2, donnent le phénotype d'un récepteur sélectif pour l'amyline aux isoformes du récepteur de la calcitonine (Christopoulos *et al.*, 1999; Husmann *et al.*, 2000; Sexton *et al.*, 2001; Udawela *et al.*, 2006; Udawela *et al.*, 2008) (Figure 19). Les

RAMPs modifient aussi les mécanismes d'internalisation, de recyclage et de dégradation du CRLR (Bomberger *et al.*, 2005a; Bomberger *et al.*, 2005b). La modification de l'activité d'autres RCPGs par les RAMPs a aussi été répertoriée et suggérée (récepteurs du polypeptide intestinal vasoactif/peptide activant l'AC pituitaire, du glucagon et de l'hormone parathyroïde) (Christopoulos *et al.*, 2003; Udawela *et al.*, 2004; Parameswaran and Spielman, 2006). Les RAMPs sont impliquées dans les migraines (Russo, 2007; Zhang *et al.*, 2007) et dans le développement de certaines maladies cardiovasculaires (Pan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

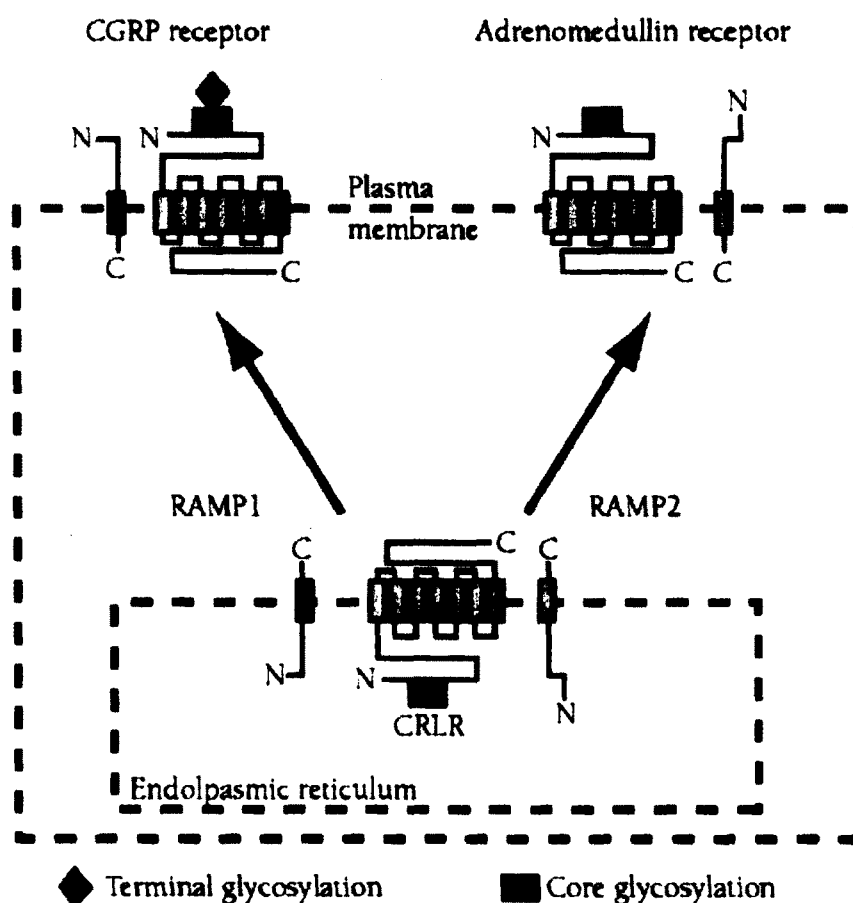


Figure 19. Rôle des RAMPs sur le CRLR. Le complexe cellulaire de surface RAMP1-CRLR est un récepteur du CGRP de type 1. Les complexes de surface RAMP2-CRLR et RAMP3-CRLR sont des récepteurs de l'adrénomédulline. Modifié de (Sexton *et al.*, 2001).

Une troisième famille de protéines à un passage transmembranaire a aussi été identifiée pour les RCPGs du système chemosensoriel. Les RTPs (receptor-transporting Protein ; 4 membres chez l'humain) et les REEPs (receptor expression-enhancing protein; 6 membres chez l'humain) ont des fonctions similaires aux MRAPs et aux RAMPs. Jusqu'à présent, les RTPs ont été identifiées comme agissant sur les récepteurs du goût amer (TAS2R ; ~25 membres chez l'humain) et ont un rôle important dans la sensation du goût amer et des aliments toxiques et sur la stimulation de certains récepteurs olfactifs (Saito *et al.*, 2004; Behrens *et al.*, 2006). Comme leurs noms l'indiquent, les RTPs et les REEPs participent au transport de certains RCPGs jusqu'à la membrane plasmique. Tout comme les MRAPs, les RTPs et les REEPs sont exprimées dans divers tissus. RTP4, initialement cloné à partir de macrophages dérivés de la moelle osseuse sous le contrôle des interférons, est exprimé dans l'endomètre, les ovaires et les lymphocytes de la circulation sanguine périphérique chez la brebis gestante (Gifford *et al.*, 2008). A noter, son expression dans les cellules HEK293 permet l'expression membranaire des récepteurs aux opioïdes μ et δ (Decaillet *et al.*, 2008). L'expression de RTP1 et RTP2 semble plutôt restreinte aux systèmes chemosensoriels. De plus, les récepteurs TAS2R14, TAS2R16, TAS2R38 sont exprimés dans des tissus stéroïdogéniques comme les testicules humaines (Behrens *et al.*, 2006). REEP1 est impliquée dans la paraplégie spastique de type 31 (Zuchner *et al.*, 2006; Beetz *et al.*, 2008; Schlang *et al.*, 2008). REEP3 est possiblement impliquée dans l'autisme (Castermans *et al.*, 2007).

Chapitre 2 - Problématiques et objectifs

2.1 Problématique de la régulation fonctionnelle de MC2R

L'étude de la régulation fonctionnelle de MC2R a pour but principal de comprendre l'adaptation de la signalisation de l'ACTH lors de la stimulation du récepteur MC2R. Celui-ci est normalement retrouvé dans les cellules de la ZF, ZG et ZR du cortex surrénalien. Le cortex surrénalien doit constamment s'adapter aux conditions physiologiques de chaque individu, notamment face à des situations de stress. En second lieu, cette thèse sert à identifier certains facteurs moléculaires qui sont, ou pourraient être, la cause de maladies rares et qui peuvent parfois occasionner la mort.

Comme indiqué précédemment (section 1.7), pour être fonctionnel, MC2R nécessite la présence de MRAP1. Les sécrétions adénohypophysaires d'ACTH et l'expression conjointe de MC2R et MRAP, ainsi que d'autres facteurs encore inconnus (Clark *et al.*, 2005; Metherell *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008) sont indispensables à la production d'AMPc (Metherell *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007; Sebag and Hinkle, 2007; Cooray *et al.*, 2008) et ainsi à la sécrétion de glucocorticoïdes. La régulation du système ACTH/MC2R/MRAP est donc cruciale pour les cellules de la cortico-surrénale afin d'ajuster les sécrétions de glucocorticoïdes selon les besoins.

MC2R est un récepteur atypique pour lequel l'analyse de sa désensibilisation et de son internalisation (section 1.5) a toujours été confrontée à l'absence d'un bon modèle d'expression fonctionnelle (section 1.6.3). Il n'existe que très peu d'informations (souvent fragmentaires et contradictoires) à savoir si la phosphorylation de MC2R est importante ou non pour sa régulation. Afin de caractériser la régulation fonctionnelle de MC2R dans des cellules transfectées, notre laboratoire utilisait les cellules de mélanome murin Cloudman S91, aussi nommées cellules M3 (Kilianova *et al.*, 2006). Par contre, selon les

premiers résultats obtenus avec ces cellules, l'ACTH stimulait aussi le récepteur MC1R exprimé dans ces cellules, ce qui entravait les études de la fonctionnalité de MC2R. Ainsi est né mon premier objectif : trouver un nouveau modèle d'expression pour MC2R non-contaminé par l'expression endogène d'autres MCRs.

Nous nous sommes alors tournés vers les cellules B16-G4F, aussi issues de cellules de mélanomes murins, provenant du Dr Alex Eberle. Le clone G4F issu de la lignée mère B16 n'exprime pas MC1R et ne répond pas aux mélanocortines (Solca *et al.*, 1993). Malheureusement, la transfection transitoire de MC2R dans ces cellules ne permettait pas mesurer la fonctionnalité de MC2R. Puis en 2005 survint la découverte de MRAP (section 1.6.3). Nous avons donc cloné les 2 isoformes MRAP1 humaines (MRAP α et MRAP β ; section 1.7.3) afin d'établir le modèle d'expression désiré. Nous avons ensuite choisi un modèle cellulaire humain et utilisé massivement pour la caractérisation de RCPGs, les cellules HEK293. Cependant, nous avons opté pour un variant de cette lignée en choisissant les cellules HEK 293/FRT parce qu'elles allaient me permettre de réaliser de la recombinaison homologe de gènes d'intérêts (MC2R, MRAPs et autres au besoin) et ainsi faciliter l'établissement de populations de cellules isogéniques exprimant de façon stable les gènes d'intérêts dans un temps relativement court par rapport à la méthode traditionnelle.

Les protéines MRAP sont des protéines nouvellement identifiées avec des fonctions et des caractéristiques inconnues (en 2005). L'utilisation des protéines MRAP a conséquemment amené plusieurs sous-objectifs à mon projet qui était de caractériser la régulation fonctionnelle de MC2R.

2.2 Objectifs

- 1) Établir un modèle d'expression fonctionnel pour MC2R, idéalement dans des cellules humaines qui n'expriment aucun MCR de façon endogène, y compris MC2R.
- 2) Déterminer si les isoformes MRAP1 permettent l'expression membranaire de MC2R grâce à un processus intracellulaire de N-glycosylation.
- 3) Déterminer le rôle des domaines C-terminaux des isoformes MRAP1 dans un contexte où l'expression de MC2R est absente, puis dans un contexte fonctionnel connu, soit en présence de MC2R.
- 4) Reprendre le plus possible les analyses disponibles sur la désensibilisation et sur l'internalisation de MC2R dans une nouvelle perspective selon laquelle MC2R requiert MRAP pour son expression fonctionnelle.
- 5) Déterminer si les trafics intracellulaires de MC2R et MRAPs sont conjoints.
- 6) Déterminer la contribution des 9 sérines et thréonines intracellulaires de MC2R dans l'expression membranaire, son internalisation et le recyclage de MC2R.
- 7) Déterminer si l'activation des MAPKs induite par l'ACTH est dépendante de l'internalisation de MC2R ou d'un autre processus.

Chapitre 3 - Résultats

3.1 Régulation fonctionnelle de MC2R par les isoformes MRAP1

Titre : Differential Regulation of the Human Adrenocorticotropin Receptor [Melanocortin-2 Receptor (MC2R)] by Human MC2R Accessory Protein Isoforms α and β in Isogenic Human Embryonic Kidney 293 Cells.

Auteurs : Simon Roy, Mohamed Rached and Nicole Gallo-Payet

Statut : Soumis pour publication le 22 janvier 2007. Accepté le 18 avril 2007. Publié en ligne le 24 avril 2007.

Avant-propos : Avec l'aide de Mohamed Rached (stagiaire post-doctoral dans le laboratoire), j'ai cloné les isoformes MRAP1 humaines et conçu les stratégies d'expression de MC2R et MRAPs dans le modèle cellulaire décrit. J'ai effectué toutes les expériences avec l'aide de Lucie Chouinard, la technicienne du laboratoire. J'ai développé la technique ELISA moi-même pour les besoins de l'article. J'ai écrit le manuscrit dans sa forme originale et monté les figures moi-même. Le Pr Gallo-Payet a largement contribué à la version finale de l'article dans la forme qui a été acceptée pour publication.

Dans cette étude, les images d'épifluorescence montrent un niveau faible à moyen de colocalisation entre MC2R et les isoformes MRAP1. Dans les études qui suivront (sections 3.2 et 3.3), les études de microscopie confocale montrent plutôt une forte colocalisation entre MC2R et les isoformes MRAP1. Ces différences sont probablement dues aux appareils de microscopie différents (ex : diffraction, temps d'acquisition, stabilité et contrôle de la platine) ou à encombrement stérique entre les épitopes Myc et

Flag et les anticorps primaires utilisés durant la préparation des échantillons. Les anticorps anti-c-Myc (9E10) ne reconnaissent pas la protéine c-Myc endogène puisque l'antigène est situé dans une partie non-accessible de la protéine.

présence de MRAP β comparativement à MRAP α , ce qui pouvait contribuer à une capacité de liaison de l'ACTH et à des réponses d'AMPc maximales supérieures dans les cellules exprimant MRAP β . Des études d'immunofluorescence ont indiqué que les isoformes MRAP1 étaient localisés à proximité de la membrane plasmique et dans ses environs, mais peu colocalisées avec Myc-MC2R. En résumé, grâce à la création d'un nouveau modèle expérimental entièrement humain sans expression endogène de récepteurs aux mélanocortines, nous avons montré que les isoformes MRAP1 humaines, bien que non-essentiels pour la localisation de MC2R à la membrane plasmique, sont essentielles pour la liaison de l'ACTH, la production d'AMPc induite par l'ACTH et qu'ils régulent différemment, quoique modestement, la densité membranaire et les propriétés fonctionnelles de MC2R.

ABSTRACT

The ACTH receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] is the smallest known G protein-coupled receptor (GPCR). Herein, human MC2R accessory protein (MRAP) isoforms α and β , cloned from a human fetal adrenal gland, were expressed with c-Myc-tagged MC2R (Myc-MC2R) in 293/*Flp* recombinase target site cells by homologous recombination. Although insertion of Myc-MC2R at the plasma membrane occurred without MRAP assistance, ACTH stimulation of cAMP production was only detected in cells coexpressing MC2R with either MRAP isoform. On the other hand, a MC2R-green fluorescent protein fusion transfected with either MRAP α or MRAP β was impaired both in cell membrane localization and signaling. MRAP isoforms were also tagged with either Flag or 6xHis epitopes. In cell populations coexpressing transiently and/or stably Myc-MC2R with MRAP α or MRAP β , stimulation with ACTH induced production of cAMP with EC₅₀ values lower in MRAP α - than in MRAP β -expressing cells. ACTH only bound Myc-MC2R in the presence of MRAP. Higher Myc-MC2R cell surface density was observed in the presence of MRAP β comparatively to MRAP α , possibly contributing to higher ACTH binding capacity and higher maximal cAMP responses observed in

MRAP β -expressing cells. Immunofluorescence studies indicated that MRAP isoforms were localized near the plasma membrane and in the vicinity, but not colocalized, with Myc-MC2R. In summary, through the generation of a new all-human experimental model devoid of endogenous MCRs, we present evidence that human MRAP isoforms, although not essential for MC2R localization at the plasma membrane, are essential for ACTH binding and ACTH-induced cAMP production and that they differentially regulate, although modestly, cell membrane density and functional properties of MC2R.

Key words: ACTH • MC2R • MRAP • HEK293 • cAMP

FOOTNOTES

This work was supported by Grant MOP-10998 from the Canadian Institutes for Health Research (to N.G.-P.). M.R. was a recipient of a fellowship from the Fondation pour la recherche médicale (France) in 2004–2005. N.G.-P. is the recipient of the Canada Research Chair in Endocrinology of the Adrenal Gland.

Author Disclosure Summary: S.R., M.R., and N.G.-P. have nothing to declare.

Abbreviations: DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole; FRT, *Flp* recombinase target site; 293/FRT, HEK293 cell line with single genome-integrated FRT site; GFP, green fluorescent protein; GOI, gene of interest; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293, human embryonic kidney cell line; HBS, Hank's buffered saline; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; M3, mouse Cloudman melanoma S91 cell line; MCR, melanocortin receptor; MC1R, MC2R, MC3R, and MC4R, human melanocortin type 1, 2, 3, and 4 receptors, respectively; Mc1r, mouse melanocortin type 1 receptor; Mc2r, mouse MC2R; MRAP, human melanocortin 2 receptor accessory protein, isoform α or β ; Mrap, mouse MRAP; NDP-MSH, (Nle⁴, D-Phe⁷) α -MSH.

INTRODUCTION

ACTH, through the melanocortin-2 receptor (MC2R), is the most potent trophic stimulus of the adrenal cortex, stimulating both steroidogenesis and protein synthesis (1, 2). By stimulating aldosterone and glucocorticoid synthesis and secretion (corticosterone in rodents and cortisol in humans and bovine), ACTH binding to MC2R plays a pivotal role in homeostasis, metabolism, and stress response (3). MC2R is the second member of the five known melanocortin receptors (MCRs) belonging to the Rhodopsin-like family of G protein-coupled receptors (GPCRs) (4, 5). These five MCRs constitute a distinct family of GPCRs, characterized by their unusually short coding sequence and the absence of highly conserved amino acid residues or motifs common to most GPCRs (6, 7, 8). MC2R is both the smallest MCR and the smallest known GPCR (297 amino acids). In comparison with other MCRs, MC2R is unique in that it binds only to ACTH and does not possess affinities for other melanocortins (α -, β -, and γ -MSH). On the other hand, other MCRs are activated by both ACTH and MSHs (mainly α -MSH) (for review see Refs. 5, 7, and 8).

All known MCRs are coupled to Gs proteins, thus stimulating adenylyl cyclase, resulting in cAMP production and protein kinase A activation (8). Although numerous studies have been conducted on ACTH action in the adrenal gland, several aspects in the various steps from its initial binding up to ensuing cell responses remain poorly understood (9). In contrast to most GPCRs, difficulties linked to the specific functional expression of MC2R have made it impossible to express MC2R in a system that is free of any endogenous MCR expression (10). Indeed, successful transfection studies are limited to those cell lines that are known to express one of the MCRs such as in Cloudman melanoma 591 (M3) cells (11, 12, 13), African green monkey kidney cell line COS-7 cells (14), or the mutant adrenocortical cell lines Y6 (15) and OS3 (16). However, as reported for other GPCRs (17, 18), MCRs can form constitutive homo- and heterodimers (19, 20). Because MC3R and MC4R are also expressed in the adrenal gland (21, 22) and mouse

Mc1r is expressed in M3 cells (13), such interactions could impede efforts to better understand the exact nature of MC2R's structure-function relationship.

Thanks to the recent discovery of the MC2R accessory protein, MRAP (23), MC2R heterologous expression difficulties can now be overcome. Mouse Mrap, a transmembrane protein, was first identified in adipocytes after differentiation of mouse 3T3-L1 fibroblasts (24) and initially named fat tissue low-molecular weight protein. Fat tissue low-molecular weight protein has since been renamed "melanocortin-2 receptor accessory protein" (designated henceforth as human MRAP and mouse Mrap). Interaction between Mc2r-GFP (green fluorescent protein) (GFP fused to the C terminus of Mc2r) and Mrap-Flag (Mrap tagged at its C terminus with Flag) has been described in the Chinese hamster ovarian cell line (CHO-K1) and in the human Caucasian bone marrow neuroblastoma cell line (SK-N-SH) (23). Mrap is known to increase ACTH responsiveness in some cell lines (23, 25). In humans, there are two distinct forms of MRAP proteins, isoform α (exons 3–4–5, 172 amino acids) and isoform β (exons 3–4–6, 102 amino acids) (23), both of which share the same N terminus and transmembrane domain (approximately from residue 38–58), but are otherwise highly divergent in their C termini. However, nothing is known regarding their functional relationship with MC2R.

The human embryonic kidney 293 (HEK293) cell line is known to be MCR free and to be nonresponsive to ACTH and NDP-MSH (26, 27). It has been reported by immunofluorescence studies that MC2R-GFP (GFP fused to MC2R C-terminus) does not reach the cell surface in these cells and thus is retained in intracellular compartments (10, 27). In the present study, the combination of our recently developed N-terminal-c-Myc-tagged human MC2R construction (Myc-MC2R) (13) and the *Flp* recombinase-mediated homologous recombination system in HEK293 cells [*Flp*-In system; 293/*Flp* recombinase target site (FRT) cell line] (28, 29) was used to generate isogenic populations expressing both Myc-MC2R with either of the appropriately tagged MRAP α or MRAP β isoforms. These various constructions were also used to investigate Myc-MC2R and MC2R-GFP expression at the cell membrane and the capacity of these cells to produce cAMP upon

ACTH stimulation. Through a multifaceted approach consisting of cell-surface ELISAs, immunofluorescence studies, and cAMP and ligand-binding assays, our results provide evidence that the human MC2R alone is inserted in the plasma membrane, but fails to bind ACTH and to produce cAMP in the absence of MRAP isoforms. In addition, MRAP α and MRAP β confer specific and slightly different functional properties to MC2R.

RESULTS

Myc-MC2R Alone, But Not MC2R-GFP, Is Inserted at the Plasma Membrane of 293/FRT Cells

Localization of Myc-MC2R was assessed by indirect immunofluorescence and cell-surface ELISA in unpermeabilized 293/FRT cells expressing Myc-MC2R either transiently or stably. Immunofluorescence images were acquired at the plane of the nuclei (Fig. 1, A and C) or at the plane of cell adhesion to the coverslip (Fig. 1, B and D) to visualize only the area in close proximity to the cell membrane. Results reveal an intense fluorescence signal corresponding to the detection of the N-terminal c-Myc epitope of Myc-MC2R in both transient (Fig. 1, A and B) and stable (Fig. 1, C and D) conditions. Myc-MC2R was localized in discrete plasma membrane subdomains present at the cell surface, as evidenced by the punctuated fluorescence pattern (Fig. 1C, *inset*). As shown by cell surface ELISA measurements, when Myc-MC2R was transiently transfected at 61% efficiency, the level of cell surface expression was 3.6-fold higher than in stable isogenic cells, where more than 95% of the cells stably expressed Myc-MC2R at lower levels ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, $n = 3$, respectively compared with control 293/FRT cells) (Fig. 1E). In contrast to Myc-MC2R, observations at both the nuclear and cell adhesion to coverslip planes in Fig. 1F and 1G, respectively, reveal that transient expression of MC2R-GFP in 293/FRT cells yielded fluorescence localized in the cytoplasm in a punctuate pattern. Hence, in 293/FRT cells, Myc-MC2R was inserted into the plasma membrane, but not MC2R-GFP.

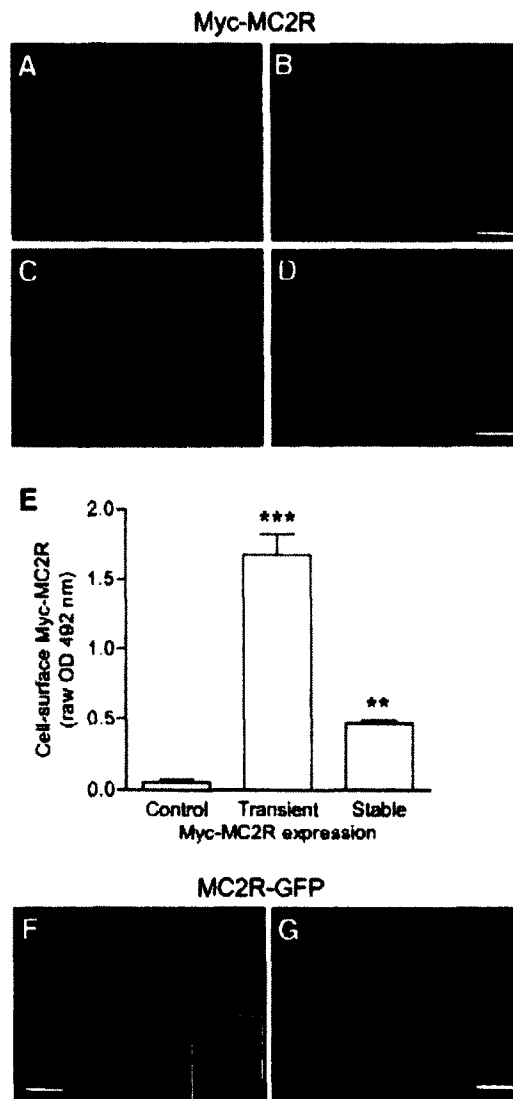


Fig. 1. Expression of Myc-Tagged Human MC2R in 293/FRT Cells

Myc-MC2R was transiently (A and B) or stably (C and D) expressed in 293/FRT cells, as described in *Materials and Methods*. Cells were fixed but not permeabilized before incubation with anti-c-Myc antibody and were detected using the antimouse Alexa-Fluor488 secondary antibody. Images were acquired at the nuclear plane (A and C) or at the cell adhesion to coverslip plane (B and D) and are representative illustrations of more than 100 cells from at least six experiments. *Inset* is a magnification (2.8-fold) of a portion of the cell membrane. Because large variations of signal intensity were observed from cell to cell in transiently transfected cells, low-expressing cells were selected for panels A and B and used in a qualitative approach. E, Transient and stable cell surface expression of Myc-MC2R as assessed by ELISA on unpermeabilized cells. Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. Statistical significance: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, when compared with control conditions. F and G, MC2R-GFP was transiently overexpressed in 293/FRT cells and analyzed using the GFP reporter at the nuclear plane (F) and at the cell adhesion to the coverslip level (G). *Scale bar*: 10 μ m for all panels and 3.6 μ m for the *insets*.

MRAP α and β expression is required for cAMP signaling of MC2R

We first verified whether human mRNA transcripts encoding MRAP α and MRAP β were present in the human 293/FRT cell line and in human fetal and adult adrenal glands. In 293/FRT cells, RT-PCR analysis was negative for the amplification of either transcript, while both MRAP isoform transcripts were present in human fetal adrenal gland as well as in zona glomerulosa and zona fasciculata of adult human adrenal glands (Fig. 2A). Second, in order to assess ACTH responsiveness in terms of cAMP production, Myc-MC2R was transiently co-transfected in 293/FRT cells with either MRAP α or MRAP β . As shown in Fig. 2B, cells transfected with MRAP α , MRAP β or Myc-MC2R alone did not respond to ACTH stimulation. ACTH responsiveness was detected only in cells co-expressing MC2R with either MRAP α or MRAP β , with 100 nM ACTH stimulation inducing 187 ± 5 and 192 ± 5 fold increases over their respective basal values ($p < 0.001$). Moreover, in stable 293/FRT/MycMC2R cells, transiently transfected with either MRAP isoform, ACTH 1-24 and 1-39 were equipotent in terms of cAMP production while NDP-MSH was unable to stimulate cAMP production in these cells (Fig. 2C). In addition, cells transfected with MRAP β had a tendency to generate greater cAMP accumulation after 15 min stimulation comparatively to cells transfected with MRAP α . Together, these results highlight that 293/FRT cells are devoid of endogenous MCR and MRAP expression and that ACTH only stimulates cAMP production when MC2R and MRAP are co-expressed, even if Myc-MC2R is readily present at the cell surface without MRAP assistance.

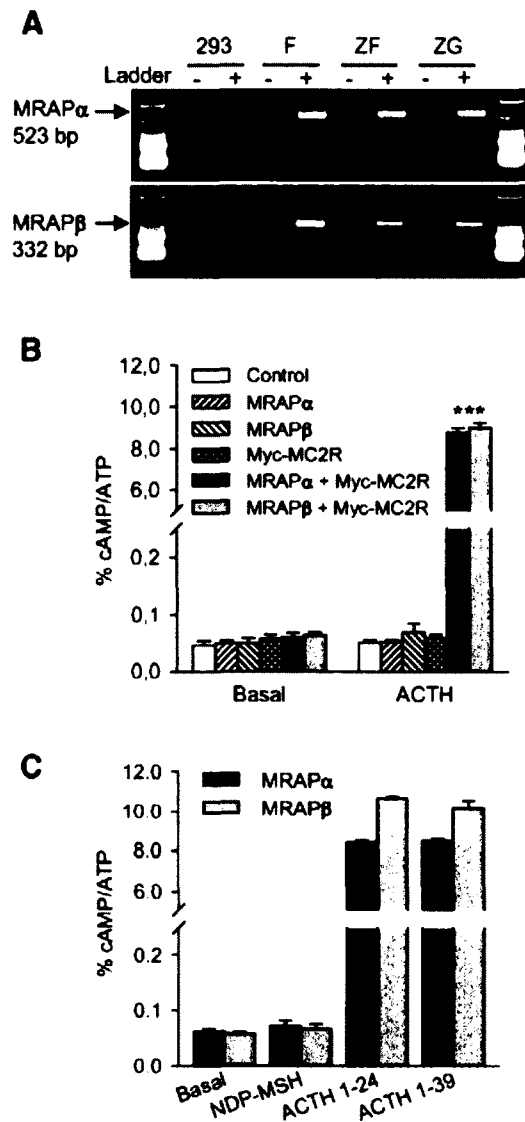


Fig. 2. Involvement of MRAP in ACTH-Induced cAMP Production

A, Reversed-transcribed RNA from indicated human specimens was used to amplify the entire coding sequences for MRAP α and MRAP β by RT-PCR (30 cycles, 3 μ l load each), as described in *Materials and Methods* using cloning primers pairs listed in Table 1. Legend titles above lanes represent 293/FRT cells (293), human fetal adrenal gland of 18 wk-old (F), human zona fasciculata (ZF), and glomerulosa cells (ZG) of a 46-yr-old male. B, cAMP production in 293/FRT cells transiently cotransfected with pcDNA3/Myc-MC2R, pcDNA3/MRAP α , and pcDNA3/MRAP β combinations as indicated (0.4 μ g/plasmid, total DNA fixed at 1.2 μ g using pEGFP). Cells were stimulated with or without 100 nM ACTH for 15 min in the presence of 1 μ M IBMX. Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. C, 293/FRT/MycMC2R cells were transiently transfected with pcDNA3/MRAP α or pcDNA3/MRAP β and assessed for cAMP production in the presence of saline (basal), 100 nM of NDP-MSH, ACTH 1–24, or ACTH 1–39. This experiment represents the mean \pm SE of one experiment in triplicate. Statistical significance: ***, $P < 0.001$, when compared with control conditions.

ACTH responsiveness remains intact with Myc-MC2R, but not with MC2R-GFP

The following experiments were designed to compare the ability of 293/FRT/MRAP α and 293/FRT/MRAP β cell lines (stably expressing MRAP α and MRAP β respectively), transfected with untagged-MC2R, Myc-MC2R or MC2R-GFP, to respond to increasing concentrations of ACTH. As shown in Fig. 3A, ACTH induced similar dose-responses curves with untagged- and Myc-MC2R in both cell lines. As previously observed, maximal cAMP stimulation was lower in 293/FRT/MRAP α cells, reaching 154 ± 4 and 158 ± 4 -fold increases over control for untagged- and Myc-MC2R, compared to 197 ± 1 and 188 ± 9 -fold increase respectively over basal values in the 293/FRT/MRAP β cells. The threshold concentration was 1 pM and 10 pM in MRAP α and MRAP β isogenic cell lines respectively. In MC2R-GFP transfected cells, responses were lower, exhibiting 25 ± 1 and 19 ± 1 fold increases over basal values in MRAP α and MRAP β cell lines respectively, with a threshold concentration established at 3 nM ACTH in both cell lines. When illustrated as normalized data (Fig. 3B), EC₅₀ values for MC2R-GFP expressed in MRAP α and MRAP β isogenic cell lines (2680 [2240, 3210] and 3030 [2930, 3140] pM respectively) were clearly right-shifted compared to untagged- (79 [44, 143] and 248 [242, 254] pM respectively) and Myc-MC2R (58 [34, 100] and 189 [68, 519] pM) cell lines. There was no statistical difference between untagged- and Myc-MC2R transfected cells. Maximal responses and EC₅₀ values from MC2R-GFP transfected cells were different from those of untagged-MC2R ($p < 0.001$, $n = 3$, for each cell line). Thus, as previously described in M3 cells (27), the presence of GFP at the C-terminus of MC2R alters the potency and sensitivity of the ACTH response.

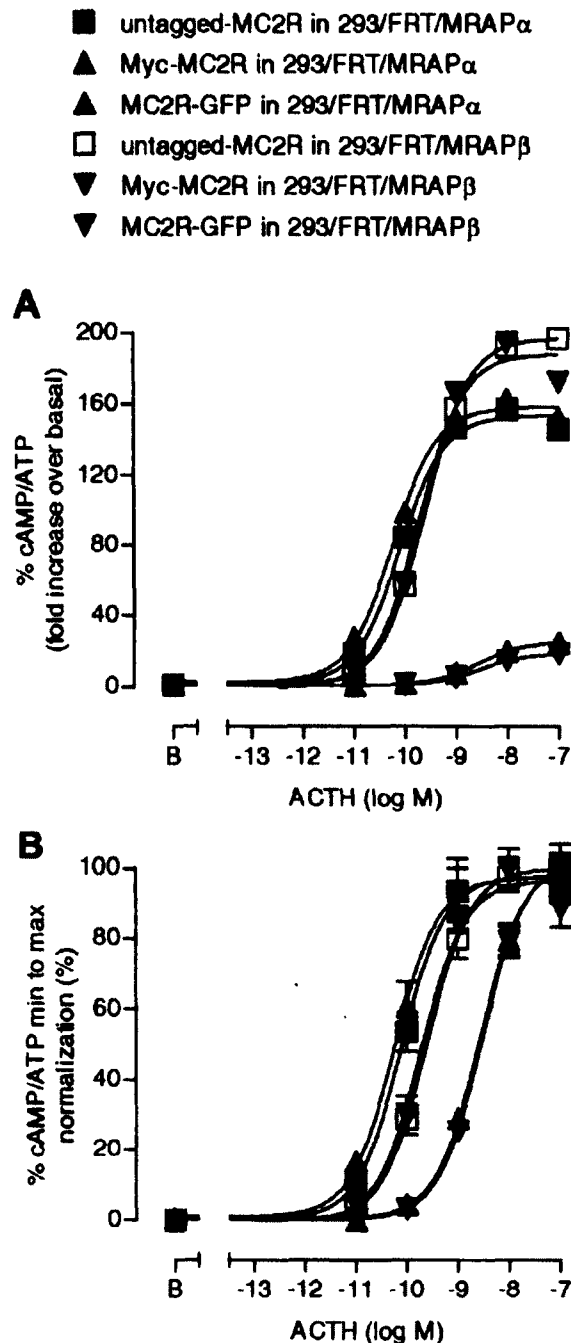


Fig. 3. Tagged and Untagged Comparison of MC2R Functionality with MRAP Isoforms

Stable isogenic cells expressing each MRAP isoform separately (293/FRT/MRAP α and 293/FRT/MRAP β) were transiently transfected with pcDNA5/FRT/untagged-MC2R, pcDNA5/FRT/Myc-MC2R, or pCEP4/MC2R-GFP and assessed for cAMP production in the presence of 1 μ M IBMX for 15 min using indicated ACTH concentrations. A, the data are expressed as fold increases over basal cAMP levels to illustrate maximal effects. B, The data from panel A were normalized from 0–100% to visualize shifts in dose-response curves. Results are the mean \pm SEM or three experiments performed in duplicate.

MRAP α and MRAP β isoforms differentially affect ACTH-induced cAMP production and ACTH binding

A more in-depth analysis of the differences in cAMP production by MRAP α and MRAP β was assessed through the construction of bicistronic vectors, containing one open reading frame (ORF) for Myc-MC2R and another ORF for either MRAP α -Flag or MRAP β -Flag, inserted in a Flp-In-compatible vector and each driven by independent CMV promoters. This strategy was used to gain similar expression levels for MC2R as well as both MRAP isoforms and to render all transfected cells responsive to ACTH. The 293/FRT cell line, transiently transfected with pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag or pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag bicistronic vectors, responded to increasing ACTH concentrations with maximal responses of 170 ± 6 fold and 231 ± 8 fold increase over basal values respectively ($p < 0.01$, $n = 3$) (Fig. 4A). As illustrated in the normalized data (Fig. 4B), the EC_{50} values were 49 [31, 78] and 193 [127, 293] pM respectively for MC2R/MRAP α - and MC2R/MRAP β -transfected cells ($p < 0.001$). With the two double stable isogenic cell lines, 293/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag and 293/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag, obtained by stable integration of the bicistronic vectors in the 293/FRT genome, maximal stimulations were 673 ± 21 and 891 ± 14 -fold increase over basal values ($p < 0.001$) and EC_{50} values were 60 [41, 88] and 252 [211, 301] pM respectively ($p < 0.001$, $n = 3$) (Fig. 4 C, D). Thus, in both models (transient or double stable isogenic cell lines), MC2R co-expressed with MRAP α was less efficient than MC2R coexpressed with MRAP β under maximal ACTH-induced cAMP production, while in MRAP α -transfected cells, the cells were more sensitive to low ACTH concentrations.

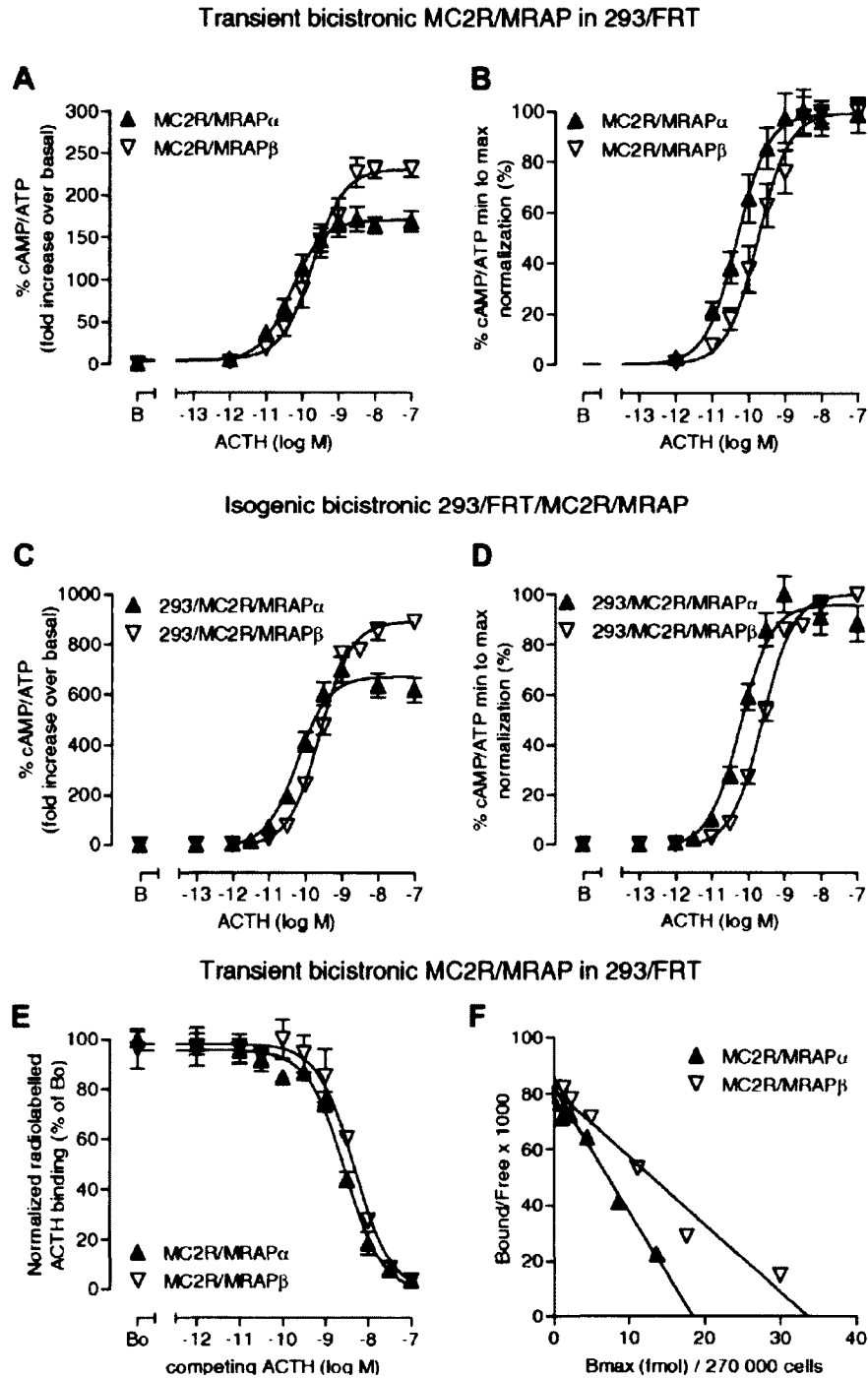


Fig. 4. Modulation of ACTH-Induced cAMP Production by MRAP α and MRAP β

293/FRT cells transiently transfected with either bicistronic vectors, pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag or pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag (0.5 μ g) (A and B), or double stable isogenic cell lines, 293/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag or 293/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag (C and D), were stimulated with increasing concentrations of ACTH for 15 min at 37 C in the presence of 1 μ M IBMX. cAMP was measured as described in *Materials and Methods*. Results represent the mean \pm SEM of

three experiments, each performed in triplicate. Data are expressed as fold increases over basal value (denoted as B in the x-axis) (A and C) or normalized from 0–100% (B and D). E, 293/FRT cells transiently transfected with pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag or pcDNA5/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag were assessed for binding experiments using competition of [¹²⁵I]iodotyrosyl₂₂ ACTH(1–39) with unlabeled ACTH(1–24), as described in *Materials and Methods*. F, Bound/free vs. bound representations (Scatchard plots) of the results presented in E. *Straight lines* have a slope of $-1/K_d$. Results were normalized to 270,000 cells. Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in duplicate. B₀, Specific binding in the presence of radiolabeled peptide only; B_{max}, maximal binding capacity.

Binding studies were thus conducted to verify whether the observed differences in ACTH-induced cAMP production were due to ACTH binding properties. None of the native 293/FRT cells transfected with either of MRAP α , MRAP β or Myc-MC2R alone were able to bind specifically to ACTH (not shown). However in transient Myc-MC2R/MRAP α -Flag-transfected cells (bicistronic vector), unlabelled ACTH reduced [¹²⁵I]-iodotyrosyl²³-ACTH binding to MC2R in a dose-dependent manner, with 50 % inhibition (IC₅₀) obtained at 2.9 [2.5, 3.5] and 4.8 [3.8, 6.2] nM for MC2R with MRAP α and MRAP β respectively ($p < 0.01$, $n = 3$) (Fig. 4E). Scatchard analyses revealed a K_d of 1.1 ± 0.6 nM in MRAP α -expressing cells and 2.1 ± 0.2 nM in MRAP β - expressing cells ($p < 0.05$), with a binding capacity of 68 ± 4 fmol/1 $\times 10^6$ cells ($41\ 000 \pm 2\ 300$ sites/cell) and 140 ± 9 fmol/1 $\times 10^6$ cells ($75\ 200 \pm 4800$ sites/cell), respectively for MC2R/MRAP α - and MC2R/MRAP β -expressing cells ($p < 0.05$) (Fig. 4F).

MRAP α and - β Enhance MC2R Cell Surface Density

In stable 293/FRT/MycMC2R cells transiently transfected with native untagged MRAP α or MRAP β , ELISA measurements indicated that cell surface MC2R expression increased by 1.9 ± 0.2 -fold in MRAP α -transfected cells ($P < 0.01$) compared with 2.8 ± 0.2 -fold in MRAP β -transfected cells ($P < 0.001$) over basal Myc-MC2R density in control cells ($P < 0.01$; difference between MRAP transfected cells, $n = 4$) (Fig. 5A).

To further investigate the functional properties of MRAP α and MRAP β , 10 MRAP constructions were created, consisting of Flag and 6xHis epitope tags fused to N-

and/or C termini of MRAP α and MRAP β (Table 2, and supplemental data 1 published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://mend.endojournals.org>). As illustrated in Fig. 5B, in transient overexpression conditions, Flag-MRAP α in 293/FRT cells was poorly detected at the cell surface in comparison with MRAP α -Flag, with MRAP α -Flag being significantly detected over control cells and over Flag-MRAP α ($P < 0.001$, $n = 3$). On the other hand, Flag-MRAP β and MRAP β -Flag were both significantly detected at the cell surface compared with control cells and compared with Flag-MRAP α control ($P < 0.05$ each). Results were similar when 6xHis-tagged MRAP isoforms were assayed (data not shown).

Table 2. Schematic Representation, Full Names, and Abbreviations of the Epitope-Tagged MRAP Constructions

Construction (abbreviation)	Representation
Flag-MRAP α (F α)	
Flag-MRAP β (F β)	
MRAP α -Flag (α F)	
MRAP β -Flag (β F)	
6xHis-MRAP α (H α)	
6xHis-MRAP β (H β)	
MRAP α -6xHis (α H)	
MRAP β -6xHis (β H)	
6xHis-MRAP α -Flag (H α F)	
6xHis-MRAP β -Flag (H β F)	

The symbols at each end of the N- and C-terminal protein sequence representations refer to the indicated Flag (◻) and 6xHis (◉) labels. Constructions are represented from their N to C termini from *left to right*. The central wave icon (⌋) represents the putative transmembrane domain. All 10 tagged-MRAP constructions were cloned in the pcDNA5/FRT vector but not in pcDNA3, excluding the native MRAP cDNAs.

On the other hand, cell membrane expression of transient Myc-MC2R was verified in 293/FRT/MRAP α and 293/FRT/MRAP β stable isogenic cells. A significant increase in MC2R was observed at the cell membrane of 293/FRT/MRAP α and of 293/FRT/MRAP β cell lines, with a 1.9 ± 0.4 -fold ($P < 0.05$) and 2.9 ± 0.3 -fold increase, respectively, over Myc-MC2R basal expression in 293/FRT cells ($P < 0.001$, $n = 4$) (Fig. 5C). In agreement with results from Fig. 5A, cell surface Myc-MC2R expression was increased by 1.5-fold in 293/FRT/MRAP β cells compared with MRAP α cells ($P < 0.05$). In individual MRAP isoform stable isogenic cells, the level of membrane detection of all MRAP constructions was low, nearing the limit of detection. However, the level of MRAP α -Flag was higher than Flag-MRAP α ($P < 0.05$). MRAP β -Flag was also higher than Flag-MRAP β ($P < 0.001$) and higher than MRAP α -Flag when isogenic cell lines are compared ($P < 0.05$) (Fig. 5D). Together, these results indicate that MRAP isoforms enhance Myc-MC2R cell surface expression compared with its basal level and that MRAP α is less potent than MRAP β in this process. Furthermore, lower expression of proteins in MRAP isoform stable isogenic cells did not reveal the same pattern of cell surface expression for MRAP isoforms as in transiently transfected cells. Confirming previous observations (23, 24), in stable isogenic conditions, MRAP α and MRAP β could be detected only in intracellular N termini and extracellular C termini topology. Thus, as previously described in other models (30), lower expression in stably transfected cells (or stable isogenic cell lines herein) appears to be a more physiological and suitable model in comparison with transient overexpression in a small percentage of cells. Therefore, to avoid artifactual misinterpretation due to the overexpression of MC2R or MRAP isoforms in transiently transfected cells, the following studies were conducted using stable bicistronic isogenic cell lines. All the data described in Fig. 5 were validated by immunofluorescence observations and ELISA measurements (supplemental data 2 published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site).

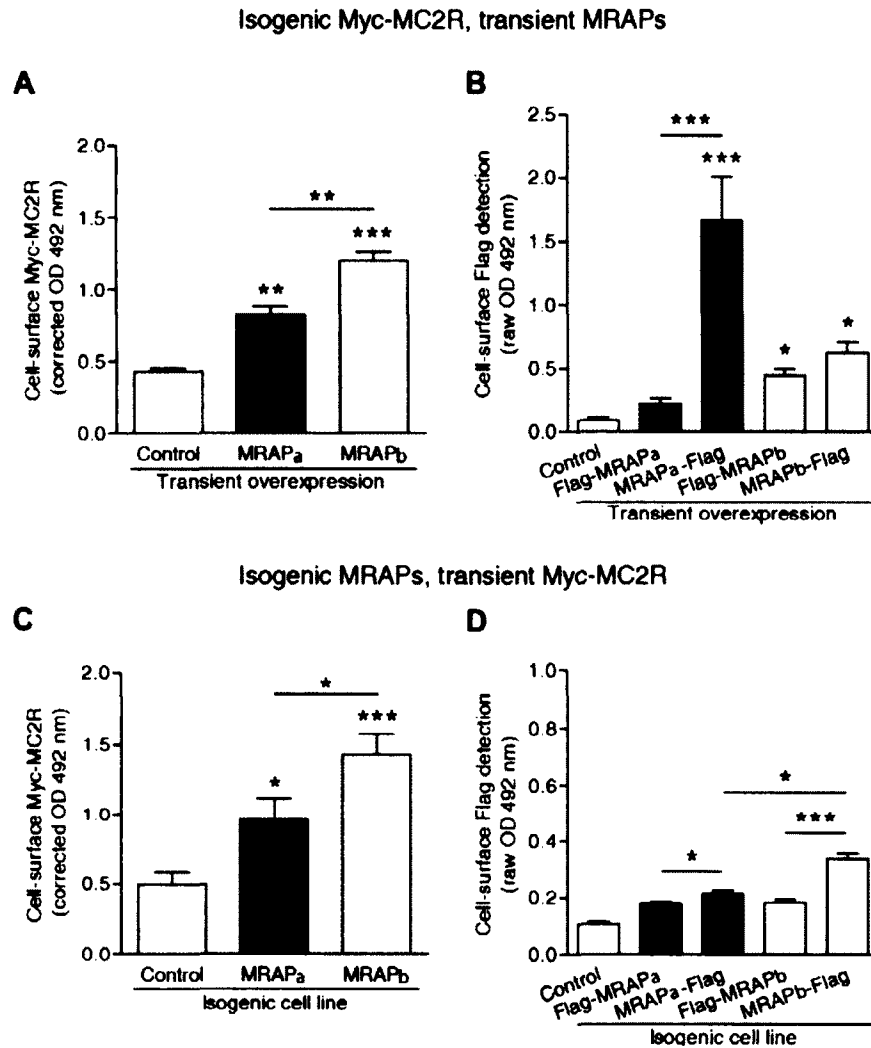
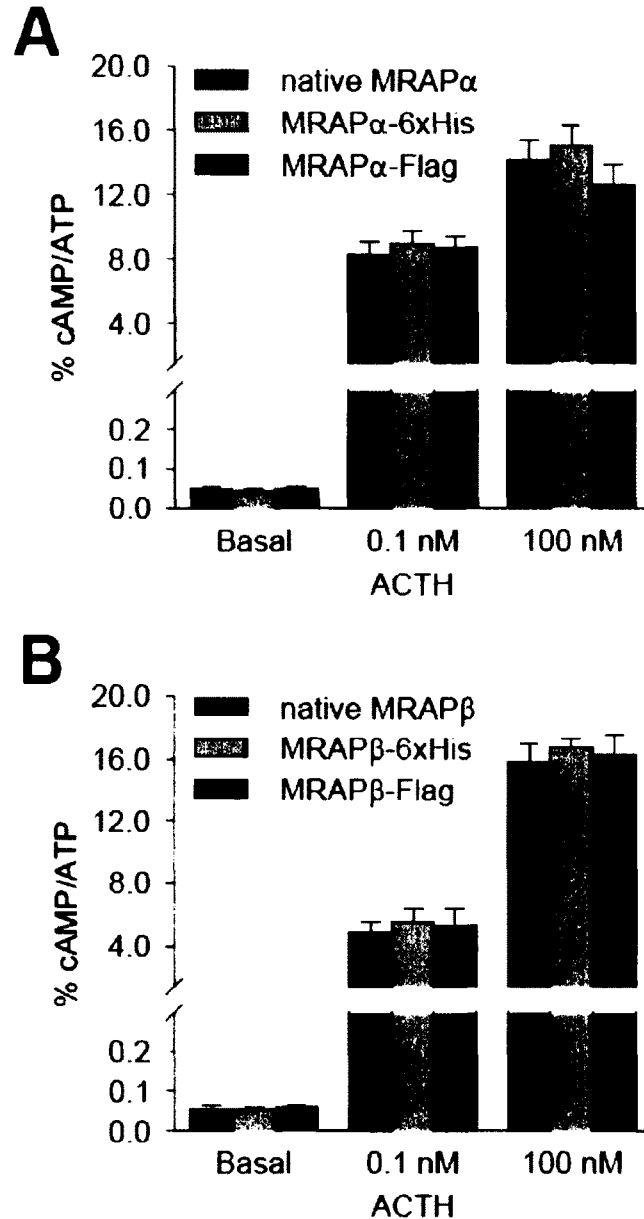
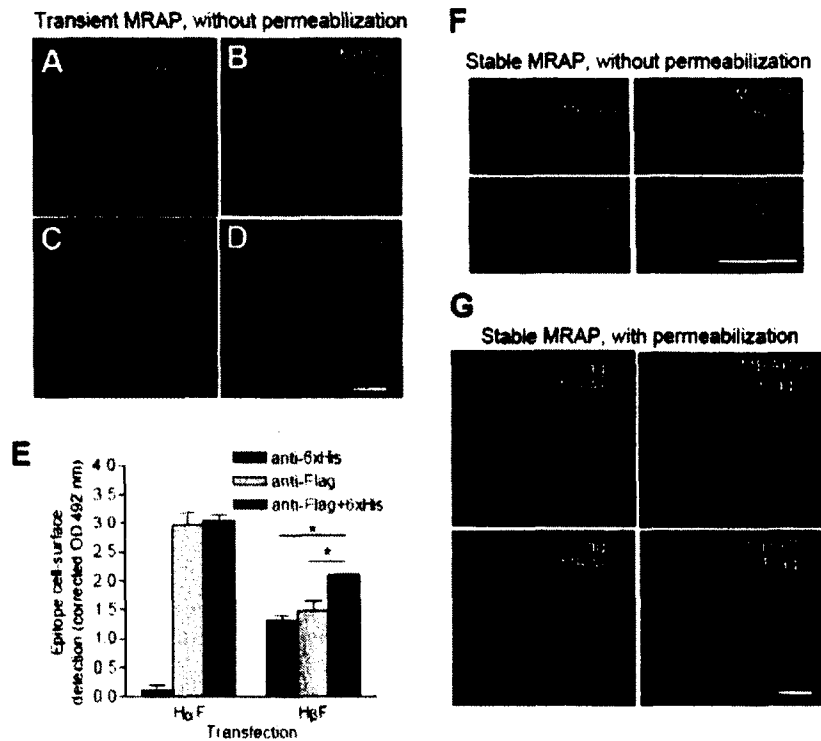


Fig. 5. Modulation of MC2R and MRAP Isoform Expression in Transient and Stable Conditions

Cell surface detection of Myc-MC2R using anti-c-Myc antibodies (A and C) and MRAP constructions using anti-Flag antibodies (B and D) was measured by cell surface ELISA as described in *Materials and Methods*. A, 293/FRT transfected with pEGFP (subtracted background OD) or stable 293/FRT/Myc-MC2R cells transiently transfected with pEGFP (control), pcDNA3/MRAP α , or pcDNA3/MRAP β were assayed for c-Myc detection. B, Epitope-tagged MRAP constructions were expressed transiently from pcDNA5/FRT/GOI vectors in 293/FRT cells (shown) or stable 293/FRT/Myc-MC2R cells (data not shown; similar results) and tested for Flag epitope detection. C, Stable 293/FRT (control), 293/FRT/MRAP α , and 293/FRT/MRAP β cells were transiently transfected with pEGFP (subtracted background OD) or pcDNA3/Myc-MC2R and assayed for c-Myc epitope detection. D, Stable 293/FRT (control), 293/FRT/Flag-MRAP α , 293/FRT/MRAP α -Flag, 293/FRT/Flag-MRAP β , and 293/FRT/MRAP α -Flag cells were assayed for cell surface Flag epitope detection. Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.001$, compared with control or indicated conditions.



Supplemental data 1. Influence of different MRAP epitope tags on MC2R functionality. 293/FRT/Myc-MC2R cells were transiently transfected with pcDNA5/FRT/MRAP α , pcDNA5/FRT/MRAP α -6xHis, pcDNA5/FRT/MRAP α -Flag (A) or corresponding MRAP β expressing plasmids (B) consisting of Flag or 6xHis in C-terminal as described in Table 2. Cyclic AMP responses were measured after incubation for 15 min with 1 μ M IBMX in the absence or in the presence of ACTH (0.1 nM and 100 nM). Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. Results indicate intact functionality for all MRAP α and MRAP β fused to 6xHis or Flag epitope tags, exhibiting similar responses to ACTH stimulation relative to their native forms. Other tagged-MRAP constructions from Table 2 were also validated for ACTH responsiveness (data not shown).



Supplemental data 2. Analysis of MRAP transient overexpression and stable isogenic expression. A-D) Transient expression of Flag-tagged MRAP isoforms performed under unpermeabilized conditions. Immunofluorescence labeling was performed as indicated in *Materials et methods*. Anti-rabbit coupled to Alexa-Fluor488 secondary antibodies were used to detect rabbit anti-flag antibodies and DAPI was used to stain nuclei. In transient conditions, and without permeabilization, only the C-terminal end of MRAP α -Flag could be detected at the cell membrane (B), whereas both Flag-MRAP β and MRAP β -Flag were detected (C, D). Results were reproduced four times. However, if cells were permeabilized prior to incubation with anti-c-Myc antibody, all tagged-MRAP constructions were detected (data not shown). E) Cell-surface detection of double-tagged 6xHis-MRAP α -Flag (H α F) and 6xHis-MRAP β -Flag (H β F) constructions by cell-surface ELISA. Primary antibodies, 6xHis-probe (1:200) and anti-Flag (1:200), were applied alone or in combination as indicated and were both detected by the same anti-rabbit secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Consistent with results from Fig. 5, 6xHis-MRAP α -Flag was not recognized by the N-terminal-directed anti-6xHis antibody. However, 6xHis-MRAP β -Flag was recognized by both anti-6xHis and anti-Flag primary antibodies simultaneously, indicating MRAP β dual orientation in transiently overexpressing conditions. In permeabilized whole cell ELISA procedures, all MRAP constructions could be detected (not shown). Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. F-G) Analysis of stable isogenic MRAP expression in immunofluorescence studies. Isogenic cell lines, 293/FRT/Flag-MRAP α , 293/FRT/MRAP α -Flag, 293/FRT/Flag-MRAP β and 293/FRT/MRAP β -Flag were processed for immunofluorescence microscopy under unpermeabilized (F) or permeabilized conditions (G). None of the N- or C-terminal Flag tags could be detected without cell permeabilization. Numbers indicate the percentage of cells expressing the protein of interest. Results were reproduced three times. Scale bar: 10 μ m.

MC2R and MRAP Isoforms Are in Close Apposition in Isogenic Cell Lines

To determine whether MC2R and MRAP isoforms were colocalized in our isogenic cell lines, immunofluorescence images were acquired from permeabilized 293/FRT/MycMC2R/MRAP α -Flag (Fig. 6, A–H) and 293/FRT/MycMC2R/MRAP β -Flag cells (Fig. 6, I–P). Cells were examined at the plane of the nuclei to visualize the border of the cell membrane and the cytoplasm (Fig. 6, panels A–D and I–L) and at the plane of cell adhesion to the coverslip to delineate an area in close proximity to the cell membrane (Fig. 6, panels E–H and M–P). At both planes, MC2R appeared both in the cytoplasm and at the plasma membrane (Fig. 6, panels A, E, I, and M). Comparison of panels A and E with panels I and M reveal that expression of MC2R was more intense at the cell membrane when combined with MRAP β expression rather than with MRAP α . These latter results are consistent with the data reported in Fig. 5, A and D, and are supported by cell surface expression of the proteins quantified in ELISA experiments (Fig. 6Q). However, as shown in the merged images and magnification insets, red and green fluorescent labels were not superimposed (Fig. 6, C and G; and magnification of the merged images, Fig. 6, panels D, H, L, and P, *arrows*). These immunofluorescence data were also supported by ELISA measurements. As shown in Fig. 6R, MRAP C termini were hardly present at the cell membrane; however, as in Fig. 5D, MRAP β appeared more abundant than MRAP α . Thus, whereas MC2R was found in high concentration at the cell surface, MRAP isoforms were expressed at low levels and appeared in the vicinity of MC2R, rather than superimposed with MC2R.

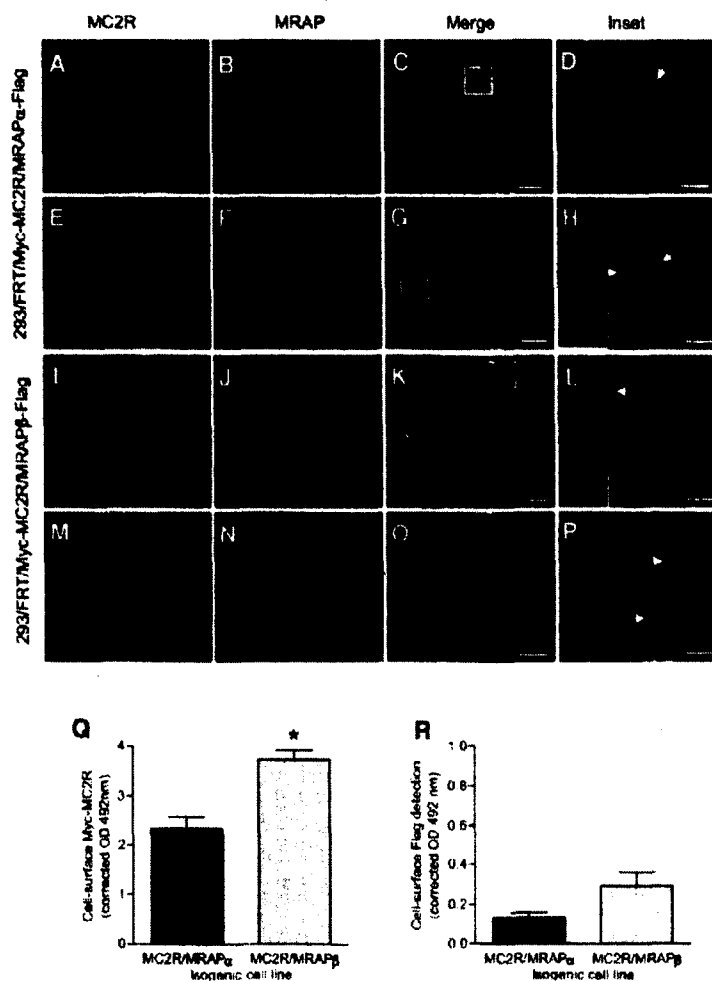


Fig. 6. Immunofluorescence Labeling of MC2R and MRAP Isoforms Expressed in Double Stable Isogenic Cell Lines

293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A–H) or 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells (I–P) were processed for immunofluorescence labeling as described in *Materials and Methods*. MC2R and MRAP were labeled with anti-c-Myc antibody and with anti-Flag, respectively, and detected using secondary antibodies coupled to Alexa-Fluor488 for Myc-MC2R (*green*) and to Alexa-Fluor594 for MRAP (*red*). *Green* and *red* signals were acquired at the nuclear plane to visualize both the outside and cytoplasmic border of the cell membranes (A–D and I–L) or at the plane of cell adhesion to the coverslip to visualize only the area in close proximity to the cell membrane (E–H and M–P). *Blue* emissions (DAPI; nuclei) are represented in their respective planes only. Images are representative illustrations of more than 100 cells from three experiments. D, H, L, and P, *Inset* magnifications (4-fold) representing a portion of the cell membrane of merged images from panels C, G, K, and O. *Scale bar*, 10 μ m or 60 μ m for *insets*. Q–R, Cell surface ELISA detection of Myc-MC2R (Q) or Flag epitopes (MRAP) (R) in double-isogenic 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells. Results represent the mean \pm SEM of three experiments, each performed in triplicate. *, $P < 0.05$, comparison between cell lines. *Scale bar*, 10 μ m for all panels, 3.6 μ m for *inset 1*, and 1.8 μ m for *inset 2*.

DISCUSSION

Using N-terminal-c-Myc-tagged human MC2R, N- and C-terminal Flag- or 6xHis-tagged MRAP α and MRAP β constructions, together with *Flp* recombinase-mediated homologous recombination in HEK293-related cells (293/FRT cell line), we were able to generate isogenic populations expressing both Myc-MC2R with either of the appropriately tagged MRAP α or MRAP β isoforms. Results demonstrate that although Myc-MC2R was inserted at the plasma membrane without MRAP assistance, functionality *i.e.* ACTH-induced cAMP production was only observed in the presence of either MRAP isoform. In contrast, the MC2R-GFP fusion protein was impaired both in cell surface expression and cAMP production, with or without the presence of MRAP isoforms, as compared with untagged- and Myc-MC2R. In addition, we provide evidence that MRAP α and MRAP β differentially regulate the cell surface density of MC2R as well as ACTH binding and coupling to cAMP production.

Herein, immunofluorescence and ELISA studies conducted on unpermeabilized Myc-MC2R expressing 293/FRT cells, exempt of endogenous MCRs, clearly indicate that the MC2R is located at the cell surface, in the absence of MRAP isoforms. The comparison between Myc-MC2R and MC2R-GFP indicates that although the C-terminal GFP fusion approach has been used successfully for several other GPCRs, including MC3R, MC4R, and β_2 -adrenergic receptors (26, 31, 32), it does not appear appropriate for the smallest human GPCR, MC2R. As previously published and confirmed in the present study, fusion of GFP in the C terminus of MC2R impairs trafficking and signaling (10, 27, 31). It is known that the integrity of MC1R's putative dileucine-like motif located in its C-terminal tail is especially important for cell surface expression (33). Mutational analysis of this motif in MC4R also confirmed its importance for cell surface expression and function (34). A similar motif, methionine-290 and isoleucine-291 in the small C-terminal tail of MC2R, may be encumbered in the MC2R-GFP fusion protein. Indeed, short N-terminal epitope tagging of MC1R, MC2R, or MC4R does not affect receptor trafficking or function (13, 19, 35).

Transfection of human MC2R with human MRAP isoforms induces cAMP production after ACTH stimulation, as previously described with mouse Mrap by Metherell *et al.* (23). In their study, Metherell *et al.* showed an interaction between Mrap and Mc2r-GFP and the functional consequence of these interactions in terms of ACTH responsiveness. Functionality was obtained in the SK-N-SH cell line, which expresses endogenous MCRs, with a single ACTH concentration (1 μ M) and in the presence of IBMX (10 μ M), both of which were 10-fold higher than the concentrations used in the present study. In a recent study, using M3 cells transfected with Myc-MC2R, we obtained EC₅₀ values ranging from 7.6 nM to 11.9 nM, with maximal stimulation ranging from 20.9 \pm 0.7 to 24.7 \pm 0.7-fold increase over basal cAMP levels, which are also low compared with *in vivo* or *in vitro* situations with primary adrenocortical cells (36, 38, 39). Thus, importantly, the present results are the first to reproduce dose-responses curves of ACTH-induced cAMP production exhibiting properties similar to that previously described in primary cultures of human glomerulosa and fasciculata adrenocortical cells (36). Indeed, in isolated or cultured adrenocortical cells, ACTH stimulation is initiated at a low physiological threshold (pM range), with high maximal stimulation (\leq 60-fold over control) (37); for review see 4 and 5). Thus, the reconstituted cell model described herein is able to reproduce a physiological system.

Measurements of membrane expression by ELISA, together with immunofluorescence studies, corroborate ACTH binding capacities and indicate that MRAP isoforms confer small but significantly different densities of MC2R at the plasma membrane. Furthermore, binding studies indicate that MRAP α provides slightly higher affinity (2-fold) for ACTH binding to MC2R than MRAP β . As a result, dose-response curves reveal greater sensitivity (4-fold) to ACTH stimulation in MRAP α -expressing cells comparatively to MRAP β -expressing cells, whereas maximal responses are higher in MRAP β -expressing cells (1.4-fold). Although the difference in EC₅₀ values and maximal responses from cAMP experiments were modest, our data provide evidence that MRAP isoforms differentially modulate MC2R cell-surface expression and ACTH binding, hence affecting cAMP response both in amplitude and sensitivity.

In contrast to MC2R, MRAP isoforms C termini were present at limited levels at the plasma membrane in isogenic conditions. Moreover, MC2R is not in a functional state unless it is in the vicinity of MRAP α or MRAP β . These results suggest that, in addition to promoting greater MC2R density at the surface of cells, MRAP isoforms may also promote cell surface expression of proteins essential for coupling, such as guanyl nucleotide-binding regulatory protein subunits β and γ , which are involved in ACTH responsiveness and adenylyl cyclase type 2 or 4 expression (40, 41). MRAP isoforms may also be components of a scaffold complex. For example, components of lipid rafts regulate adenylyl cyclase type 5 or 6 activity (42), which are major adenylyl cyclases involved in ACTH/MC2R signaling pathways and adrenal steroidogenesis (43, 44). As reported for other receptors (30, 45, 46), molecular determinants within MC2R, including allosteric interaction and/or regulation with accessory proteins (47), are probably essential for cell surface expression and signal transduction of MC2R (48).

The advantages of the novel model described herein as a human expression system of Myc-MC2R and MRAP isoforms, compared with the M3 cell line for example, can be summarized as follows: 1) the model eliminates possible cross-regulation by endogenous Mc1r receptors expressed in M3 cells, especially because MC1R is known to heterodimerize (19); 2) it eliminates the risk of discrepancies observed when using cell lines of murine origin (*i.e.* Y6 and M3 cells) in which endogenous mouse Mrap may not be as efficient as human MRAP isoforms in enabling human MC2R function; 3) it allows flexible control over transient *vs.* stable expression of either MC2R, MRAP α , MRAP β , or other genes of interest; 4) the model is adaptable to polycistronic vectors and allows the integration of at least two genes at a single and transcriptionally active genomic locus which, in the case of MC2R and MRAP isoforms, is necessary to achieve functional expression; and 5) Flp-In cell line generation takes no more than 2 wk, achieving rapid and efficient stable isogenic expression.

In summary, the present results clearly indicate that although MC2R is inserted at the plasma membrane without MRAP assistance, human MRAP α and MRAP β isoforms

differentially modulate the functional properties of ACTH receptors in a fashion that appears isoform dependent. In addition, careful consideration should be taken when using MCR carboxy terminus modifications such as MC2R-GFP. From a physiological standpoint, the slight but significant differences observed in EC_{50} values for either MC2R/MRAP α - or MC2R/MRAP β -expressing cells may reflect an indirect regulation of ACTH-induced steroidogenesis during adrenal gland adaptation to various situations or hormonal stimulations. Indeed, the sensitivity of the MC2R system to raise cAMP levels in response to ACTH is a critical step in the initiation of steroidogenesis by adrenal cells (reviewed in Ref. 9). MC2R/MRAP α and MC2R/MRAP β combinations may regulate steroidogenesis differently at low physiological (pM range) or high (nM range) ACTH concentrations, such as in stressful situations (3).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR) for providing us with the human MC2R cDNA; to Dr. Helgi B. Schiöth (Department of Neuroscience, Uppsala University, Uppsala, Sweden) for the MC2R-GFP fusion protein; and to Dr. Michel Bouvier (Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) for providing us with the anti-Myc antibody. Special thanks to Lucie Chouinard for technical assistance and to Zuzana Kilianova for assistance and helpful discussions. We also thank Claude Roberge and Dr. Marcel D. Payet, from the Department of Physiology and Biophysics, for their invaluable stimulating discussions regarding this project.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The human MC2R cDNA (GenBank accession no. X365633) was provided by Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR) and the MC2R-GFP fusion protein by Dr. Helgi B. Schiöth (Department of Neuroscience, Uppsala University, Uppsala, Sweden). Cell culture reagents used in this study were purchased as follows: high-glucose DMEM, fetal bovine serum, GlutaMAX, and Zeocin from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). The RNAqueous-4PCR system and DNase I were from Ambion (Austin, TX). Superscript II RNase H reverse transcriptase, primers, antibiotics, the Flp-In system, 293/FRT cells, Lipofectamine PLUS reagent, and the pcDNA3 vector were from Invitrogen. Deoxynucleotide triphosphates were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfé, Quebec, Canada) and the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System polymerase from Roche Applied Sciences (Laval, Quebec, Canada). Restriction endonucleases, modifying enzymes, Standard Taq DNA polymerase, and endoglycosidase H were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA); plasmid DNA purification kits and gel extraction kits were from QIAGEN, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada). The pGEM T-easy kit was purchased from Promega Corp. (Madison, WI) and pEGFP from CLONTECH Laboratories, Inc. (Mountain View, CA). ACTH (1–24) was purchased from Organon (Toronto, Ontario, Canada) and ACTH (1–39) from Novartis (Boucherville, Quebec, Canada). IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), cAMP, ATP, forskolin, and NDP-MSH were from Sigma (Oakville, Ontario, Canada); [³H]adenine (25 Ci/mmol) was from PerkinElmer (Boston, MA). [¹²⁵I]iodotyrosyl₁₂₃-ACTH (1–39) (2000 Ci/mmol) was from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). The mouse monoclonal anti-Myc antibody clone 9E10 was obtained from Dr. Michel Bouvier (Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada); the anti-6xHis rabbit polyclonal antibody (H15 probe) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) and the anti-Flag rabbit polyclonal antibody from Sigma. Goat antimouse or antirabbit coupled to Alexa-Fluor488 or Alexa-Fluor594 as well as DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) were purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) and

Vectashield from Vector Laboratories, Inc. (Burlington, Ontario, Canada); secondary antibody coupled to horseradish were from GE Healthcare (Baie d'Urfé, Quebec, Canada). All other chemicals were of grade A purity.

MRAP α and MRAP β Expression, Cloning, and Plasmid Constructions

Human adrenal glands were prepared as previously described (36, 49). Both fetal and adult projects were approved by the Human Subject Review Committee of our institution. Total RNA, from a fetal adrenal gland (18 wk old) and from zona glomerulosa and zona fasciculata from a 46-yr-old donor, were extracted and treated with DNase I using the RNAqueous-4PCR system, followed by first-strand cDNA synthesis using Superscript II RNase H reverse transcriptase as recommended by the manufacturers.

Total RNA from human fetal adrenal glands was used for cloning human MRAP α and β isoforms. The entire coding sequences were amplified by PCR with the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System polymerase using a common forward primer and isoform-specific reverse primers. The PCR products were cloned in pGEM, pcDNA3, and pcDNA5/FRT (*Flp* recombinase target) vectors. The Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System was used to generate different N- and/or C-terminal epitope-tagged MRAP α and - β constructions. Two different small epitope tags, Flag and 6xHis, were used. *SpeI*-Kozak-epitope-MRAP-*XbaI* or *SpeI*-Kozak-MRAP-epitope-*XbaI* cDNA sequences were amplified from pcDNA3/MRAP α and pcDNA3/MRAP β native templates, respectively. The PCR products were purified, digested, and cloned into pcDNA5/FRT, thus yielding constructions with MRAP α or β fused at either N or C terminus to the Flag (NYDDDDKC) or 6xHis (GGSHHHHHH) epitope tags with preceding initiation codon (M: methionine) when required. Double tagged constructions with MRAP α or - β fused at N terminus to 6xHis tag and at C terminus to Flag tag were also produced. mRNA expression of MRAP isoforms in 293/FRT cells and in human fetal and adult adrenal glands was assessed by classical RT-PCR analysis using Standard Taq DNA polymerase with the same primers as for cloning.

The human MC2R cDNA was provided by Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University) in pcDNA1. This cDNA and our previously described pcDNA3/c-Myc-hMC2R construction (13) were cloned from pcDNA3 to pcDNA5/FRT using restriction endonucleases and named pcDNA5/FRT/untagged-MC2R and pcDNA5/FRT/Myc-MC2R, respectively. The human MC2R-GFP cDNA was provided in the pCEP4 vector by Dr. Helgi B. Schiöth (Department of Neuroscience, Uppsala University, Uppsala, Sweden). The bicistronic pcDNA5/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag and pcDNA5/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag vectors encode two proteins of interest, Myc-MC2R and one or the other of the MRAP isoforms tagged in C terminus with the Flag epitope. They were created using DNA primers designed to amplify *SphI*-TATA box-cytomegalovirus-GOI-polyA-*SphI* sequences by PCR with a high fidelity DNA polymerase (Expand High Fidelity^{PLUS}) from the pcDNA5/FRT-MRAP α -Flag and pcDNA5/FRT/MRAP β -Flag vectors as templates. The PCR products were digested and cloned into pcDNA5/FRT/Myc-MC2R cut at the *SphI* site located past the poly-A signal. All plasmid constructions were confirmed by DNA sequencing (Service de Séquençage, IPS, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke). All primer sequences are found in Table 1 and MRAP constructions are summarized in Table 2. In general, DNA/protein sequences, names of genes, constructions, plasmids or cell lines cited are always read from 5'/N terminus to 3'/C terminus. For example, the name of an epitope tag precedes the name of a gene of interest (GOI)/protein when tag is located in 5'/N terminus and it follows the name of the GOI/protein when tag in 3'/C terminus.

3. Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF 2004 Minireview: glucocorticoids—food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 145:2633–2638
4. Clark AJ, Cammas FM 1996 The ACTH receptor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10:29–47
5. Penhoat A, Naville D, Begeot M 2001 The adrenocorticotrophic hormone receptor. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 8:112–117
6. Schioth HB 2001 The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam Horm* 63:195–232
7. Abdel-Malek ZA 2001 Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* 58:434–441
8. Gantz I, Fong TM 2003 The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E468–E474
9. Gallo-Payet N, Payet MD 2003 Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61:275–287
10. Noon LA, Franklin JM, King PJ, Goulding NJ, Hunyady L, Clark AJ 2002 Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol* 174:17–25
11. Naville D, Barjhoux L, Jaillard C, Faury D, Despert F, Esteva B, Durand P, Saez JM, Begeot M 1996 Demonstration by transfection studies that mutations in the adrenocorticotropin receptor gene are one cause of the hereditary syndrome of glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1442–1448
12. Naville D, Barjhoux L, Jaillard C, Saez JM, Durand P, Begeot M 1997 Stable expression of normal and mutant human ACTH receptor: study of ACTH binding and coupling to adenylate cyclase. *Mol Cell Endocrinol* 129:83–90
13. Kilianova Z, Basora N, Kilian P, Payet MD, Gallo-Payet N 2006 Human MC2R expression and functionality. Effect of PKA and PKC on desensitization and internalization. *Endocrinology* 147:2325–2337
14. Weber A, Kapas S, Hinson J, Grant DB, Grossman A, Clark AJ 1993 Functional characterization of the cloned human ACTH receptor: impaired responsiveness of a mutant receptor in familial glucocorticoid deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 197:172–178
15. Elias LL, Huebner A, Pullinger GD, Mirtella A, Clark AJ 1999 Functional characterization of naturally occurring mutations of the human adrenocorticotropin

receptor: poor correlation of phenotype and genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2766–2770

16. Fluck CE, Martens JW, Conte FA, Miller WL 2002 Clinical, genetic, and functional characterization of adrenocorticotropin receptor mutations using a novel receptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4318–4323

Terrillon S, Bouvier M 2004 Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5:30–34

17. Maggio R, Novi F, Scarselli M, Corsini GU 2005 The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J* 272:2939–2946

18. Sanchez-Laorden BL, Sanchez-Mas J, Martinez-Alonso E, Martinez-Menarguez JA, Garcia-Borrón JC, Jimenez-Cervantes C 2006 Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J Invest Dermatol* 126:172–181

19. Mandrika I, Petrovska R, Wikberg J 2005 Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 326:349–354

20. Dhillon W, Small C, Gardiner J, Bewick G, Whitworth E, Jethwa P, Seal L, Ghatei M, Hinson J, Bloom S 2003 Agouti-related protein has an inhibitory paracrine role in the rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 31:102–107

21. Doghman M, Delagrangé P, Blondet A, Berthelon M, Durand P, Naville D, Begeot M 2004 Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control. *Endocrinology* 145:541–547

22. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJ 2005 Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 37:166–170

23. Xu A, Choi KL, Wang Y, Permana PA, Xu LY, Bogardus C, Cooper GJ 2002 Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1161–1167

24. Forti FL, Dias MH, Armelin HA 2006 ACTH receptor: Ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem* 293:147–160

25. Blondet A, Doghman M, Rached M, Durand P, Begeot M, Naville D 2004 Characterization of cell lines stably expressing human normal or mutated EGFP-tagged MC4R. *J Biochem (Tokyo)* 135:541–546

26. Rached M, El Mourabit H, Buronfosse A, Blondet A, Naville D, Begeot M, Penhoat A 2005 Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides* 26:1842–1847
27. O’Gorman S, Fox DT, Wahl GM 1991 Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251:1351–1355
28. Sauer B 1994 Site-specific recombination: developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* 5:521–527
29. Mizrachi D, Segaloff DL 2004 Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol Endocrinol* 18:1768–1777
30. Rached M, Buronfosse A, Durand P, Begeot M, Penhoat A 2003 Stable expression of human melanocortin 3 receptor fused to EGFP in the HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306:208–212
31. Hynes T, Mervine S, Yost E, Sabo J, Berlot C 2004 Live cell imaging of Gs and the β 2-adrenergic receptor demonstrates that both α s and β 1 γ 7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the β 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 279:44101–44112
32. Sanchez-Mas J, Sanchez-Laorden BL, Guillo LA, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borron JC 2005 The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* 26:1848–1857
33. VanLeeuwen D, Steffey ME, Donahue C, Ho G, MacKenzie RG 2003 Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal di-isoleucine sequence at codons 316/317. *J Biol Chem* 278:15935–15940
34. Tao YX, Segaloff DL 2005 Functional analyses of melanocortin-4 receptor mutations identified from patients with binge eating disorder and nonobese or obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5632–5638
35. Gallo-Payet N, Grazzini E, Côté M, Bilodeau L, Chorvatova A, Payet MD, Chouinard L, Guillon G 1996 Role of calcium in the mechanism of action of ACTH in human adrenocortical cells. *J Clin Invest* 98:460–466
36. Gallo-Payet N, Escher E 1985 Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 117:38–46
37. Gallo-Payet N, Payet MD 1989 Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J Endocrinol* 120:409–421

38. Lebrethon MC, Naville D, Begeot M, Saez JM 1994 Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest* 93:1828–1833
39. Qiu R, Frigeri C, Schimmer BP 1998 A role for guanyl nucleotide-binding regulatory protein β - and γ -subunits in the expression of the adrenocorticotropin receptor. *Mol Endocrinol* 12:1879–1887
40. Rui X, Al-Hakim A, Tsao J, Albert PR, Schimmer BP 2004 Expression of adenylyl cyclase-4 (AC-4) in Y1 and forskolin-resistant adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol* 215:101–108
41. Ostrom RS, Bunday RA, Insel PA 2004 Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. *J Biol Chem* 279:19846–19853
42. Shen T, Suzuki Y, Poyard M, Best-Belpomme M, Defer N, Hanoune J 1997 Localization and differential expression of adenylyl cyclase messenger ribonucleic acids in rat adrenal gland determined by *in situ* hybridization. *Endocrinology* 138:4591–4598
43. Côté M, Guillon G, Payet M, Gallo-Payet N 2001 Expression and regulation of adenylyl cyclase isoforms in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4495–4503
44. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM 1998 RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333–339
45. Conner AC, Simms J, Howitt SG, Wheatley M, Poyner DR 2006 The second intracellular loop of the calcitonin gene-related peptide receptor provides molecular determinants for signal transduction and cell surface expression. *J Biol Chem* 281:1644–1651
46. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A 2006 Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1–51
47. Metherell LA, Chan LF, Clark AJ 2006 The genetics of ACTH resistance syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:547–560
48. Chamoux E, Breault L, Lehoux J-G, Gallo-Payet N 1999 Involvement of AT2 receptor of angiotensin II in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4722–4730
49. Liu W, Xiong Y, Gossen M 2006 Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells. *J Mol Med* 84:57–64

Chapitre 3

3.2 Rôles des parties C-terminales des isoformes MRAP1.

Titre : The C-terminal Domain of Melanocortin-2 receptor Accessory Proteins 1 (MRAP1) Determine their Localization and Fine-Tunes ACTH-Induced Signaling.

Auteurs : Simon Roy, Sébastien J. Roy, Maria Josep Agulleiro, José Miguel Cerdá-Reverter, Jean-Luc Parent and Nicole Gallo-Payet

Statut : Soumis à Molecular and Cellular Endocrinology le 14 octobre 2011.

Avant-propos : J'ai eu l'idée de cet article. J'ai effectué toutes les expériences moi-même et parfois avec l'aide de Lucie Chouinard, la technicienne du laboratoire. Les expériences d'immunoprécipitations ont été réalisées par Sébastien J. Roy, étudiant PhD du laboratoire de Jean-Luc Parent. J'ai écrit le manuscrit en entier et le Pr Gallo-Payet ainsi que les collègues co-auteurs ont largement contribué à la révision de l'article. La contribution de Maria Josep Agulleiro et de José Miguel Cerdá-Reverter se limite au fait que dans cet article nous utilisons des constructions MRAP1 et MC2R provenant de leur laboratoire. José Miguel Cerdá-Reverter a aussi revu le manuscrit une fois écrit en entier.

topologie de type II ($N_{\text{cyto}}-C_{\text{exo}}$) au niveau de la membrane plasmique mais adopte une double topologie dans les compartiments intracellulaires. Fonctionnellement, la production d'AMPc et la phosphorylation p44/p42^{mapk} mesurées en présence du MC2R humain ou du poisson zèbre indiquent que les réponses maximales sont régies par le niveau d'expression de MC2R, elle-même dictée par chaque MRAP1 testé. En retour, la puissance de l'ACTH à induire la production d'AMPc est spécifique à chaque MRAP1 utilisée, et donc à chaque domaine C-terminal. Avec les deux MC2Rs testés, MRAP1 du poisson zèbre induit la réponse la plus puissante. La puissance la plus faible a été obtenue en absence de domaine C-terminal (MRAPdCT). L'ajustement fin de l'activité de MC2R et de la réponse à l'ACTH sont donc dépendants des domaines C-terminaux des MRAP1s. Somme toute, l'étude de la régulation de l'expression des MRAPs et de leurs localisations semble suggérer un rôle de régulation dans d'autres aspects de la physiologie cellulaire que celle liée à l'ACTH.

ABSTRACT

ACTH binding to the human melanocortin-2 receptor (MC2R) requires the presence of an MRAP1 isoform, MRAP α or MRAP β , which differ in their C-terminal domains. This study evaluated the role of different MRAP1 C-terminal domains in regard to their cellular localization, interaction with MRAP2, topology and function with MC2R. Expressed stably in 293/FRT cells, MRAP α was preferentially associated with pre-Golgi structures while MRAP β was primarily associated with post-Golgi compartments. MRAPdCT, a truncated form of MRAP1 containing only the conserved N-terminal domain, was localized at the Golgi apparatus, indicating that the sorting of full-length MRAP1 isoforms occurs at the Golgi apparatus and is dictated by the C-terminal domain of MRAP1. MRAP2 and MC2R enhanced the expression of MRAP1 isoforms and *vice versa*. MRAP2 and MC2R also enhanced MRAP1 expressions at the plasma membrane. Likewise to MRAP β , MRAPdCT exhibited dual-topology at the plasma membrane. In contrast, MRAP α exhibited only type II topology ($N_{\text{cyto}}/C_{\text{exo}}$) at the plasma membrane while adopting dual-topology in intracellular compartments. Functional cAMP production and p44/p42^{mapk} phosphorylation assays performed in the presence of human or zebrafish

MC2R indicated that maximal responses were governed by MC2R expression which was different for each MRAP1 isoform tested. In turn, ACTH potencies were specific to each C-terminal domain. For both MC2Rs tested, zebrafish MRAP1 induced the strongest and MRAPdCT the lowest ACTH potency. This type of modulation of ACTH potency and efficacy for MC2R may play an important role in the finely-tuned regulation of glucocorticoid secretion, necessary to maintain glucose, lipid, and general homeostasis.

INTRODUCTION

ACTH is the major stimulus of the adrenal cortex, having acute and chronic effects on both steroid synthesis and secretion (1, 2) and exhibits an important trophic action (3). The effects of ACTH are mediated through its receptor called melanocortin-2 receptor (MC2R) (4). As in the case of all known melanocortin receptors, MC2R is coupled to cAMP production as main second messenger (5) (for review see (6). However, MC2R requires the presence of MC2R accessory proteins (MRAP) for its functional expression (7-9). MC2R mRNA is mainly synthesized in the adrenal cortex although low expression levels have also been detected in adipose tissue (4, 10). Whereas MRAP expression is more widespread (7) its role in extra-adrenal tissues is not yet understood.

MRAPs are single-passing membrane proteins first identified in adipocytes following differentiation of mouse 3T3-L1 fibroblasts (11). MRAP was found to be essential for ACTH signaling since some patients with an intact MC2R but a mutated MRAP gene exhibited familial glucocorticoid deficiency (OMIM 202200) (7). To date, two types of MRAPs have been identified, namely MRAP (MRAP1) and MRAP2. Humans possess two MRAP1 isoforms (MRAP α and MRAP β) and one MRAP2, whereas zebrafish express only one MRAP1 (zfMRAP1) and two different MRAP2s (zfMRAP2a and zfMRAP2b) (12). MRAP1s are involved in trafficking and signaling of MC2R while MRAP2s appear to be solely involved in MC2R trafficking to the plasma membrane (12-14).

Human MRAP α is produced from exons 3, 4 and 5, and yields a 172-amino acid protein whereas MRAP β is translated alternatively from exons 3, 4 and 6 and results in a 102-amino acid protein (7, 11). Both human MRAP1 isoforms share the same N-terminus and transmembrane domain plus a few other amino acids (1-68) while most of their C-terminal domains arise from the alternative splicing of MRAP transcripts (69-n). Orthologs of MRAP1 have a strong amino acid identity in their N-terminal domains while their C-termini are completely species-specific (12). The only human MRAP2 known to date is a 205 amino acids protein (14, 15). MRAP2 proteins lack the LDYI motif in their N-terminal domain which is believed to be essential for ACTH signaling (14). Recent studies also indicate a role for MRAP1 and MRAP2 in regulating the activity of certain other melanocortin receptors such as MC5R (12, 15, 16).

MRAPs have an unusual membrane-spanning topology. It was first reported that mouse MRAP1 exhibits a N_{cyto}/C_{exo} spanning-membrane topology (type II) (11). Previous studies in our laboratory reported that MRAP α adopted a type II topology in cell-surface enzyme-linked immunoassays (ELISA), as opposed to MRAP β which exhibited both N_{exo}/C_{cyto} (type I) and type II topologies (8). Subsequently, Sebag and Hinkle demonstrated that mouse MRAP1 formed antiparallel homodimers, supporting the notion of dual-topology proteins in mammalian cells (9). The topology in which a transmembrane protein spans a bilipidic cell membrane has a critical repercussion on the functional domains of a protein that can interact with other proteins, lipids or molecules localized on either side of cell membranes. Obtaining such general information on human MRAP isoforms is therefore important for the understanding of ACTH signaling.

MRAP isoforms confer different functional properties to MC2R (8). Higher binding capacity and maximal ACTH-stimulated cAMP production are reflected from the higher occupancy of MC2R at the cell surface in the presence of MRAP β rather than MRAP α when expressed in HEK 293/FRT cell line. In opposition, ACTH potency is stronger with MRAP α than with MRAP β (8, 13). More recently, 293/FRT cells were

found to endogenously express a low level of MRAP2 mRNA (12, 13). Therefore, this human cell line represents a useful model for studying ACTH signaling because all MRAP proteins can be expressed in these cells. In addition, this model reproduces concentration-response curves of ACTH-induced cAMP production obtained in primary cultures of human and rat adrenocortical cells (17, 18).

Thus, based on present knowledge of human MC2R and MRAP isoforms, the aim of the present study was to investigate the role of the C-terminal domains of MRAP proteins with regard to their cellular localization, membrane-spanning topology and function with MC2R in 293/FRT cells. To achieve this objective, we developed a truncated version of MRAP named MRAPdCT, which includes only the conserved domain between human MRAP1 isoforms (amino acids 1 to 68), as compared to other deleted forms previously described, namely mouse MRAPct (9) and MRAP-CT (Δ 62-172) (19). In addition, zfMRAP1 and zebrafish MC2R (zfMC2R) were used to illustrate the functional impact of the different C-terminal domains on ACTH signaling.

RESULTS

Structure of human MRAP1

This N-terminal domain of human MRAP1 isoforms (1-68) is very well conserved among species (12) and, as determined with NetNGlyc 1.0, contains two putative sites for N-glycosylation (N3 and N6). The remaining C terminal region of the human MRAP1 sequences (69-n) is encoded by different exons for both isoforms (7, 11). Human MRAP α and MRAP β isoforms do not share more than 3 single amino acids in their spliced C-terminal domains and, as determined with NetOGlyc 3.1, MRAP α but not MRAP β , possesses five sites suitable for O-glycosylation. The C-terminal domains of MRAP1s display a low degree of evolutionary conservation suggesting unfunctionality or isoform- and species-specific functions (12). Thus, the equivalent of the human N-terminal conserved domain ((MRAP1 (1-68))) was engineered with an N-terminal 6xHis and a C-

terminal Flag tag (MRAPdCT, Fig.1) in order to delineate the role of the C-terminal domain in MRAP and MC2R functions.

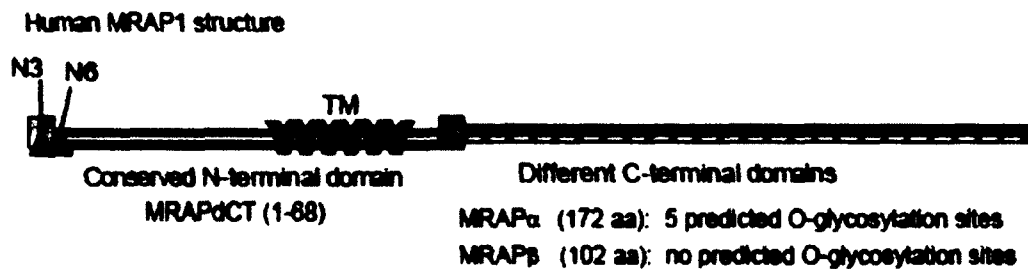


FIG 1. Structure of MRAP1. General schematic representation of human MRAP1 isoforms. The N-terminal domain of MRAP1 (amino acids 1-68; light green) is conserved among vertebrates and is equivalent to MRAPdCT. N3 and N6 indicate the predicted sites for N-glycosylation (red triangles). The transmembrane domain (dark green; amino acids 38-60) is represented as a green helix. The C-terminal domains (69-n) are different for each MRAP1 isoform. The amino acid composition of amino acids 69 to 172 is specific for MRAP α and 69 to 102 for MRAP β . The C-terminal domain of MRAP α contains 5 predicted O-glycosylation sites and none for MRAP β .

Subcellular localization of human MRAP1 isoforms

The respective localizations of MRAP α , MRAP β and MRAPdCT in cells stably expressing these proteins individually (in the absence of MC2R) were investigated by confocal microscopy using C-terminally Flag-tagged MRAPs. MRAP α colocalized with protein disulfide isomerase (PDI) (Fig. 2A), a marker of the endoplasmic reticulum while a low proportion was colocalized with giantin (Fig. 2B), a cisternae component of the Golgi apparatus. Additionally, MRAP α was strongly colocalized with GTPase Rab1 (a marker for the endosomal transport between the Golgi and endoplasmic reticulum) (Fig. 2C) but not with β_2 AR (β_2 -adrenergic receptor; a receptor known to be expressed at the plasma membrane) (Fig. 2D). On the other hand, MRAP β poorly colocalized with either PDI (Fig. 3A) or Rab1 (Fig. 3C) and a low proportion colocalized with giantin (Fig. 3B). MRAP β was mostly found closely localized with β_2 AR at the plasma membrane and in intracellular structures (Fig. 3D). In sharp contrast, the truncated MRAP1, MRAPdCT, was mostly colocalized with the Golgi marker giantin (Fig. 4B), Rab1 (Fig. 4C), and with

PDI in perinuclear regions (Fig. 4A) but not with β_2 AR at the plasma membrane (Fig. 4D). Thus, MRAPdCT appeared to possess hybrid localization between MRAP α and MRAP β . Furthermore, immunofluorescence studies with cytoskeletal elements such as β -actin, α -tubulin, vimentin and with other organelles such as mitochondria did not yield any other positive colocalization (Supplementary Fig. 1).

The possibility that MRAP1s are also localized in trafficking endosomes was investigated through labeling of different types of endosomes such as recycling (Rab4), endocytic (Rab5), late (Rab7) and perinuclear endosomes (Rab11) (20). A fraction of MRAP α was colocalized with Rab11 and Rab7 and very little with Rab4 and Rab5 (Fig. 5A). In contrast, MRAP β was found to colocalize with Rab4, Rab5 and Rab11 (Fig. 5B). Altogether, MRAP isoforms appear to be sorted differentially at the level of the Golgi apparatus, i.e. MRAP α to pre-Golgi structures and MRAP β to post-Golgi compartments.

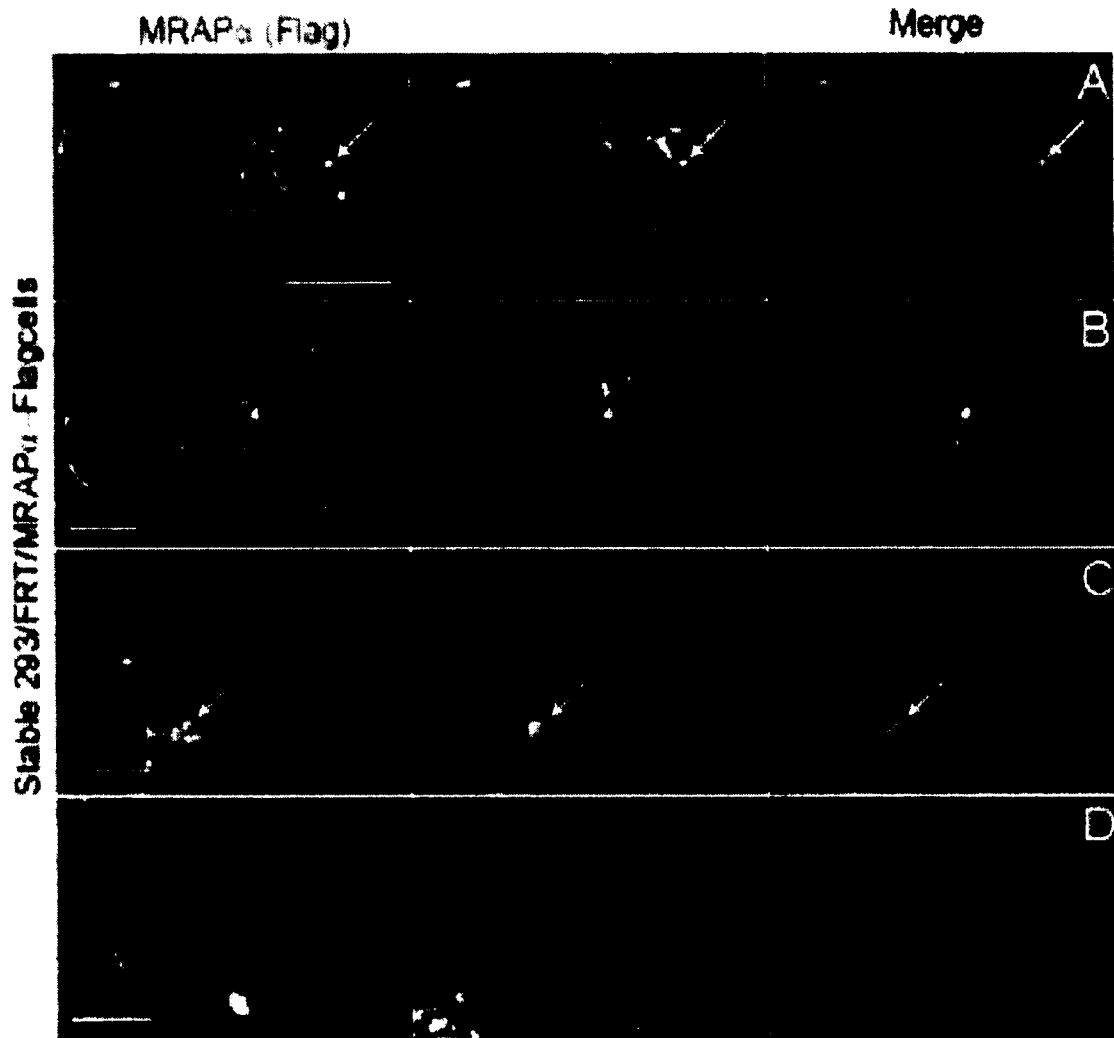


FIG.2. Influence of the C-terminal domain of MRAP α on its localization. Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAP α -Flag in the absence of human MC2R labeled for MRAP α (Flag tag) and the endoplasmic reticulum (ER) or Golgi cisternae with specific antibodies or labeled by transient transfection of Rab1-EGFP for ER-to-Golgi endosomes. Images are representative of three independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars: 10 μ m. Arrows point to colocalization (yellow pseudo-color).

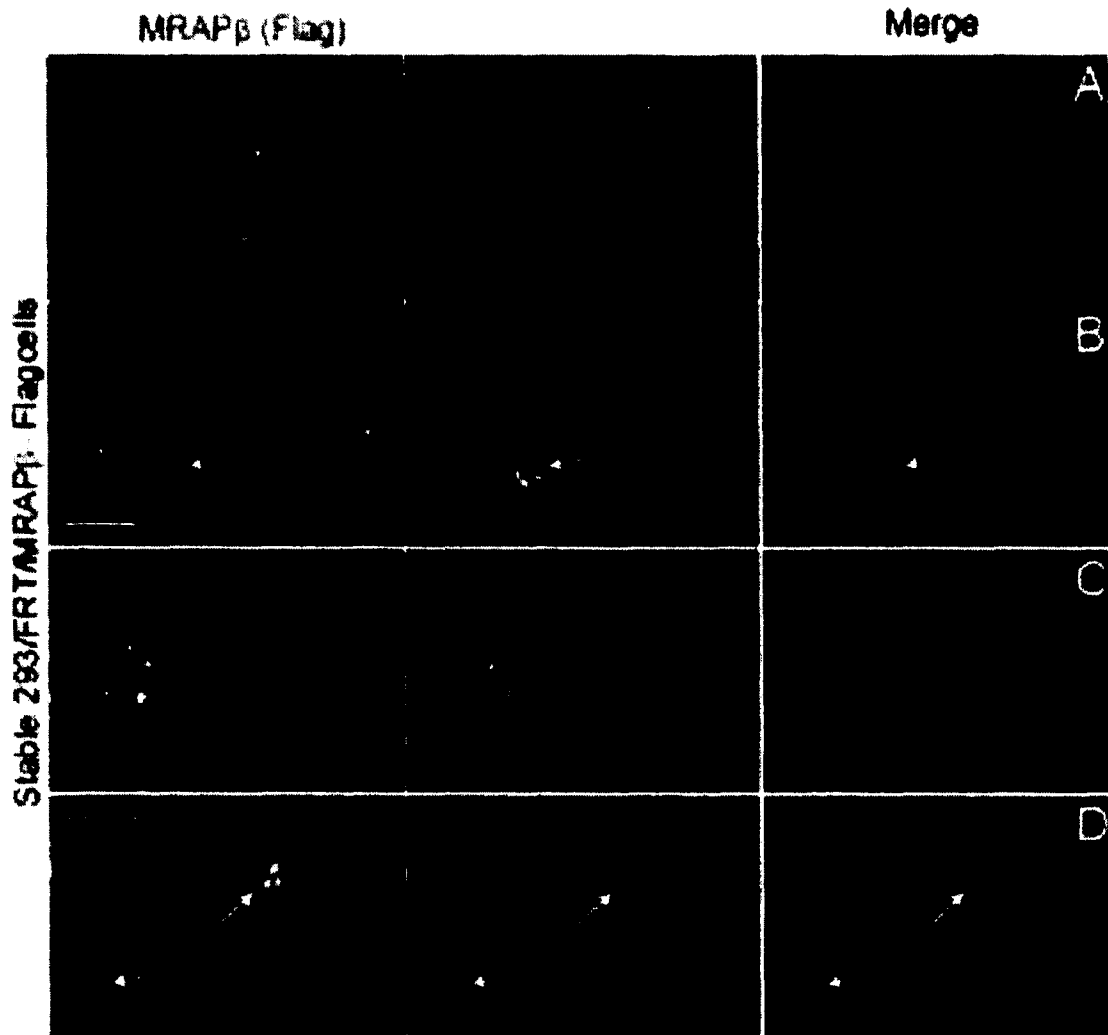


FIG. 3. Influence of the C-terminal domain of MRAP β on its localization. Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAP β -Flag (C) in the absence of human MC2R labeled for MRAP β (Flag tag) and the endoplasmic reticulum (ER) or Golgi cisternae with specific antibodies or labeled by transient transfection of Rab1-EGFP for ER-to-Golgi endosomes. Images are representative of three independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars: 10 μ m. Arrows point to colocalization (yellow pseudo-color).

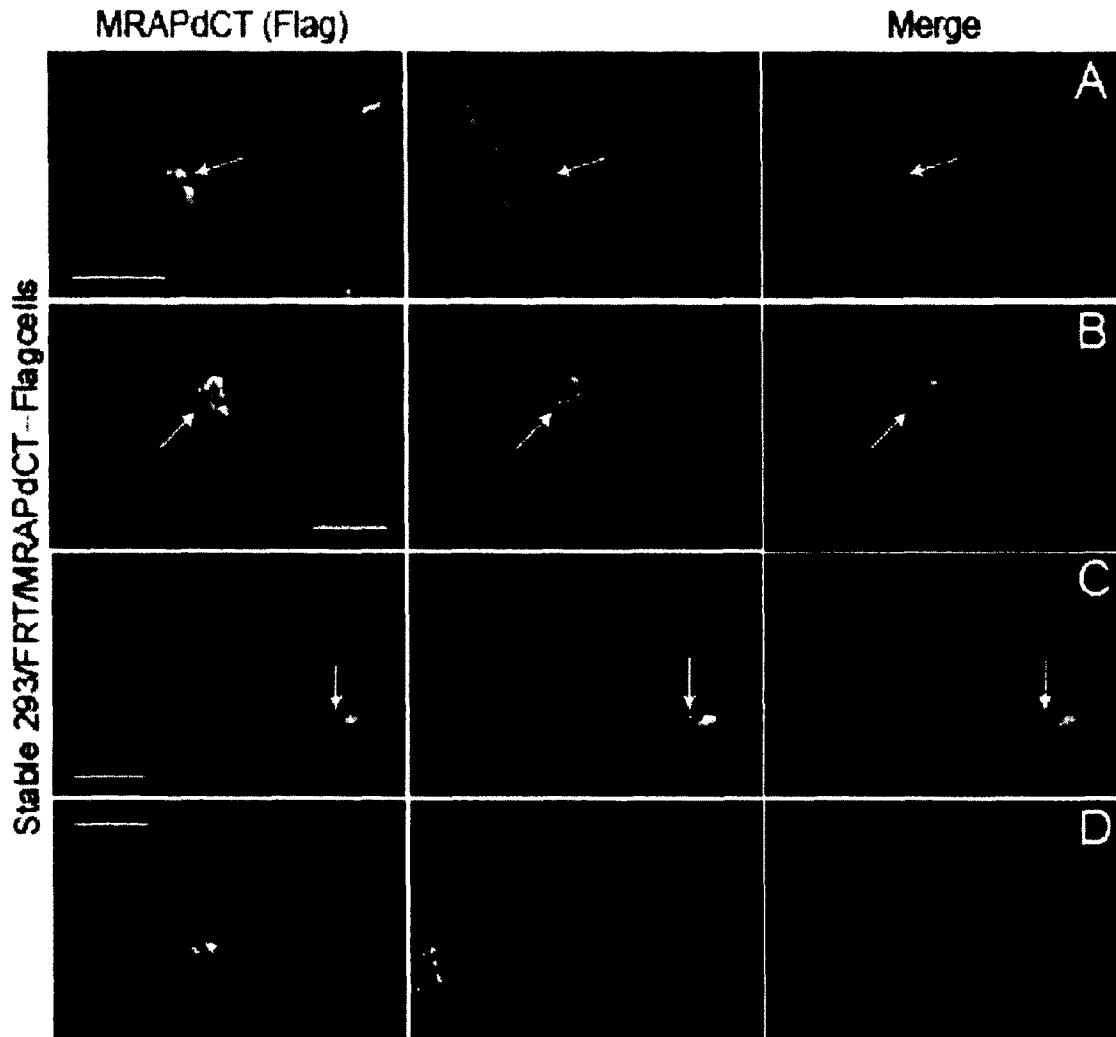
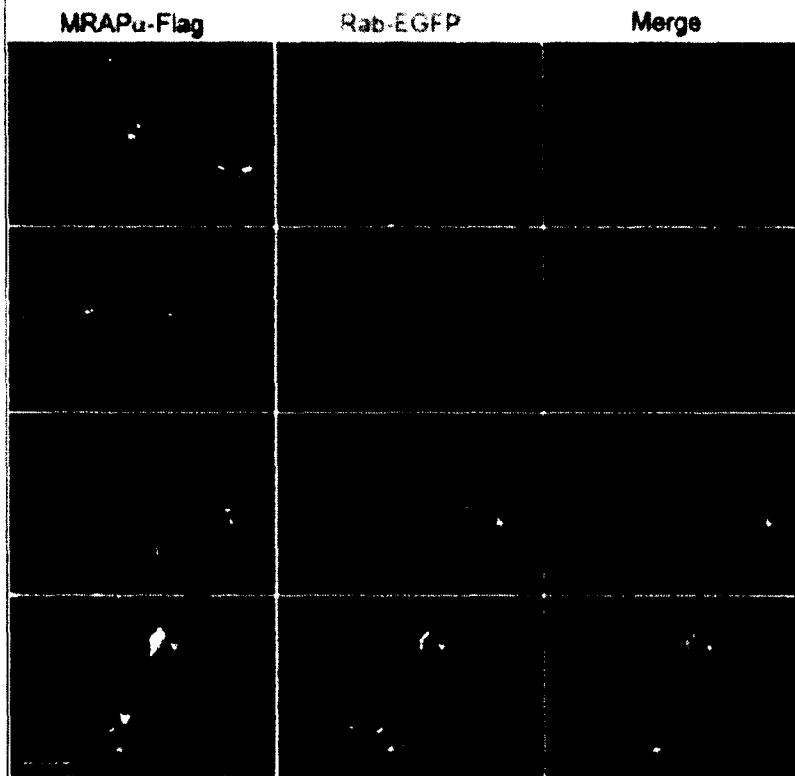


FIG. 4. Influence of the C-terminal domain of MRAPdCT on its localization. Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAPdCT-Flag in the absence of human MC2R labeled for MRAPdCT (Flag tag) and the endoplasmic reticulum (ER) or Golgi cisternae with specific antibodies or labeled by transient transfection of Rab1-EGFP for ER-to-Golgi endosomes. Images are representative of three independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars: 10 μ m. Arrows point to colocalization (yellow pseudo-color).

A



B

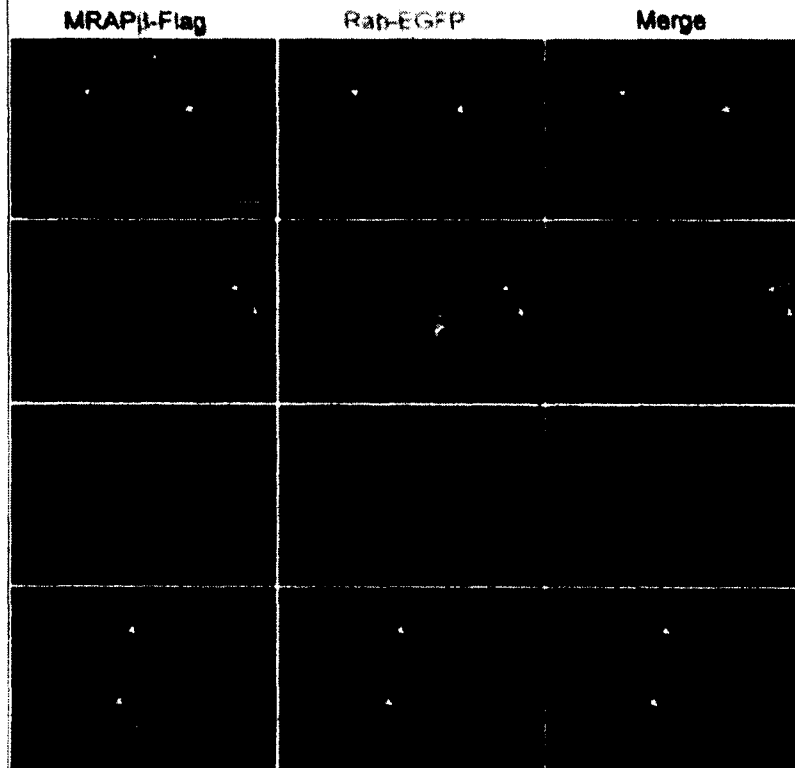
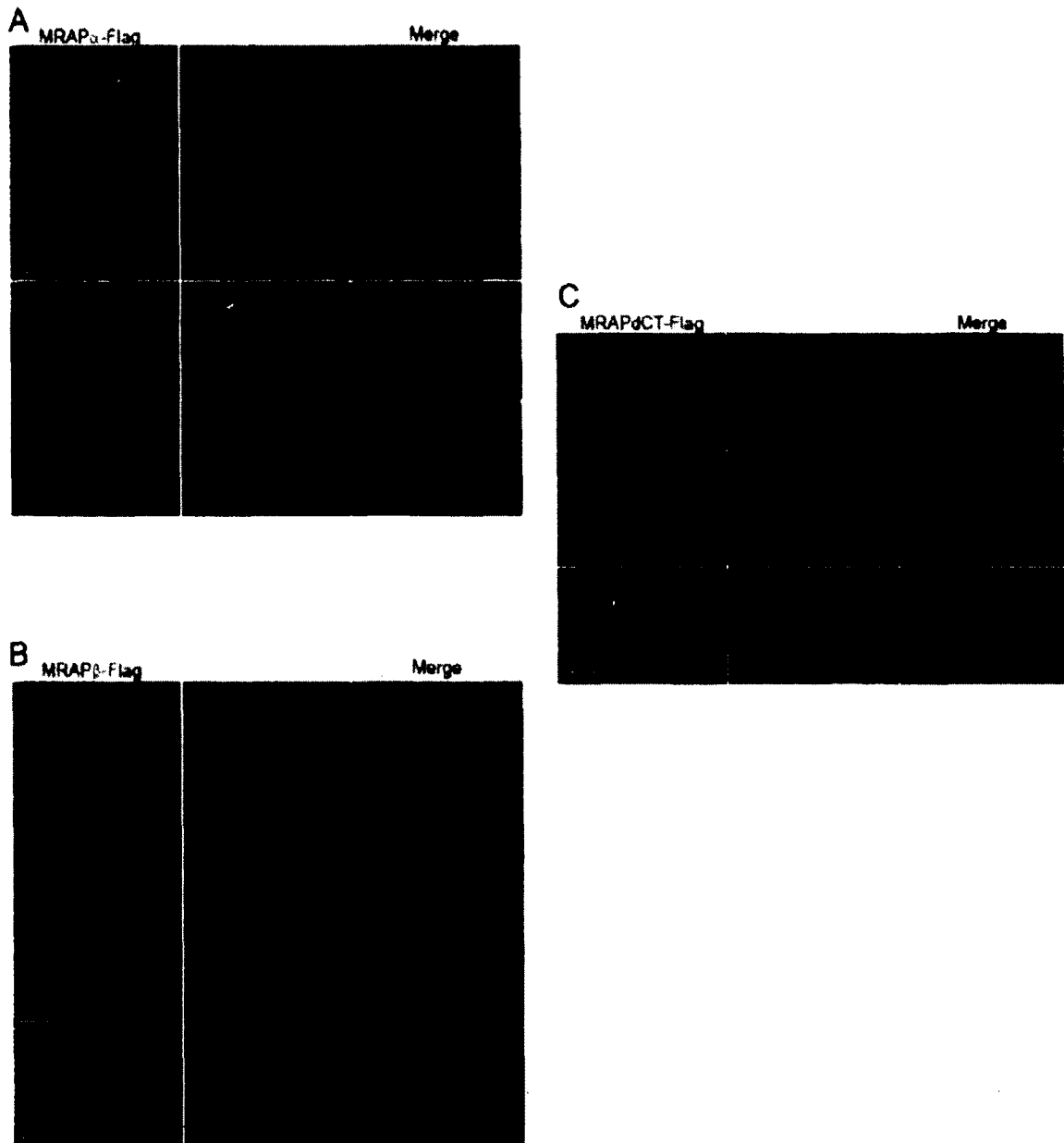


FIG. 5. Influence of the C-terminal domain of human MRAP1 isoforms on their trafficking in endosomes. Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAP α -Flag (A) or 6xHis-MRAP β -Flag (B) in the absence of human MC2R labeled for MRAP1s (Flag tag) and labeled by transient transfection of Rab4-, Rab5-, Rab7- or Rab11-EGFP. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bar: 10 μ m (equivalent for all images). Arrows point to colocalization (yellow pseudo-color).



SUPPLEMENTAL FIG. 1 Influence of the C-terminal domain of MRAP1s for their localizations. Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAP α -Flag (A), 6xHis-MRAP β -Flag (B) or 6xHis-MRAP Δ CT-Flag (C) in the absence of MC2R. Fixed cells were labeled for MRAP1s (Flag tag; red) and different markers (green; α -tubulin, vimentin, transient transfection of actin-EGFP or live cells were incubated with MitoTracker before fixation). Images are representative of two independent experiments where at least 30 cells were examined. Scale bars: 10 μ m.

Translocation of MRAP1 isoforms to the plasma membrane by MC2Rs and by MRAP2

The ability of MRAP1s to traffic between different cell compartments was examined by transiently transfecting human or zebrafish MC2Rs in stable MRAP1 cell lines. Immunofluorescence experiments revealed that the overexpression of human MC2R (Myc-hsMC2R) in cells stably expressing MRAP α caused a significant relocalization of MRAP α to the plasma membrane where it colocalized with MC2R (Fig. 6A, arrows). In MC2R-transfected cells, the expression of MRAP α also appeared to be increased comparatively to untransfected cells (Fig. 6A; double-arrow pointing at the upper cell not expressing MC2R). Zebrafish MC2R (Myc-zfMC2R) coexpression also caused a very significant translocation of MRAP α to the plasma membrane (Fig. 6A), contrasting with both β_2 AR-transfected and untransfected cells (Fig. 2). In cells expressing MRAP β , the effects of human and zfMC2R overexpression were reflected by a reduction in MRAP β present in endosomes (Fig. 6B). MC2Rs caused MRAP β to be localized almost exclusively at the plasma membrane comparatively to untransfected and β_2 AR-transfected cells (Fig. 3). Similarly to MRAP α and MRAP β , plasma membrane expression of MRAPdCT increased with the expression of human MC2R (Fig. 6C).

Since it is already known that MRAP1s influence the expression level of MC2R (7, 14), the reverse hypothesis was also investigated since MRAP α expression appeared to be increased in MC2R-transfected cells (Fig. 6A). Western blotting experiments were performed in conditions where MRAP isoforms were coexpressed or not with MC2R to verify whether MC2R expression is able to cause increased MRAP expression. The predicted molecular masses of MRAP α and MRAP β are 19 and 14 kDa, respectively (21), while the influence of each epitope tag on electrophoretic mobility can be determined using various MRAP constructions (8). Each tag contributed to approximately 1-2 kDa shifts in electrophoretic mobility between simple- and double-tagged constructs (not shown). MRAP α was discernible in at least five forms ($M = 20, 24, 30, 42$ and 55 kDa), MRAP β in at least two forms ($M = 18$ and 23 kDa) and MRAPdCT in only one form ($M = 10$ kDa). MRAP α , MRAP β and MRAPdCT expressions were largely increased by MC2R

coexpression (– *versus* + lanes) as compared to a loading control (total p44/p42^{mapk}) (Fig. 6D).

Because 293/FRT cells endogenously express low levels of MRAP2, the ability of MRAP2 to influence human MRAP1 isoforms localizations was further examined in immunofluorescence experiments in conditions where the influence of MRAP2 was exaggerated by transient MRAP2-Myc overexpression in cells stably expressing MRAP α -Flag or MRAP β -Flag. In non-transfected cells, MRAP α was localized as described above; however, in MRAP2-transfected cells, MRAP α and MRAP2 colocalized almost perfectly in dense intracellular compartments. MRAP2 also caused a partial translocation of MRAP α to the plasma membrane (Fig. 7A; arrows in upper images). With MRAP β , there was less colocalization with MRAP2 and hence it was not possible to conclude whether MRAP2 caused any relocation of MRAP β (Fig. 7A, lower images). The interaction between MRAP2-Myc and Flag-tagged MRAP1 isoforms was verified by immunoprecipitating the Flag-tagged MRAP1 isoforms. Myc-MRAP2 co-immunoprecipitated with MRAP α -Flag (Fig. 7B, IP lane 4) as described (15), as well as with MRAP β -Flag (Fig. 7C, IP lane 4). Since both MRAP1 isoforms immunoprecipitated with MRAP2, it was not tested whether MRAPdCT could also be immunoprecipitated with MRAP2. When compared to a loading control present in cell lysates (p44/p42) (lower panels in Fig. 7B-C), MRAP2 expression was increased by nearly 2-fold in cell lysates where MRAP α or MRAP β was present (Fig. 7D). Conversely, MRAP α and MRAP β expressions were also increased by over 2-fold when MRAP2 was coexpressed (Fig. 7E).

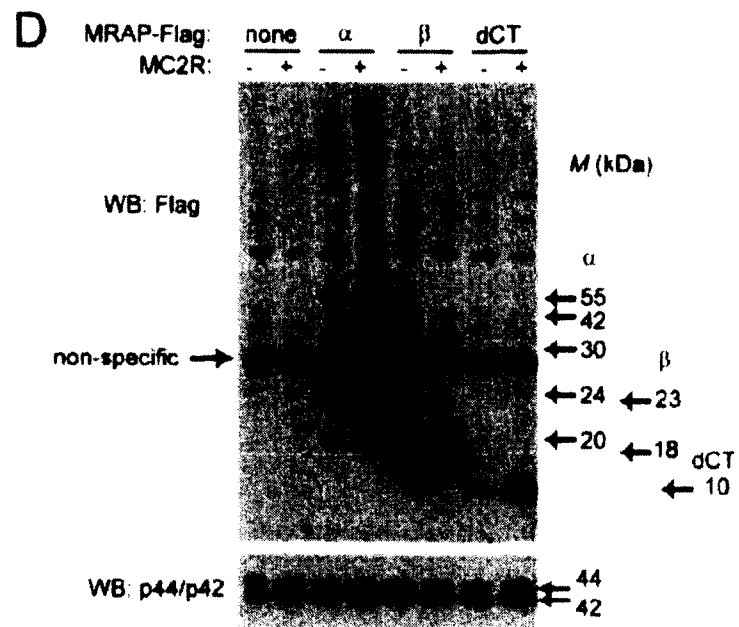
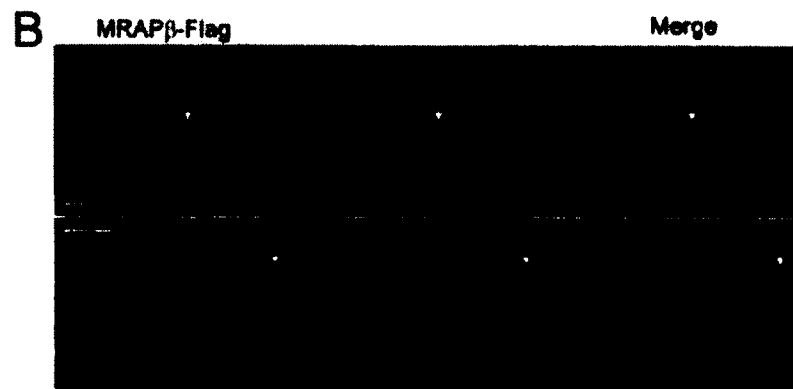
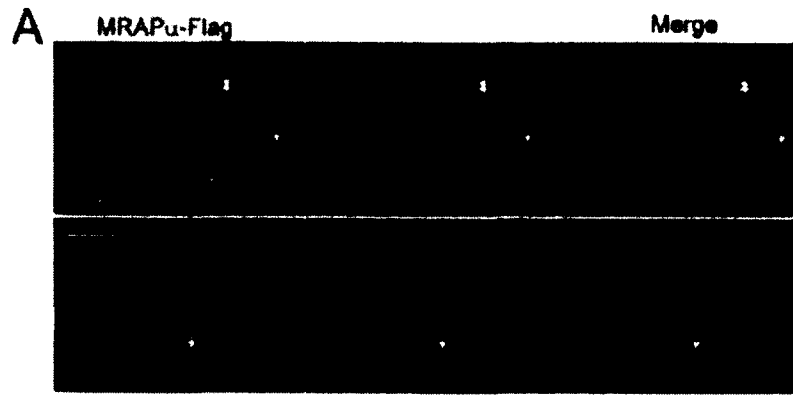


FIG. 6. Influence of MC2R expression on human MRAP1 localizations and expressions. A-C) Confocal microscopy images of cells stably expressing 6xHis-MRAP α -Flag (A), 6xHis-MRAP β -Flag (B) or 6xHis-MRAPdCT-Flag (C) in the presence of transiently transfected human Myc-MC2R (Myc-hsMC2R) or zebrafish Myc-MC2R (Myc-zfMC2R) (upper and lower images respectively). Fixed cells were labeled for MRAP (Flag tag) and Myc-tagged receptors. Arrows point at the colocalization between red (MRAP) and green (MC2Rs) channels which yield a yellow color in merged images. In one exception, a horizontal double-arrow is pointing at a cell not expressing human Myc-MC2R in panel A. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bar: 10 μ m. D) Immunoblots of proteins collected from native 293/FRT cells transiently expressing 6xHis-MRAP α -Flag, 6xHis-MRAP β -Flag or 6xHis-MRAPdCT-Flag with (+) or without (-) MC2R and probed for the Flag tag (upper panel) or stripped and probed for the unphosphorylated forms of p44/p42 (lower panel). *M* in kDa is shown on the right. The blots are representative of three independent experiments.

Membrane-spanning topology of MRAP α , MRAP β and MRAPdCT

We further investigated whether the C-terminal domains of MRAP isoforms affect their respective plasma membrane-spanning topology. MRAP1 amino acid sequences were analyzed using prediction bioinformatics. PONGO, a web server for multiple predictions of all-alpha transmembrane proteins (22) was used to predict topology. For MRAP α , four out of six annotations predicted N_{cyto}/C_{exo} (type II) topology, while all annotations predicted MRAP β to have N_{cyto}/C_{exo} topology (type II). For MRAPdCT, four out of six annotations predicted type II topology. A greater number of contradictions were obtained when MRAP sequences from other species were submitted.

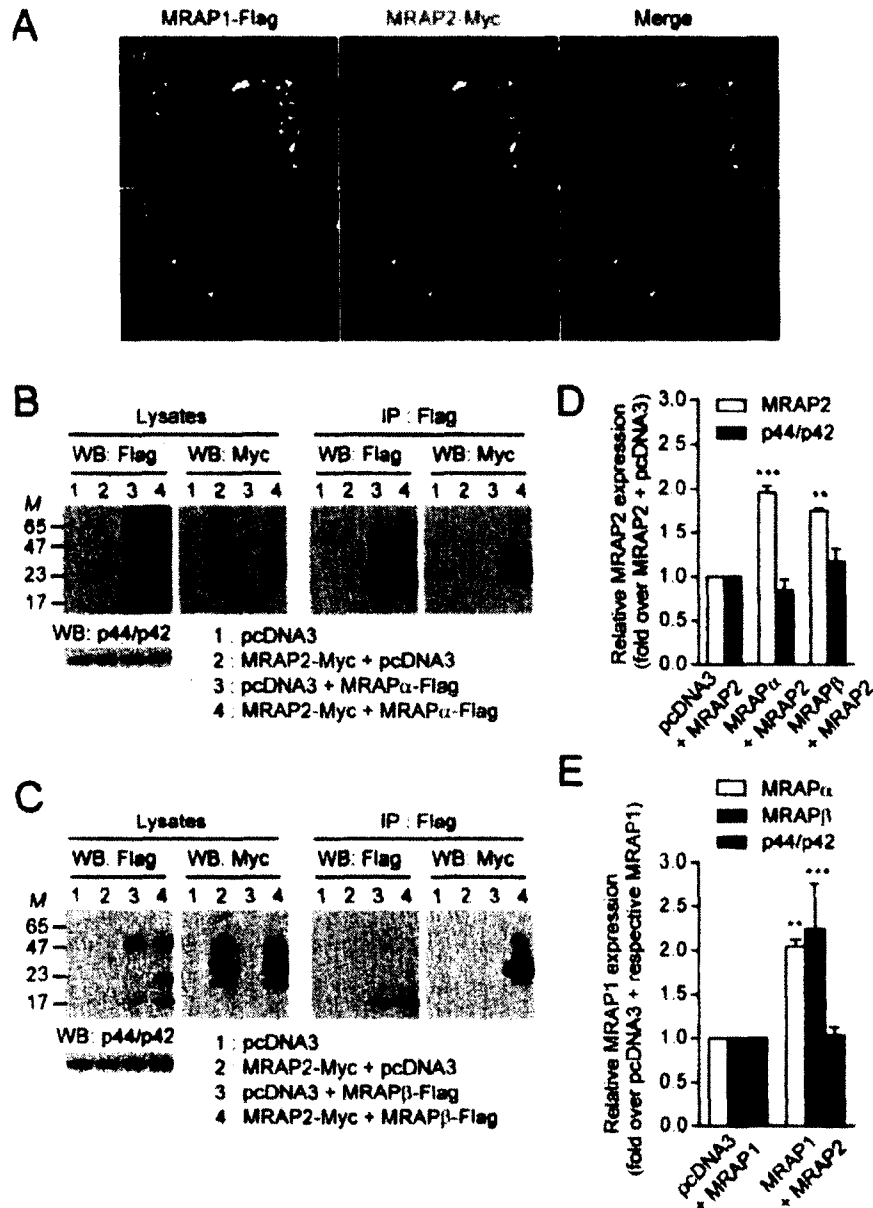


FIG.7. Influence of MRAP2 on human MRAP1 isoforms localizations. A) Confocal microscopy images collected from cells stably expressing 6xHis-MRAP α -Flag (upper images) or 6xHis-MRAP β -Flag (lower images) transiently expressing MRAP2-Myc. Fixed cells were labeled for MRAP1s (Flag tag) and for MRAP2-Myc (Myc tag). Images are representative of three independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bar: 10 μ m. B-C) Western blotting results before (lysates) and after immunoprecipitation (IP) of 6xHis-MRAP α -Flag (B) or 6xHis-MRAP β -Flag (C) transiently expressed or not with MRAP2-Myc in 293/FRT cells. *M* in kDa is shown on the left. D) Quantification of MRAP2 and p44/p42^{mapk} expression in cell lysates with and without MRAP1 isoforms expression. E) Quantification of MRAP α , MRAP β and p44/p42^{mapk} expression in cell lysates with and without MRAP2 expression. Results are representative of three independent experiments.

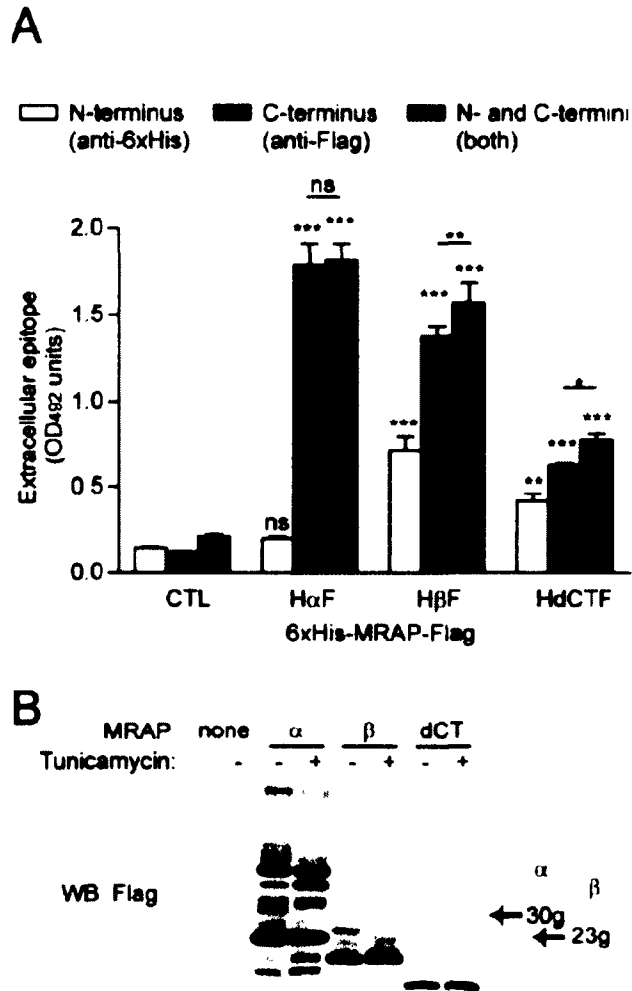


FIG. 8. Membrane-spanning topology of human MRAP1 isoforms. A) Cell-surface ELISA performed on fixed and unpermeabilized 293/FRT cells transiently expressing a GFP (CTL), 6xHis-MRAP α -Flag, 6xHis-MRAP β -Flag or 6xHis-MRAPdCT-Flag. In different sets of wells, epitope tags exposed outside the cells were detected with rabbit anti-Flag or anti-6xHis antibodies or with both antibodies to allow the detection of either N-terminal or C-terminal tags or both simultaneously. Primary antibodies were detected with the same secondary antibodies linked to HRP. Statistical significance: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ ($n = 4$). B) Immunoblot of proteins collected after tunicamycin or mock treatment of 293/FRT cells transiently expressing 6xHis-MRAP α -Flag, 6xHis-MRAP β -Flag or 6xHis-MRAPdCT-Flag. Arrows on the right point to the N-glycosylated forms of MRAP α and of MRAP β that are not present in tunicamycin-treated (+) samples. The blot is representative of three independent experiments.

As previously reported, overexpression of MRAP isoforms enhance their cell-surface expression (8). Thus, MRAP1 overexpression can be used to analyze MRAP1 topology at the plasma membrane. Measurements of cell-surface expression levels of double-tagged MRAP constructs (6xHis in N-terminus and Flag in C-terminus) were carried out using the non-permeabilized cell-surface ELISA method. In this assay, MRAP α exhibited a single plasma membrane topology since only the C-terminal Flag tag could be detected outside unpermeabilized cells while double detection with both anti-6xHis and anti-Flag antibodies did not yield any increase in signal detection. In contrast, both N- and the C-terminus of MRAP β and of MRAPdCT were detected outside the cells and an increase in double detection could be observed with anti-6xHis and anti-Flag antibodies conjointly, indicating that they were inserted into the plasma membrane in both orientations (Fig. 8A). Nevertheless, the levels of MRAPdCT at the plasma membrane were relatively low as compared to full length MRAP isoforms (N-terminus: MRAP β > MRAPdCT > MRAP α ; C-terminus: MRAP α \geq MRAP β > MRAPdCT).

Since glycosylation can affect membrane-spanning topology of mouse MRAP (9), Western blotting experiments were performed to analyze the N-glycosylation of MRAP1 isoforms. By treating transfected cells with tunicamycin immediately after transfection, it was possible to determine that 30 kDa MRAP α (30g) and 23 kDa MRAP β (23g) were N-glycosylated forms (Fig. 8B). In addition, in the case of MRAP α , the 42 kDa form became more apparent, possibly as the result of a lack of glycosylation of SDS-resistant dimers (~55 kDa) (23) or of other less apparent forms. N-glycosylation forms of MRAPdCT could not be observed under these conditions.

Influence of MRAP C-terminal domains on MC2R trafficking and function

To verify the functional impact of different MRAP C-terminal domains on MC2R function, ACTH-induced cAMP production was compared in cells stably expressing human MC2R (293/FRT/Myc-MC2R) transiently transfected with MRAP α , MRAP β , MRAPdCT or zfMRAP1. As shown in Fig. 9A, ACTH induced a concentration-

dependent increase in cAMP with EC_{50} values of 126 [87, 182] pM in MRAP α - and of 338 [286, 400] pM in MRAP β -transfected cells as previously described (8, 13). With MRAPdCT, cAMP production was obtained at the threshold concentration of 30 pM ACTH, with an EC_{50} value of 659 [496, 873] pM ($p < 0.01$ compared to MRAP β) and a maximal cAMP accumulation between that obtained with MRAP α and MRAP β isoforms ($p < 0.001$ each). With zfMRAP1, cAMP production was obtained at the threshold concentration of 1 pM ACTH with an EC_{50} value of 20 [9, 42] pM ($p < 0.001$ compared to MRAP α). Hence, maximal ACTH responses (R_{max}) were dependent on the C-terminal domains [MRAP α ($R_{max} = 6.3 \pm 0.2$ %), MRAP β ($R_{max} = 12.5 \pm 0.3$ %), MRAPdCT ($R_{max} = 9.6 \pm 0.4$ %) and zfMRAP1 ($R_{max} = 7.1 \pm 0.2$ %) (expressed as % of tritiated ATP transformed into cAMP) as was ACTH potency (zfMRAP1 > MRAP α > MRAP β > MRAPdCT).

Whole cell-based ELISA experiments were performed to measure cell-surface and total levels of human MC2R in 293/FRT/Myc-MC2R cells transiently expressing the different MRAPs. As shown in Fig. 9B, the coexpression of different MRAP1s increased human MC2R cell-surface expression and total expression to various degrees. As expected, MRAP β had a greater effect than MRAP α (8, 13). MRAPdCT increased MC2R cell-surface expression approximately to the same extent as that observed with MRAP α while zfMRAP1 was slightly higher than MRAP α (cell-surface and total MC2R: MRAP β > zfMRAP1 \geq MRAPdCT \geq MRAP α).

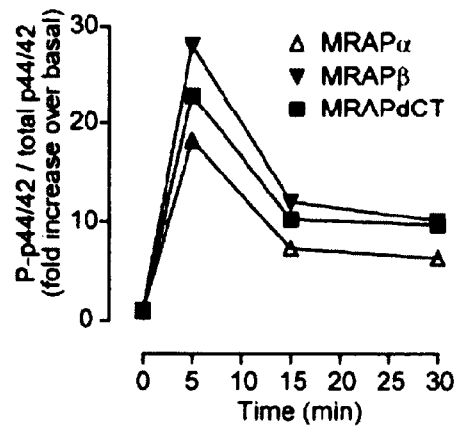
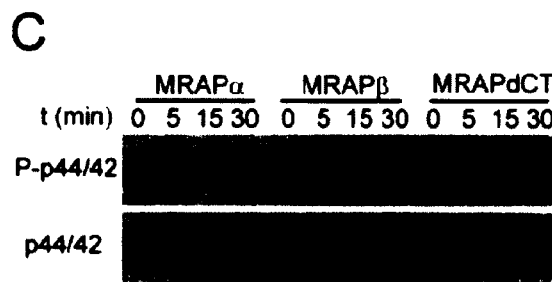
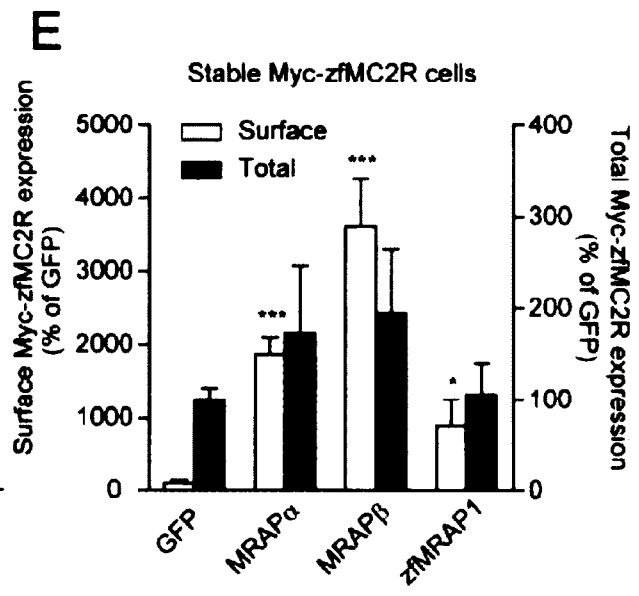
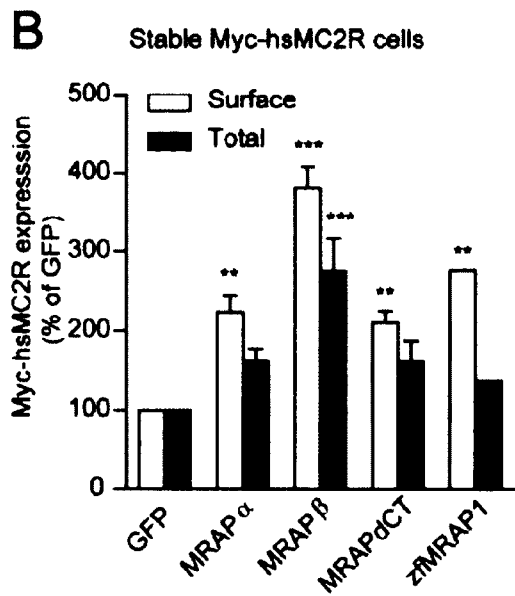
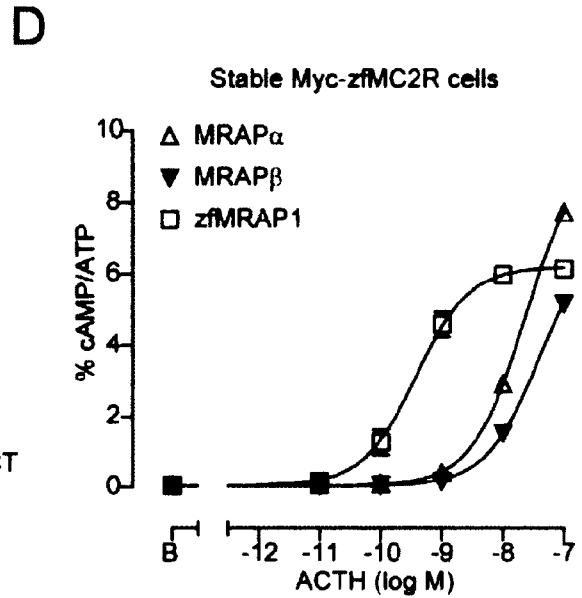
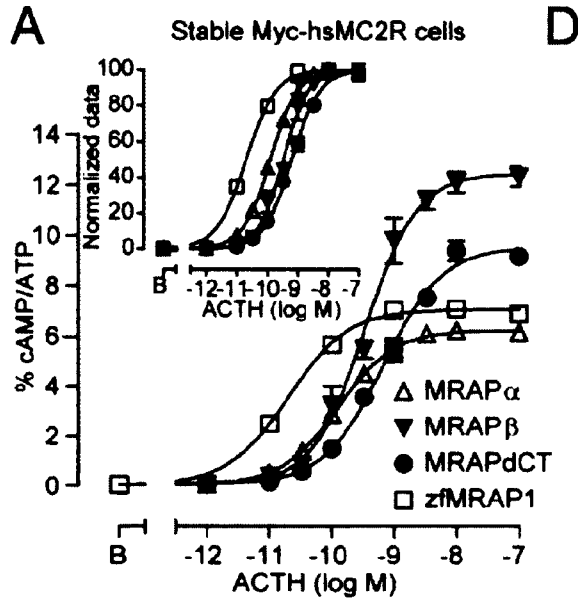


FIG. 9. Influence of MRAP1 C-terminal domains on MC2R function, expression and trafficking. A) ACTH-induced concentration-response curves performed on 293/FRT/Myc-MC2R cells (human MC2R) transiently expressing full-length MRAP1s or the truncated MRAPdCT. The inset shows the normalized curves from 0 to 100% of each curve in order to better illustrate the changes in EC_{50} values ($n = 3$). B) ELISA measurements of cell-surface and total Myc-MC2R expression in the same cells as in A ($n = 3$). C) Immunoblots (left panel) of phosphorylated and total p44/p42 proteins in cells as in A, after a 5 min challenge in the presence of 100 nM ACTH. The associated densitometric analysis is from one of the two immunoblots performed. D) ACTH-induced concentration-response curves performed on 293/FRT/Myc-zfMC2R cells (zebrafish MC2R, zfMC2R) transiently expressing full-length MRAP1s ($n = 3$). B) ELISA measurements of cell-surface and total Myc-MC2R expression in the same cells as in D ($n = 3$). Note: in the absence of MRAP1s, zfMC2R is not expressed at the cell-surface in 293/FRT cells (in contrast to hsMC2R), thus the basal value is very low, creating a more important fold increase in MC2R cell-surface expression when coexpressed with MRAP1s.

In addition to cAMP signaling, ACTH also promotes mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, in particular p44/p42^{mapk} phosphorylation (24). Phosphorylation of p44/p42^{mapk} was measured in stable 293/FRT/Myc-MC2R cells transiently transfected with MRAP α , MRAP β or MRAPdCT. Similarly to previously published data (24), maximal p44/p42^{mapk} phosphorylation was obtained after 5 min of 100 nM ACTH stimulation and decreased thereafter. After 5 min stimulation, p44/p42^{mapk} phosphorylation was higher in MRAP β -transfected cells than in MRAPdCT (Fig. 9C). Phosphorylation of p44/p42^{mapk} was decreased in MRAP α -transfected cells as compared to MRAPdCT-transfected cells, thus corroborating maximal responses obtained in cAMP measurements.

Lastly, complementary experiments were performed to investigate the influence of MRAP C-terminal domains on zfMC2R function and trafficking using a stable cell line expressing the zfMC2R (293/FRT/Myc-zfMC2R) (12). In these cells, the different MRAPs were transfected, with the omission of MRAPdCT, and cAMP production was measured as above. In spite of high ACTH concentrations, a linear increase in cAMP accumulation was observed in MRAP α - and MRAP β -transfected cells since a plateau was not yet reached with 100 nM ACTH (Fig. 9D). Due to incomplete curves obtained with human

MRAP1 isoforms, it was not possible to gain further insight on ACTH-induced maximal cAMP responses using zfMC2R. In contrast, in cells expressing zfMRAP1, ACTH stimulation reached a plateau at the concentration of 10 nM, with an EC_{50} of 373 [324, 429] pM, similar to previously published data (12). These results indicate that zfMRAP1, as compared to MRAP α and MRAP β , combined to either human or zfMC2R, generates a more sensitive ACTH receptor. Accordingly, it can be assumed that ACTH potency follows the same order of magnitude with zfMC2R as with human MC2R, i.e. zfMRAP1 > human MRAP1s.

Cell-surface and total zfMC2R expression levels were subsequently monitored and revealed that MRAP β 1, followed by MRAP α , induced higher zfMC2R cell-surface expression than zfMRAP1 (Fig. 9E). From these experiments and from the incomplete curves obtained in Figure 9D, it is tempting to speculate that maximal ACTH responses may reflect cell-surface expression levels (R_{max} : MRAP β > MRAP α > zfMRAP1).

DISCUSSION

In the present study, subcellular localizations of MRAP1 isoforms, their plasma membrane-topology as well as their influence on ACTH signaling were characterized. Our results indicate that MRAP α was preferentially associated with pre-Golgi structures while MRAP β was primarily associated with post-Golgi compartments. Concomitantly with an overall increase of MRAPs expression, human and zfMC2R increased MRAP1 isoforms expressions at the plasma membrane. Moreover, the presence of MRAP2 enhanced plasma membrane localization of MRAP α and increased the expression of both MRAP1 isoforms. The analysis of cell-surface topology and N-glycosylation of MRAP1 constructions indicated that MRAP α exhibited a single topology at the plasma membrane but showed dual-topology inside the cells because of its N-terminal domain was N-glycosylated. Conversely, overexpressed MRAP β and of MRAPdCT were inserted into the plasma membrane in both orientations. The different C-terminal domains contained in

MRAP α , MRAP β , MRAPdCT and zfMRAP1 caused significant variations in ACTH-induced maximal cAMP production and p44/p42^{mapk} phosphorylation proportional to MC2R expression levels. ACTH potency however was fine-tuned by each C-terminal domain.

Involvement of MRAP1 C-terminal domains in their localizations

Our results provide evidence that MRAP α is preferentially expressed early in the secretory pathway or alternatively in the retrograde transport machinery or the lysosomal degradation pathways (endoplasmic reticulum, Rab1, Rab7 and Rab11 endosomes) while MRAP β was mainly associated with later steps of the secretory pathway (plasma membrane, Rab4, Rab5 and Rab11, but not Rab7 endosomes). In sharp contrast, the truncated MRAP1 version lacking the C-terminal domain (MRAPdCT) was especially found in the Golgi apparatus and in Rab1-positive endosomes, indicating that the C-terminal domains of MRAP1 possess an amino acid motif that is essential for proper sorting from the Golgi apparatus. These findings suggest that in the absence of MC2R, MRAP α is preferentially sorted to pre-Golgi compartments while MRAP β is preferentially sorted to post-Golgi compartments. Despite these observations, the role of MRAPs in absence of MC2R remains unknown but hold the likely premise that they may be differently involved in protein transport unrelated to ACTH signaling, as described initially in adipocytes (11). Due to its localization, MRAP α may be involved in the trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (25) or may be involved in an interaction with nucleoporin 50 (26). Of note, MRAP α and MRAP β localizations sometimes overlap depending on their expression levels. For instance in stably expressing cells, plasma membrane localization of MRAP α is very low but not totally absent and can be accentuated by transient transfection (overexpression) (8). Likewise, overexpressed MRAP β is sometimes found at low levels in perinuclear regions. More physiological, stable gene integration in 293/FRT cells leads to low protein expression (i.e stable MC2R or MRAP1 isoforms expressed alone are difficult to detect by WB) since the gene of interest inserts in only one genomic locus. Therefore, at low expression levels, the different C-terminal domains of MRAP1 isoforms are preferentially

targeted to different localizations, which sometimes overlap between them depending on their own expression levels and on MRAP2 and MC2R expression levels.

In the present study, overexpression of epitope-tagged MRAP2 was used to investigate the effect of MRAP2, which is already endogenously expressed at low levels in 293/FRT cells (12, 13). MRAP2 colocalized massively with MRAP α and increased its localization at the plasma membrane. Accordingly, and as previously observed (15), MRAP2 and MRAP α as well as MRAP2 and MRAP β were found within the same protein complex following immunoprecipitation, therefore our results are in agreement with other studies indicating that the conserved N-terminal domain is probably sufficient for this interaction (15, 27). MRAP2 has been shown to promote cell-surface expression of MC2R (15, 16). However, why or how MRAP2 promotes MRAP α targeting to the plasma membrane remains unknown but may be related to physiological events independent from ACTH signaling, as recently described in various models (11, 28, 29). In contrast to previous results indicating that mouse MRAP2 negatively regulates ACTH signaling (16), our unpublished results indicate that MRAP2 positively regulates plasma membrane and total expression of MC2R but is without effect on ACTH-induced cAMP signaling. Present results are more in agreement with our previous studies performed in zebrafish, where the coexpression of zfMRAP2a and zfMRAP2b enhanced the effects of zfMRAP1 on zfMC2R signaling (12). One hypothesis to reconcile these discrepancies is that MRAP2 may regulate the expression or functionality of different MRAP1s according to the different C-terminal domains of MRAP1s. The observation that MRAP2 overexpression increases both MRAP α and MRAP β expressions, and *vice versa*, argues in favor of this hypothesis.

Both human and zfMC2R were able to modulate the localization of MRAP isoforms and to promote ACTH signaling. It is known that MRAP1 expression increases MC2R expression in human and rodent cell lines (9, 13). However, we provide evidence that MRAP1 isoform expressions are increased by both MC2R and MRAP2 coexpression.

Influence of MRAP1 C-terminal domains on their topology

It is generally accepted that G protein-coupled receptors (GPCRs), including MC2R, follow the classical heptahelical-spanning topology with an extracellular N-terminus and intracellular C-terminus. In contrast, MRAP isoforms are single-spanning membrane proteins (9, 11). Mouse MRAP1 was found to form antiparallel homodimers that interacted with human MC2R expressed at the cell-surface of Chinese hamster ovary (CHO) cells and in Y1 mouse adrenal tumor cells (9, 23). These studies indicated that mouse MRAP1 was N-glycosylated and that it adopted two opposite orientations in the cell membrane. According to Sebag *et al.* (9), the molecule present in the plasma membrane in type II topology is not N-glycosylated whereas the type I molecule is. In the same study, mouse MRAP1 spanned the plasma membrane in type I (N_{exo}/C_{cyto}) and type II (N_{cyto}/C_{exo}) topologies in an approximate 50: 50 ratio, similarly to that observed herein in topology analyses for MRAP β and MRAPdCT. Thus dual-topology appears to be a conserved structural feature of MRAP1s for which the major determinant of this characteristic likely lies in the well conserved N-terminal domain (14). Although in our experiments, dual-topology was clearly evident for MRAP β and MRAPdCT, only the C-terminus of MRAP α was detected outside the cells, supporting that MRAP α molecules present at the plasma membrane are all of type II topology. This result is in agreement with prediction analysis stating that the C-terminus of MRAP α may be O-glycosylated. Indeed, multiple bands were observed in Western blots which may correspond to O-glycosylated forms of MRAP α . Additionally however, at least one form was sensitive to cell treatment with tunicamycin, an N-glycosylation inhibitor. Since glycans are usually found in exoplasm, such as in the inner compartments of the ER and the Golgi apparatus and within vesicles, but rarely in the cytoplasm, a type I topology for MRAP α is thus more than likely to exist (19). However, MRAP α type I topology is restricted to membranes inside the cell and not at the plasma membrane since the portion of MRAP α that is expressed at the cell-surface cannot be N-glycosylated (N-terminus) but only O-glycosylated (C-terminus). From our study, it appears that the C-terminus of MRAP α compartmentalizes its dual topology differentially between the plasma membrane and inside the cells. Plasma membrane MRAP α in type II orientation may well be dimerized

with MRAP2 molecules configured in type I topology. The exact role for dual-topology proteins has yet to be established. If MRAP1 N- and C-terminal domains can be localized in the cytoplasm, they may potentially be regulated by cytoplasmic proteins such as kinases and phosphatases or interact with signaling molecules such as G proteins, arrestins or other regulators of GPCR trafficking and signaling. In addition, a role for MRAPs in membrane-to-membrane fusion or docking events could be considered. For example, MRAPs may possess the capacity to dock into bilipidic membranes without the need to flip orientations once inserted. Such a strategy may be useful and of lower energy cost for the cell to achieve its critical and essential cellular processes. Alternatively, dual-topology may be involved in a molecular chaperoning mechanism, helping MC2R folding during endoplasmic reticulum biogenesis and receptor α -helix translocation in endoplasmic reticulum membranes (30, 31). Perhaps MRAPs serve to swap a particular helix of MC2R in the correct orientation, similarly to what is observed during aquaporin-1 topogenesis (32-34).

Role of MRAP1 C-terminal domains on MC2R functional expression

Finally, our data clearly indicate that the C-terminal segments of MRAP1 isoforms modulate cAMP and p44/p42^{mapk} responses to ACTH. Corroborating previous studies using different truncated versions of mouse or human MRAP1 (9, 19), results herein demonstrate that MRAPdCT is sufficient to drive functional expression of MC2R (13). However, MRAPdCT coexpression with MC2R caused intermediate maximal cAMP and MAPK responses and lower ACTH potency (decreased sensitivity for cAMP production) indicating that the C-termini of human MRAP1 isoforms are involved in signaling events by increasing ACTH potency for MC2R. This may occur by modifying the affinity of MC2R for ACTH (8). ACTH potency may be MRAP1 isoform-dependent and species-specific since the C-terminal domains of zfMRAP1, mouse and human are drastically different. Indeed, zfMRAP1 protein has a major effect on ACTH potency. On the other hand, maximal responses obtained using the different MRAP1s are correlated with the MC2R cell-surface expression they induce. The modulation of ACTH potency and efficacy for MC2R receptor during the response of adrenocortical cells to ACTH may

play an important role in the finely-tuned regulation of glucocorticoid secretion, necessary to maintain not only glucose and lipid, but also general homeostasis (35).

Conclusion

In summary, our results shed new light on MC2R and MRAP functions by demonstrating that the different C-terminal domains of MRAP1s have distinct impacts on subcellular localization of MRAP1s, on their topology and on ACTH signaling. In contrast with the N-terminal domain, the C-terminal domains of MRAP1s are species- and isoform-specific. Originally known as FALP (fat adipose tissue-specific low molecular weight protein), MRAP1s may be involved in different regulatory roles during ACTH signaling or during other physiological or cellular processes, such as sensitivity to pollutants (28), bone formation (29) and insulin signaling (11).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The human MC2R cDNA was provided by Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon). High glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and Hygromycin B were from Wisent (St-Jean-Baptiste, QC, Canada). FBS (Fetal Bovine Serum), GlutaMAX and Zeocin were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Primers, antibiotics, the Flp-InTM system, 293/FRT cells, Lipofectamine, PLUS reagent and the pcDNA3 vector were from Invitrogen. Deoxyribonucleic NTPs were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada) and the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System polymerase from Roche Applied Sciences (Laval, QC, Canada). Restriction endonucleases, modifying enzymes and Phusion DNA polymerase were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA); plasmid DNA purification kits and gel extraction kits were from Qiagen Inc (Mississauga, ON, Canada). pEGFP was obtained from Clontech Laboratories Inc (Mountain View, CA).

ACTH (1-24) was purchased from Organon (Toronto, ON, Canada). IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), cAMP, ATP, forskolin and tunicamycin were from Sigma (Oakville, ON, Canada); [³H]-adenine (25 Ci/mmol) was from Perkin-Elmer (Boston, MA). The mouse monoclonal anti-Myc antibody clone 9E10 was obtained from Dr. Michel Bouvier (Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) and was used in the form of cleared 9E10 hybridoma culture medium (13); the anti-6xHis rabbit polyclonal antibody (H15 probe) was from Santa Cruz (La Jolla, CA, USA), the anti-Flag rabbit polyclonal antibody, mouse monoclonal anti- α -tubulin (clone DM1A) and mouse anti-vimentin were from Sigma (Oakville, ON, Canada). Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 13.14.4E XPT[™] rabbit mAb, total p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) rabbit mAb were from New England Biolabs Inc. (Mississauga, ON, Canada). Mouse monoclonal anti-protein disulfide isomerase (PDI) and anti-giantin were from Abcam (Cambridge, UK). AlexaFluor-coupled secondary antibodies were from Invitrogen. Secondary antibody-coupled to horseradish were from GE Healthcare. All other chemicals were of grade A purity.

The Vector NTI 9.0 package was from Informax (Invitrogen). NetNGlyc 1.0 and NetOGlyc 3.1 are available from the Center for Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services>). PONGO (<http://pongo.biocomp.unibo.it>) consists of 6 programs for the transmembrane annotation of the human proteome and three methods for the detection of three major post translational modifications, namely the cleavage of signal peptide, GPI-anchoring, and disulfide bonding (22).

Expression vectors

Myc-MC2R, tagged-MRAP constructions and 6xHis-MRAPdCT-Flag were previously described (8, 13). To recapitulate briefly, MRAPdCT was constructed with the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System. N- and C-terminal epitope-tags were added to MRAPdCT, 6xHis and Flag respectively. *SpeI*/Kozak/6xHis-MRAP-Flag/*XbaI* cDNA sequences were amplified from the native pcDNA3/MRAP α template. The PCR products were purified, digested and cloned into pcDNA5/FRT, thus yielding MRAPdCT fused at

its N- and C-terminus with the 6xHis (MGGSHHHHHH) and Flag (NYDDDDKC) epitopes respectively. ZfMC2R and zfMRAP1 constructions were previously described (12), as well as the MRAP2-Myc construction (13).

Cell culture, transfection and isogenic cell lines

The *Flp* recombinase-mediated homologous recombination system (Flp-In™ System) was used to generate cell lines stably expressing Myc-MC2R (8), Myc-zfMC2R, 6xHis-MRAP α -Flag, 6xHis-MRAP β -Flag and 6xHis-MRAPdCT-Flag and were maintained with 100 μ g/ml Hygromycin B according to manufacturer's recommendations. Native 293/FRT cells (HEK293 cell line with single genome-integrated *Flp* Recombinase Target site (FRT)) were maintained in high-glucose DMEM with 7 % FBS, 2 mM GlutaMAX and 100 μ g/ml Zeocin. Unless otherwise stated, cells were transfected with 0.5 μ g of plasmid DNA per 35 mm dish using Lipofectamine and PLUS reagent. To maintain similar transcriptional and translational activity when required, transfection of pEGFP was used instead of an empty vector as a control.

Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded on poly-L-lysine glass coverslips placed in 35 mm dishes. If required, cells were transfected the following day with 0.5 μ g of pcDNA5/FRT/MRAP2-Myc, pcDNA5/FRT/Myc-MC2R, pcDNA5/FRT/Myc-zfMC2R, pcDNA3/Myc- β_2 AR, Rab1-, Rab4-, Rab5-, Rab7- Rab11-EGFP or β -actin-EGFP (in pEGFP vector). The following day, cells were starved for 30 min with fresh DMEM without FBS. After one cold PBS wash, cells were fixed with MeOH and washed with acetone as previously described (13). Labeling for Myc-tagged proteins and MRAP-Flag were performed as described previously (8). Antibodies used for labeling cellular markers or organelles included: mouse anti-PDI (1:2000), mouse anti-Giantin (1: 500), mouse anti- α -tubulin (1: 500) and mouse anti-vimentin (1:500). To label mitochondria, MitoTracker Red CMXRos was applied to live cells for 5 min at 37 °C then washed 3 times before fixation. Primary antibodies were detected with goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled

to Alexa-Fluo647 and Alexa-Fluor568 respectively and DAPI was used to stain the nuclei. Images were acquired on an Olympus Fluoview 1000 (FV1000) laser-scanning confocal microscope (Olympus, Japan) built around an IX81-ZDC inverted microscope fitted with a U Plan S-Apo 60X (1.35 NA) oil immersion objective (Olympus URFL-T, MAG Biosystems). Emissions from each fluorophores were acquired sequentially to avoid fluorophore bleeding. All images were magnified in Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.).

Whole cell ELISA procedures

Cell-surface ELISA procedures were carried as previously described (8). Briefly, cells were seeded into poly-L-Lysine-coated 24-well plates at 10^5 cells/well and transfected with 0.125 μ g DNA/ well or as indicated. After 24 h, cells were washed with PBS, fixed on ice for 15 min with 1.85 % formaldehyde, washed, then blocked in 10% horse serum and then incubated with a mouse anti-c-Myc mixture (1:3), rabbit anti-Flag (1:200) and/or rabbit anti-6xHis (1:200) antibodies and detected with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase. Total expression levels were monitored by fixing and permeabilizing cells with 100% MeOH instead of formaldehyde (13). The substrate 0.003% H_2O_2 and the chromophore 1mg/ml O-phenylenediamine (OPD) were used to reveal cell-surface abundance (8).

In the characterization of MRAP topology, the cell-surface topology assay strictly determines the epitope (Flag or 6xHis) that lies outside of unpermeabilized cells, localized at the plasma membrane and not in other membrane compartments found inside the cells, such as ER membranes. Henceforth, the term cell-surface topology is used to describe these sets of experiments and their interpretations.

Western blot analyses

For the analyses of MRAP proteins, cells were grown in 35 mm dishes, transfected with 0.5 μ g of plasmid at mid-confluency and lysed at confluency in lysis buffer (20 mM

Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM Na pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin). Samples were sonicated twice for 15 s at 4 W, then centrifuged for 10 min at 12 000 g to remove the insoluble material. Twenty micrograms of soluble proteins were incubated for 30 min in sample buffer ((62.5 mM Tris-HCl (pH 8.5 at 25°C), 2% SDS, 0.4 mM EDTA, 0.006% pyronin Y, 0.01% bromophenol blue, 10% glycerol and 0.1 M dithiothreitol at final concentration)) at room temperature and then resolved by SDS-PAGE on 15 % bis-acrylamide gels or 4-15 % precast gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in TBS-Tween 0.05 % with 5 % non-fat powdered milk for at least 30 min. Polyclonal rabbit anti-6xHis (1:1000) or anti-Flag (1:1000) were incubated with membranes for 1 h. After washing, appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP) were incubated for 1 h at room temperature and then washed 5 times before detection with enhanced chemiluminescence. For glycosylation analyses, immediately after the transient transfection procedure, 1.5 µg/ml tunicamycin was applied directly to the complete culture medium for 24 h.

For the determination of p44/p42 phosphorylation and total p42/p44 proteins, transfected cells were starved in DMEM without FBS 30 min prior to ACTH stimulation. After stimulation with 100 nM ACTH, cells were washed once with ice-cold PBS and lysed in 1X lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM Na pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin and 1.5X PhoSTOP phosphatase inhibitor). The lysates were centrifuged for 10 min at 12 000 g at 4 °C, after which supernatants were aliquoted and stored at -80 °C. Ten µg of samples were resolved on 10 % bis-acrylamide gels in reducing SDS-PAGE conditions. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and probed with antibodies against the phosphorylated form of p44/p42 (1:2000) in 5% BSA TBS-Tween 0.05% and detected with HRP-linked secondary antibodies and enhanced chemiluminescence. Membranes were then stripped in 0.4 N NaOH in TBS-Tween and reblotted against the unphosphorylated forms of p44/p42 (1:1000).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed as described previously (36). Briefly, native 293/FRT cells transiently transfected with empty vector, MRAP α -Flag or MRAP β -Flag with or without MRAP2-Myc. After 42 h, cells were then collected in lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na₄P₂O₇ and 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (9 nM pepstatin, 9 nM antipain, 10 nM leupeptin and 10 nM chymostatin). The lysates were clarified by centrifugation for 20 min at 14000 g at 4 °C. After pellet removal, 2 μ g of anti-Flag monoclonal antibodies were added to the supernatants to immunoprecipitate Flag-tagged proteins. After 60 min of incubation at 4 °C, 50 μ l of 50% protein A-agarose was added, followed by an overnight incubation at 4 °C. The following day, samples were centrifuged for 1 min in a microcentrifuge and washed three times with 1 ml of lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted by the addition of 50 μ l of sample buffer, followed by a 60-min incubation at room temperature (20 °C). Initial lysates and immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE on 15 % bis-acrylamide gels and immunoblotting was performed on nitrocellulose membranes using rabbit polyclonal anti-Flag (1:1000) or anti-Myc (1:1000) antibodies.

Cyclic AMP measurements

Transient transfections were performed 24 h after initial seeding of 4×10^5 cells in 35 mm dishes with 0.5 μ g of plasmid DNA. Intracellular cAMP accumulation was determined after time-course studies performed in cells contained in 35 mm dishes. Cells were loaded with tritiated adenine for 2 h, washed once in Hank's buffered saline (130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₂, 5 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 g/l dextrose and 0.1 % BSA) and subsequently stimulated with ACTH, in the presence or absence of the phosphodiesterase inhibitor IBMX (isobutyl-methyl-xanthine), at 37 °C. At the end of the stimulations, cells were lysed in 5 % trichloroacetic acid (TCA), and intracellular cAMP accumulation was determined by measuring the conversion of [³H]-ATP into [³H]-cAMP eluted from Dowex and neutral alumina chromatography columns was measured as described previously (8)

Data analysis

The results are presented as mean \pm SEM unless stated otherwise. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used to determine the EC₅₀s, 95% confidence intervals, maximal effects using log scaled ACTH concentrations (concentration-response curves: log agonist vs. response; baseline is shared and fixed between 0 and 0.1 % cAMP/ATP; Hill slopes were fixed at a value of 1.0). EC₅₀ values are given with 95% confidence intervals as: mean [lower limit, higher limit]. For non-linear regression analyses, p values were obtained with the extra sum-of-squares F test performed on selected parameters. Statistical analyses to determine significance of other parameters were performed by ANOVA followed by Bonferonni's post-hoc test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Lucie Chouinard as well as the other members of the laboratory for their technical assistance in performing cAMP assays and in preparing primary cell cultures of human fasciculata cells We thank Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon) for providing us with the human MC2R cDNA, Dr. Michel Bouvier (Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) for providing us with the anti-Myc antibody. We thank Drs. Robert Dumaine and Philippe Sarret for use of their confocal microscope and Jean Lainé for help with confocal studies We are also grateful to Pierre Pothier for critical review of the manuscript.

FOOTNOTES

Abbreviations: β 2AR, β 2-adrenergic receptor; dCT, deleted C-terminus; ; FRT, Flp recombinase target; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK 293, human embryonic kidney; HRP, horseradish peroxidase; hsMC2R, human MC2R; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; MCR, melanocortin receptor; MC2R, melanocortin-2 receptor; MRAP, MC2R accessory protein; WB, Western blot; 293/FRT, HEK 293 cell line with single genome-integrated FRT site; zfMC2R, zebrafish MC2R.

REFERENCES

1. **Gallo-Payet N, Payet MD** 2003 Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61:275-287
2. **Sewer MB, Waterman MR** 2003 ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61:300-307
3. **Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE** 2010 ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol* 45:59-68
4. **Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD** 1992 The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251
5. **Lefkowitz RJ, Roth J, Pricer W, Pastan I** 1970 ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:745-752.
6. **Penhoat A, Naville D, Begeot M** 2001 The adrenocorticotrophic hormone receptor. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 8:112-117
7. **Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJ** 2005 Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 37:166-170
8. **Roy S, Rached M, Gallo-Payet N** 2007 Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R

- accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol* 21:1656-1669
9. **Sebag JA, Hinkle PM** 2007 Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20244-20249
 10. **Boston BA** 1999 The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 885:75-84
 11. **Xu A, Choi KL, Wang Y, Permana PA, Xu LY, Bogardus C, Cooper GJ** 2002 Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1161-1167
 12. **Agulleiro MJ, Roy S, Sanchez E, Puchol S, Gallo-Payet N, Cerda-Reverter JM** 2010 Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol* 320:145-152
 13. **Roy S, Perron B, Gallo-Payet N** 2010 Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology* 151:660-670
 14. **Sebag JA, Hinkle PM** 2009 Regions of Melanocortin 2 (MC2) Receptor Accessory Protein Necessary for Dual Topology and MC2 Receptor Trafficking and Signaling. *J Biol Chem* 284:610-618
 15. **Chan LF, Webb TR, Chung TT, Meimaridou E, Cooray SN, Guasti L, Chapple JP, Egertova M, Elphick MR, Cheetham ME, Metherell LA, Clark AJ** 2009 MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6146-6151
 16. **Sebag JA, Hinkle PM** 2010 Regulation of G protein-coupled receptor signaling: specific dominant-negative effects of melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Sci Signal* 3:ra28
 17. **Gallo-Payet N, Escher E** 1985 Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 117:38-46
 18. **Gallo-Payet N, Grazzini E, Côté M, Bilodeau L, Chorvatova A, Payet MD, Chouinard L, Guillon G** 1996 Role of calcium in the mechanism of action of ACTH in human adrenocortical cells. *J Clin Invest* 98:460-466
 19. **Webb TR, Chan L, Cooray SN, Cheetham ME, Chapple JP, Clark AJ** 2009 Distinct melanocortin 2 receptor accessory protein domains are required for melanocortin 2 receptor interaction and promotion of receptor trafficking. *Endocrinology* 150:720-726

20. **Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC** Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol Cell Endocrinol* 331:205-214
21. **Cooray SN, Clark AJ** 2010 Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol*:in press
22. **Amico M, Finelli M, Rossi I, Zauli A, Elofsson A, Viklund H, von Heijne G, Jones D, Krogh A, Fariselli P, Luigi Martelli P, Casadio R** 2006 PONGO: a web server for multiple predictions of all-alpha transmembrane proteins. *Nucleic Acids Res* 34:W169-172
23. **Cooray SN, Almiro Do Vale I, Leung KY, Webb TR, Chapple JP, Egertova M, Cheetham ME, Elphick MR, Clark AJ** 2008 The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse y1 cell line. *Endocrinology* 149:1935-1941
24. **Roy S, Pinard S, Chouinard L, Gallo-Payet N** 2011 Adrenocorticotropin (ACTH) effects on MAPK phosphorylation in human fasciculata cells and in embryonic kidney 293 cells expressing human melanocortin 2 receptor (MC2R) and MC2R accessory protein (MRAP)beta. *Mol Cell endocrinol*:in press
25. **Lippincott-Schwartz J** 1993 Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* 3:81-88
26. **Doufexis M, Storr HL, King PJ, Clark AJ** 2007 Interaction of the melanocortin 2 receptor with nucleoporin 50: evidence for a novel pathway between a G-protein-coupled receptor and the nucleus. *FASEB J* 21:4095-40100
27. **Hinkle PM, Sebag JA** 2009 Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP). *Mol Cell Endocrinol* 300:25-31
28. **Hwang GW, Oh SE, Takahashi T, Lee JY, Naganuma A** 2010 siRNA-mediated knockdown of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) gene confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J Toxicol Sci* 35:947-950
29. **Isales CM, Zaidi M, Blair HC** 2010 ACTH is a novel regulator of bone mass. *Ann N Y Acad Sci* 1192:110-116
30. **Hegde RS, Lingappa VR** 1997 Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* 91:575-582
31. **Goder V, Spiess M** 2001 Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* 504:87-93
32. **Skach WR, Lingappa VR** 1994 Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1). *Cancer Res* 54:3202-3209

33. **Dohke Y, Turner RJ** 2002 Evidence that the transmembrane biogenesis of aquaporin 1 is cotranslational in intact mammalian cells. *J Biol Chem* 277:15215-15219
34. **Buck TM, Skach WR** 2005 Differential stability of biogenesis intermediates reveals a common pathway for aquaporin-1 topological maturation. *J Biol Chem* 280:261-269
35. **Roberge C, Carpentier AC, Langlois MF, Baillargeon JP, Ardilouze JL, Maheux P, Gallo-Payet N** 2007 Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1465-E1478
36. **Parent A, Hamelin E, Germain P, Parent JL** 2009 Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem J* 418:163-172

Chapitre 3

3.3 Internalisation et trafic intracellulaire de MC2R

Titre : Mechanisms of Melanocortin-2 Receptor (MC2R) Internalization and Recycling in Human Embryonic Kidney Cells. Identification of Key *Ser/Thr* Amino Acids.

Auteurs : Simon Roy, Sébastien J. Roy, Sandra Pinard, Marcel-Daniel Payet, Louis-Daniel Taillefer, Mohamed Rached and Nicole Gallo-Payet

Statut : Accepté dans Molecular Endocrinology le 16 août 2011.

Avant-propos : Avec l'aide de Louis-Daniel Taillefer (stagiaire du baccalauréat en biotechnologie) et de Mohamed Rached (stagiaire post-doctoral dans notre laboratoire), j'ai effectué la mutagenèse dirigée des 18 mutants S/T → A/D décrit de cet ouvrage. Toutes les autres expériences ont été réalisées avec l'aide de Lucie Chouinard, Louis-Daniel Taillefer ou Sandra Pinard (stagiaire du baccalauréat en microbiologie). Sébastien Roy (étudiant PhD dans le laboratoire de Jean-Luc Parent) a réalisé et contribué aux résultats d'immunoprécipitation et à ceux avec les récepteurs AT₁R et β₂AR. J'ai écrit la version initiale du manuscrit et monté les figures moi-même dans. Le Pr Gallo-Payet a aussi beaucoup contribué à la conception et à l'écriture de l'article dans sa forme finale. Le Dr MD Payet a réalisé les analyses de corrélation des mutants.

fonctionnel, le récepteur de l'ACTH doit être composé de MC2R (mélancortine-2 récepteurs) et de MRAPs (protéines accessoires à MC2R). Pour vérifier si MC2R peut être recyclé et resensibilisé après l'internalisation induite par l'ACTH, l'expression de surface de MC2R, son internalisation et l'accumulation d'AMPC ont été mesurés dans les cellules 293/FRT exprimant MC2R, les isoformes MRAP1 et MRAP2. L'ACTH induit une internalisation concentration-dépendante et arrestines-, clathrine et dynamine-dépendantes de MC2R/MRAP1. Le MC2R internalisé est localisé dans des endosomes Rab4-, Rab5- et Rab11-positifs. La préincubation des cellules avec la monensine et la brefeldine A a indiqué qu'un tiers des récepteurs internalisés sont ensuite recyclés à la membrane plasmique pour participer à la signalisation soutenue en AMPC. Un scan Ala/Asp (A/D) de tous les Ser/Thr (S/T) intracellulaire de MC2R a été réalisé. En mutant T143 en A (T143A), l'expression de surface et la fonction a considérablement été altérée, tandis que l'introduction d'un groupe carboxyle chargé négativement (T143D) reproduit les propriétés du MC2R de type sauvage. En revanche, la mutation supposée bloquer ou imiter la phosphorylation sur T147 (T147A et T147D respectivement) augmente ou supprime l'expression de MC2R à la surface cellulaire et conséquemment aussi la signalisation. T131A, T131D et S280D empêchent l'internalisation de MC2R. D'autres mutants conduisent à des altérations de la réactivité à l'ACTH compatibles avec un rôle inhibiteur de la phosphorylation dans la fonction de MC2R. En outre, certains résidus S/T semblent être impliqués dans l'expression de surface MRAP1-indépendante de MC2R puisque MRAP β diminue ou augmente respectivement les expressions de surface des mutants qui présentent une haute ou basse expression de surface en son absence. Ainsi, la phosphorylation de MC2R sur des résidus S/T spécifiques peut réguler positivement ou négativement son expression à la membrane plasmique et sa fonction.

ABSTRACT

ACTH is the most important stimulus of the adrenal cortex. Even though the ACTH receptor is subjected to desensitization, ACTH-stimulated adrenocortical cells produce elevated and sustained cAMP. The functional ACTH receptor is comprised of MC2R

(melanocortin-2 receptor) and MRAPs (MC2R accessory proteins). To verify whether MC2R may be recycled and resensitized after ACTH-induced internalization, MC2R cell surface expression, internalization and cAMP were measured in HEK (human embryonic kidney) 293/FRT cells expressing MC2R, MRAP1 isoforms and MRAP2. ACTH induced concentration-dependent and arrestins-, clathrin- and dynamin-dependent MC2R/MRAP1 internalization. Internalized MC2R was localized with Rab4-, Rab5- and Rab11-positive endosomes. Preincubation of the cells with monensin and brefeldin A revealed that a third of the internalized receptors were recycled to the plasma membrane and participated in sustained cAMP production. An *Ala/Asp* (A/D)-scan of all MC2R intracellular *Ser/Thr* (S/T) was performed. T143A drastically impaired cell surface expression and function, whereas introducing a negatively charged carboxyl group (T143D) reproduced wild-type (WT) MC2R properties. Conversely, blocking (T147A) or mimicking (T147D) phosphorylation on T147 respectively increased or abolished MC2R cell-surface expression and signaling. T131A, T131D and S280D abrogated MC2R internalization. Other mutants led to alterations in ACTH-responsiveness consistent with an inhibitory role of phosphorylation in MC2R function. Additionally, certain S/T residues were involved in MRAP1-independent cell-surface expression of MC2R, since MRAP β respectively decreased or increased cell-surface expression of mutants exhibiting high or low cell-surface expressions in absence of MRAP β . Thus, MC2R phosphorylation on specific S/T residues may positively or negatively regulate its plasma membrane expression and function.

INTRODUCTION

ACTH is the most important stimulus of the adrenal cortex by its capacity to stimulate steroidogenesis (1), but also development through an important trophic action (for review see 1-3). The effects of ACTH are mediated through its receptor called melanocortin-2 receptor (MC2R) (4). MC2R knock-out leads to neonatal lethality in three-quarters of the mutant mice with survivors exhibiting a marked atrophied zona

fasciculata (5). In humans, mutations in MC2R or in MC2R accessory proteins (MRAPs) are often the cause of familial glucocorticoid deficiency (6-9).

As in the case of all known melanocortin receptors (MCRs), MC2R is coupled to Gs protein, thus stimulating adenylyl cyclase, resulting in cAMP production and protein kinase A (PKA) activation (10) (for review see 11). The regulation of MC2R expression and function is atypical in at least two areas. MC2R functional expression requires the coexpression of MRAP (9, 12) and MC2R is rather known for its high capacity for cAMP production, compared to other Gs-coupled receptors (for review, see 13). Since the pioneering work of Lefkowitz *et al.* in 1970 (10), several studies have been conducted showing that several intracellular mediators may exert positive feedback loops to enhance ACTH-induced cAMP production (2, 3). Sustained activation of cAMP stimulation may also arise from absence of desensitization or internalization. However, we and others have shown that ACTH exposure induces MC2R desensitization and internalization (14, 15) (for review see 16), and that MC2R and arrestins colocalize during ACTH-induced internalization (15). In many situations, agonist-occupied G protein-coupled receptors (GPCRs) undergo rapid phosphorylation by GPCR kinases, PKA and/or protein kinase C (PKC) which often lead to receptor desensitization and internalization. Arrestins, namely arrestin2 (arr2) and arrestin3 (arr3) (also called β -arrestin1 and β -arrestin2 respectively), are ubiquitously expressed proteins that promote uncoupling of the GPCR from heterotrimeric G protein (desensitization) and promote endocytosis of arrestin-bound receptors (internalization) (17-19). Following internalization, GPCRs are known to traffic into early endosomes, late endosomes, and slow recycling perinuclear endosomes or can be targeted to lysosomes for degradation. Within endosomes, the receptors may be dephosphorylated and recycled back to the cell-surface for additional rounds of signaling or sent to degradation (20). These endosomes are trafficked into cells with the help of Rab GTPases (21, 22). Rab proteins are part of the subfamily of Ras-like small GTPases termed Rab GTPases, which are implicated in the regulation of intracellular trafficking. Over 60 members of the Rab GTPase family have been identified, and each is believed to be associated specifically with a particular organelle or pathway (23).

The time-lag regarding our knowledge on MC2R - the smallest human GPCR - as compared to other GPCRs has basically been due to various difficulties linked to the specific functional expression of MC2R (24, 25). However, with the discovery of MRAPs (9), much progress has now been achieved in this area (26, 27). In this context, our group has developed and characterized a cell line system which fully reproduces dose-response curves of ACTH-induced cAMP production similar to that described in primary cultures of human and rat adrenocortical cells (28, 29). The HEK 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP-Flag cell lines, which endogenously express MRAP2, is characterized by the stable coexpression of Myc-tagged MC2R along with either Flag-tagged MRAP1 isoform, MRAP α or MRAP β , in an entirely human background (12, 30). Indeed, in humans in comparison to rodents, two MRAP1 isoforms have been identified, namely MRAP α and MRAP β , which can modulate the expression and functional properties of MC2R (12). MRAP1s promote MC2R trafficking, to the plasma membrane, high-affinity ACTH binding and signaling, whereas MRAP2 mostly serves in MC2R transport to the plasma membrane (30, 31).

In spite of much recent progress regarding MC2R and MRAP functionality (for review see (26, 27), the precise molecular mechanisms explaining the sustained and high MC2R response to ACTH stimulation is not yet clarified. In light of current knowledge on MC2R and MRAP properties, we proposed that after arrestin-dependent internalization, MC2R may be recycled back to the cell-surface for additional rounds of signaling and that MC2R internalization is sensitive to the phosphorylation of its intracellular S/T residues. The aims of the present study were thus first to characterize MC2R internalization and trafficking in cell lines expressing MC2R and MRAP1 isoforms and secondly to identify MC2R phosphorylation sites important for cell-surface expression, cAMP production and internalization.

RESULTS

MC2R internalization is dynamin-, clathrin- and arrestin-dependent

Previous studies have shown that, after ACTH binding, MC2R is desensitized and internalized, both in the Y1 cell line (14, 32) and in M3 cells expressing MC2R (15). In order to investigate whether MC2R interacts with arrestin2 during internalization in 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells, cells were transiently transfected with EGFP (control) or with arrestin2, arrestin3 or their dominant negative forms arrestin2(319-418) (Arr2-DN) and arrestin3(201-409) (Arr3-DN) (33). Cells were then stimulated and cell-surface MC2R was measured by cell-surface ELISA. ACTH induced a receptor loss of 26 ± 2 % in control cells, 31 ± 2 % in Arr2- overexpressing cells ($p < 0.05$) and 36 ± 1 % in Arr3-overexpressing cells ($p < 0.001$). However, internalization was markedly decreased in Arr2-DN- transfected cells (10 ± 2 %; $p < 0.01$), but not in Arr3-DN (22 ± 2 %; $p > 0.05$) (Fig. 1A). This result also indicated that the endogenous arrestin2 expressed in 293/FRT is involved in MC2R internalization. Thus, MC2R internalization was affected by arrestin overexpression despite the high levels of endogenous arrestin in HEK293 cells (34).

To confirm the interaction between MC2R and arrestin3, 293/FRT cells were co-transfected with Myc-MC2R/MRAP β -Flag and -arrestin3-HA (hemagglutinin) and subsequently stimulated or not with 100 nM ACTH. In cell lysates, Myc-MC2R was present as multiple forms, either as native, core or terminally glycosylated (m25, m33 and m50-65 respectively) (30), while, in the arrestin-transfected cells, arrestin3-HA appeared as a simple band of 48 kDa (Fig. 1B, left panel). MC2R was immunoprecipitated with arrestin3 with and without ACTH stimulation, but not in the absence of arrestin transfection (Fig. 1B, right panel). These data indicate that arrestin3 and MC2R can be found in the same protein complex in both basal and ACTH-stimulated conditions.

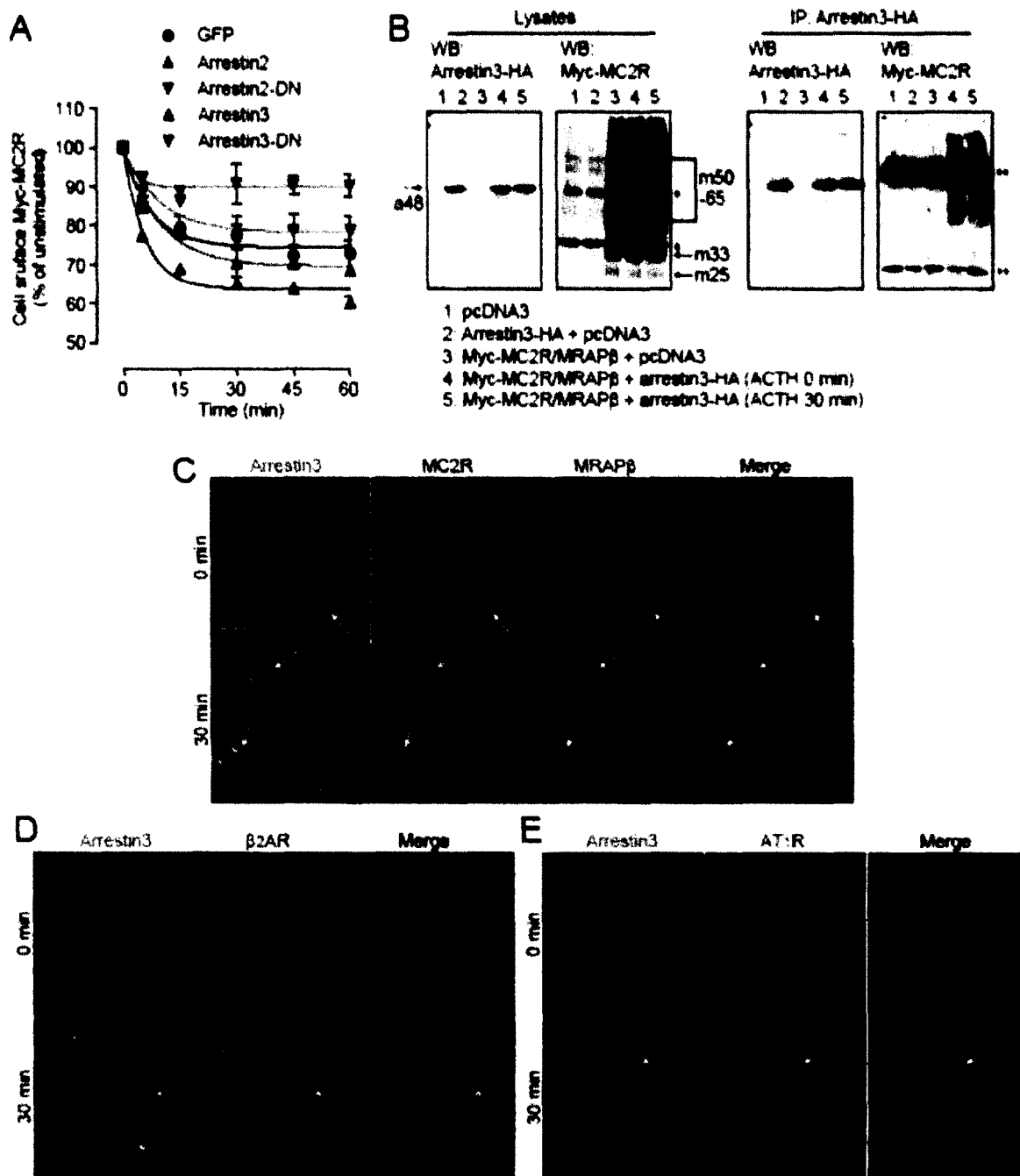
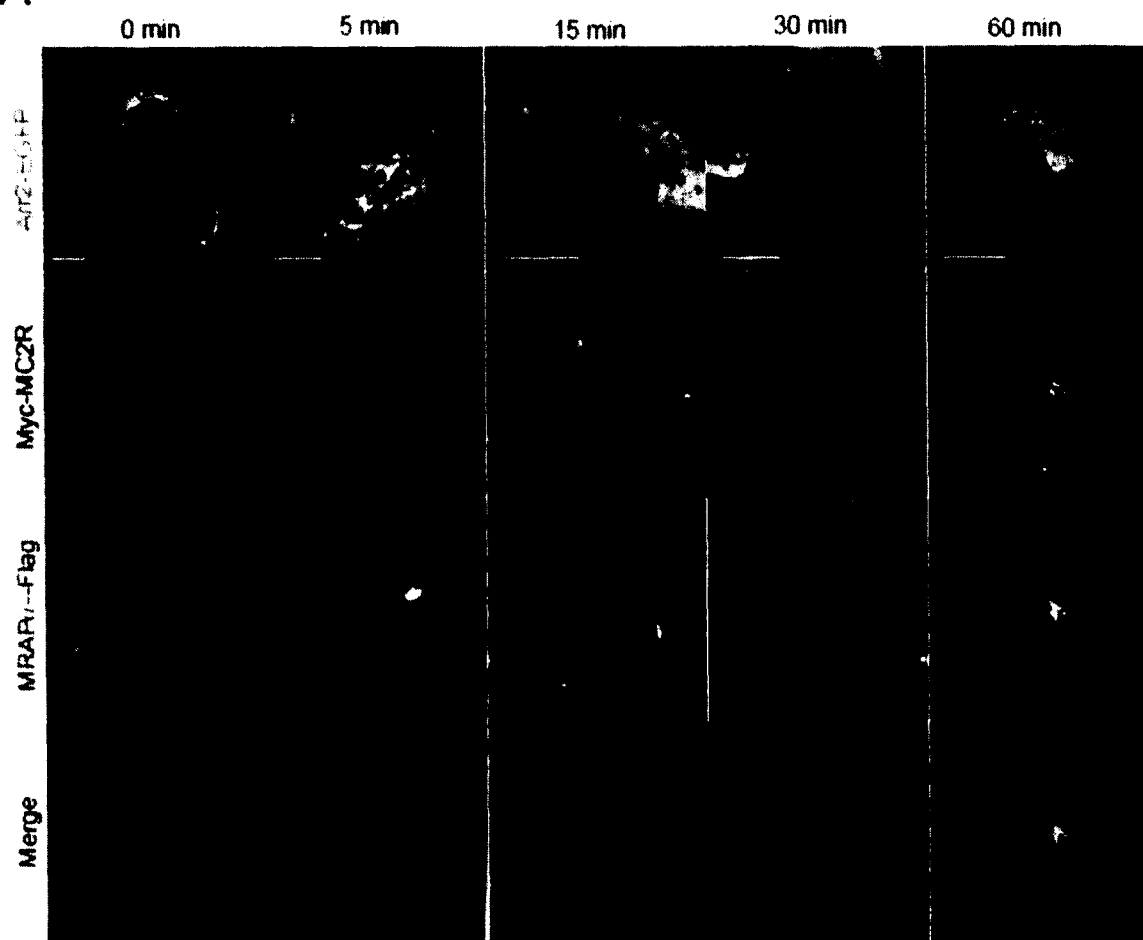


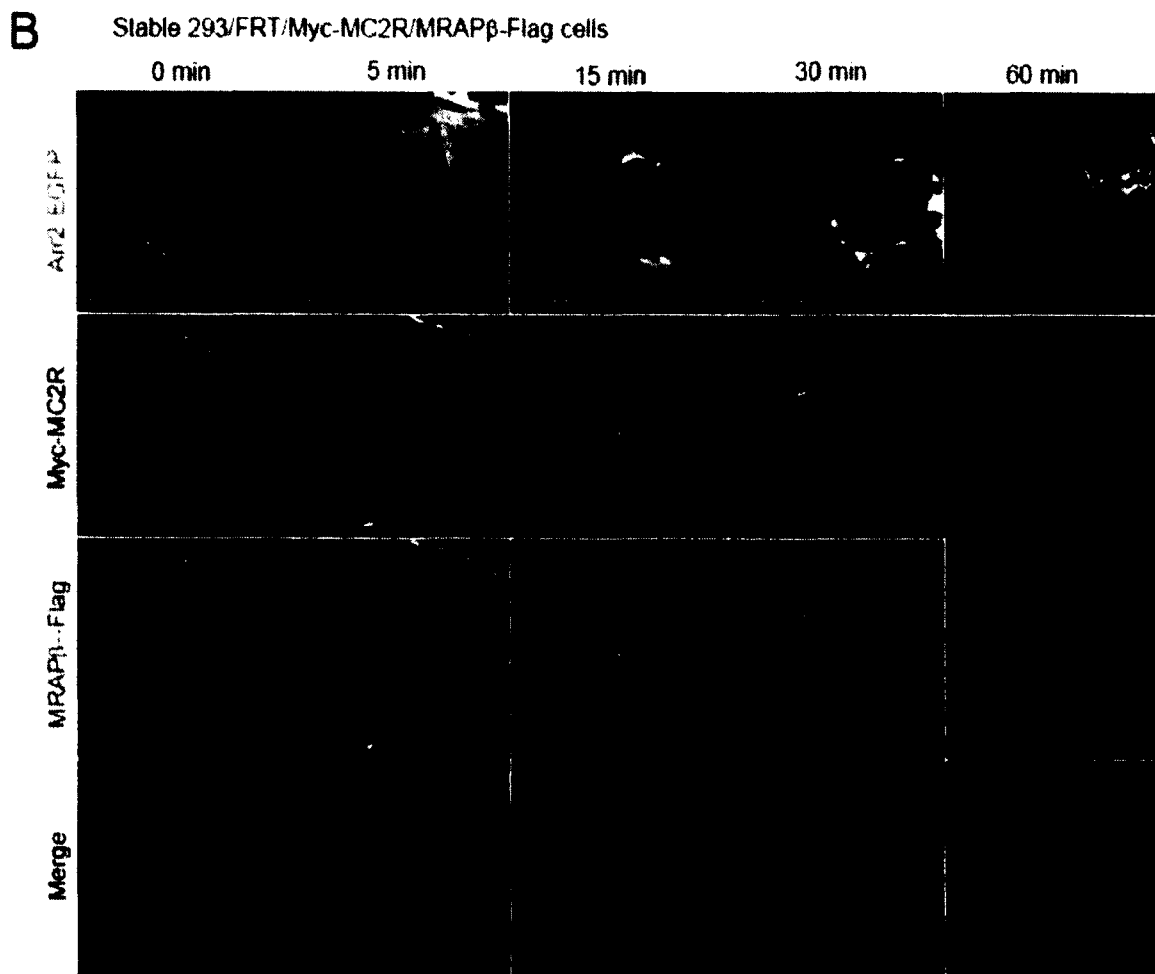
Fig. 1 Interaction between arrestins and MC2R. A) Cells were transiently transfected with either control vector (GFP), arrestin2, arrestin2-DN, arrestin3 or arrestin3-DN and stimulated with ACTH 100 nM for the selected time periods after which cell-surface Myc-MC2R was measured by ELISA (n = 3). B) Native HEK293 cells were transiently cotransfected with pcDNA3, HA-arrestin3 and Myc-MC2R/MRAPβ-Flag vectors as indicated. HA-Arrestin3 was immunoprecipitated and the immunoprecipitates and input lysates were analyzed by reducing SDS-PAGE. Western blotting against the HA and Myc tags are illustrated. (a) indicates arrestin3 band, 48 kDa; (m25), (m33) and (m50-65) designate the native, core-, and terminally glycosylated forms of MC2R respectively; (*) indicates endogenous c-Myc (60 kDa) and non-specific bands; (**) indicates the IgG light

and heavy chains in the anti-Myc immunoblot after immunoprecipitation. **C)** Confocal immunofluorescence microscopy images from 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells transiently transfected with arrestin3-EGFP and stimulated with ACTH 100 nM. Native HEK293 cells transiently cotransfected with Myc- β_2 AR (**D**) or AT $_1$ R-Flag (**E**) and arrestin3-GFP and incubated for 30 min with or without 1 μ M isoproterenol or 1 μ M angiotensin II respectively. Arrestin3 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. β_2 AR and AT $_1$ R are labeled in red pseudo-color. In merged images, arrows point at triple colocalization (white color in the MC2R image sets and yellow color in β_2 AR and AT $_1$ R images sets). Images are representative of three independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars, 10 μ m.

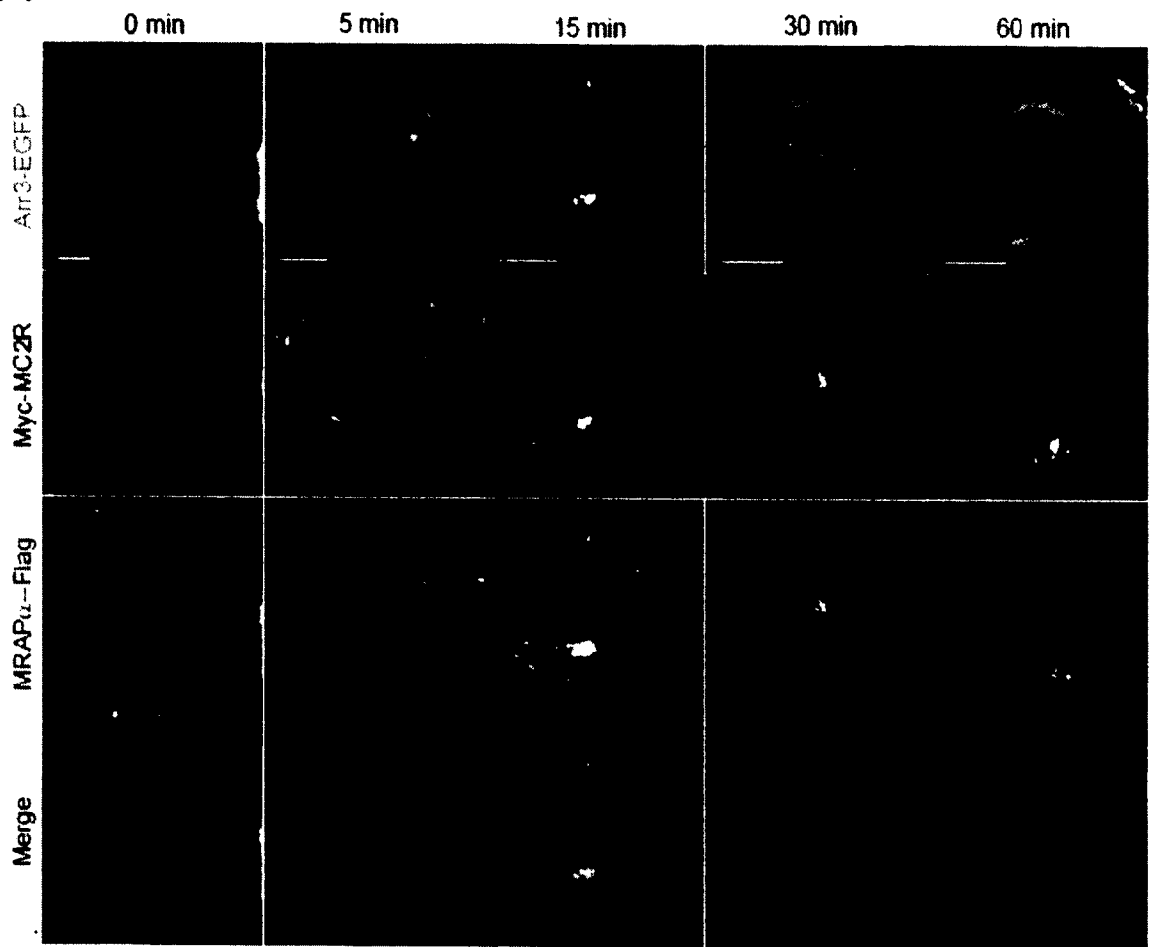
ACTH-induced MC2R internalization was compared by confocal microscopy with isoproterenol-induced β_2 AR and angiotensin II (Ang II)-induced AT $_1$ R internalization in 293/FRT cells co-transfected with arrestin3-EGFP. Cells were stimulated with 100 nM ACTH, 1 μ M isoproterenol or 1 μ M angiotensin II respectively and cells were fixed at different time points. After 30 min stimulation, MC2R and β_2 AR exhibited similar patterns of internalization characterized by a partial recruitment of arrestin3 to the plasma membrane and into endosomes in the presence of their respective agonists (Fig. 1C, D, arrows) (and supplemental Figures 1 and 2), whereas Ang II-stimulated AT $_1$ R accumulated and colocalized exactly with arrestin3 into endosomes (Fig. 1E).

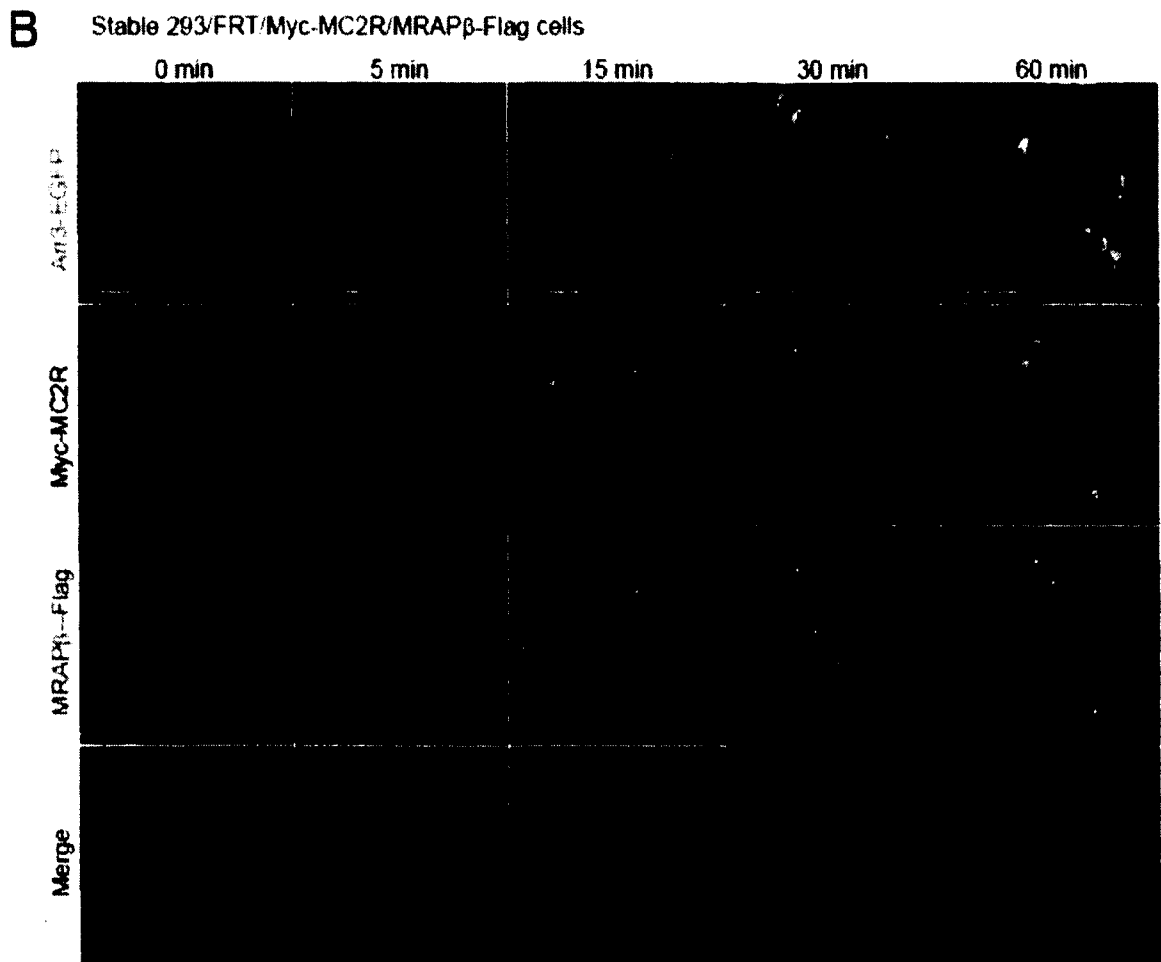
A Stable 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells





Supplemental Fig. 1 Arrestin2 colocalization during MC2R internalization. A-B) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells (B) were transiently transfected with arrestin2-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Arrestin2 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. In merged images, arrows point at triple colocalization (white color in the MC2R image set). Images are representative of three independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

AStable 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells



Supplemental Fig. 2 Arrestin3 colocalization during MC2R internalization. A-B) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells (B) were transiently transfected with arrestin3-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Arrestin3 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. In merged images, arrows point at triple colocalization (white color in the MC2R image set). Images are representative of three independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

Receptor internalization involves formation of vesicles (either clathrin-coated pits or caveosomes), followed by their scission from the plasma membrane, an event mediated by the activity of dynamin (35). To verify whether MC2R internalization is dependent on dynamin activity, cells were transiently transfected with the dominant-negative dynamin-K44A mutant (GTPase inactive) and stimulated with vehicle, 0.1 nM or 100 nM ACTH for 30 min. In contrast to control (GFP)-transfected cells, MC2R internalization was abrogated in dynamin-K44A transfected cells (Fig. 2A). Similar data were also obtained in cells expressing MC2R and MRAP α (data not shown). Additionally, live-cell imaging was performed using the cell-impermeable HaloTag-ALEXAFluor488 ligand on 293/FRT cells stably expressing Halo-Myc-MC2R and MRAP β (Fig. 2B). After 15 min of stimulation with 100 nM ACTH, Halo-Myc-MC2R internalized efficiently, while under similar conditions, there was no internalization in cells stimulated with 1 μ M NDP-MSH (a potent α -MSH analogue) nor in cells transfected with dynamin-K44A and then stimulated with 100 nM ACTH (Fig. 2C). Together, these results indicate that MC2R internalization is dynamin-dependent.

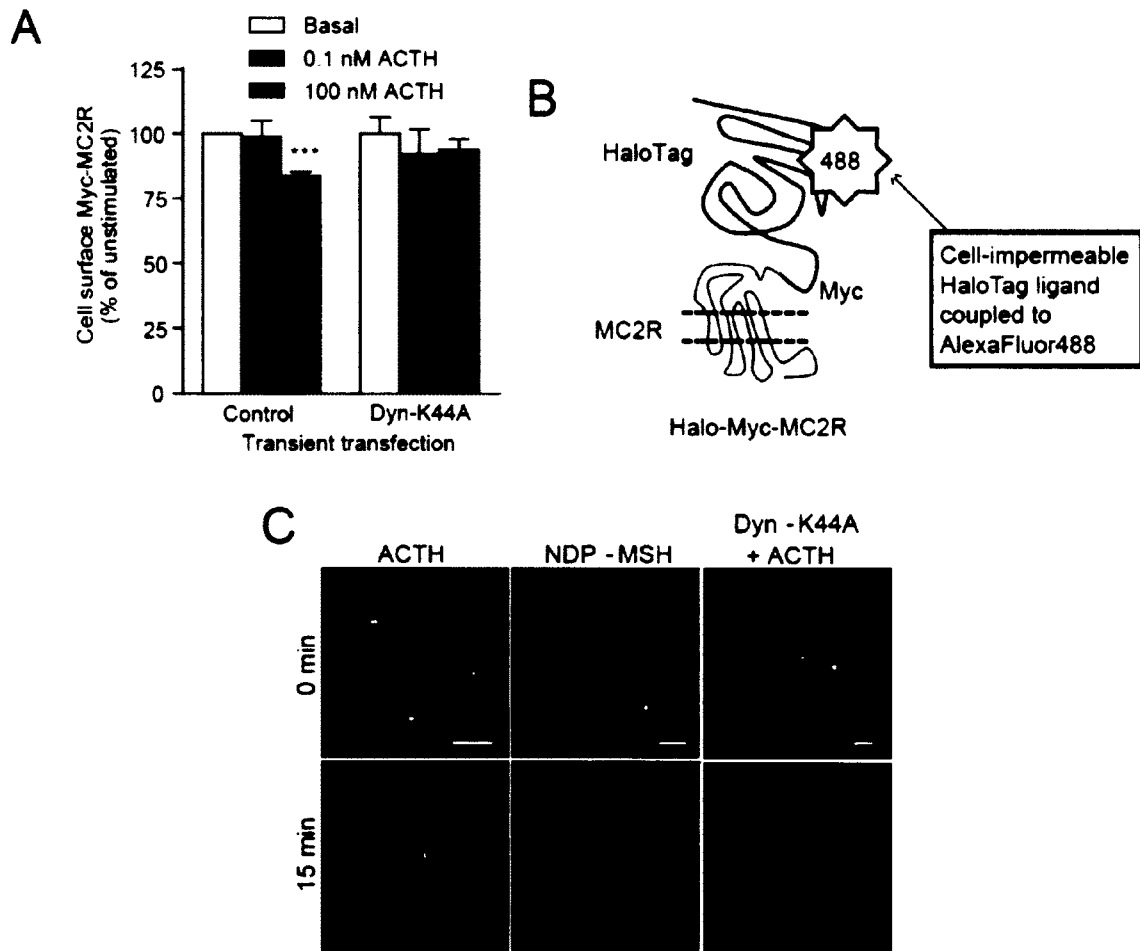


Fig. 2 Dynamin-dependent MC2R internalization. A) Dynamin-K44A- or control-transfected cells were stimulated with vehicle, 0.1 nM ACTH or 100 nM ACTH for 30 min after which Myc-MC2R cell-surface expression in 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells was measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of 3 separate experiments. B) Schematic representation of the HaloTag system using the Halo-Myc-MC2R fusion protein. C) 293/FRT/Halo-Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells transfected or not with Dyn-K44A were incubated 15 min with the cell-impermeant HaloTag ligand, washed and stimulated with ACTH 100 nM or NDP-MSH 1 μ M and examined after 15 min with a spinning disk confocal microscope (representative images of three independent experiments). Scale bars, 10 μ m. Statistical significance, compared with control: *** p < 0.001.

MC2R internalization has previously been shown to be clathrin-, but not caveolin-dependent in murine Y6 and M3 cells (14, 15). To verify whether MC2R internalization was also clathrin-dependent in 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells, cells were pre-

incubated in hypertonic sucrose (450 mM) and incubated with vehicle, 100 nM ACTH or 100 nM ACTH + 1 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) for 30 min. In contrast to control cells, MC2R internalization was abrogated in the presence of sucrose, indicating that MC2R internalization required clathrin adapters (Fig. 3A). Additionally, increasing intracellular cAMP concentrations by preincubating the cells with IBMX did not increase MC2R internalization in control conditions while forskolin, a direct activator of adenylyl cyclases, did not induce any internalization of MC2R (Fig. 3A), indicating that ACTH binding to MC2R is necessary to trigger MC2R internalization and that cAMP production by itself is without effect. Similar data were obtained in a cell line stably expressing MC2R and MRAP α (Supplemental Figure 3). Supporting these results, immunofluorescence studies indicated that MC2R did not colocalize with clathrin triskelions prior to ACTH stimulation, but did colocalize massively with clathrin in endosomes after ACTH stimulation (Fig. 3B, arrow). Moreover, MC2R did not colocalize with caveolin-1 under either unstimulated or stimulated conditions (Fig. 3C).

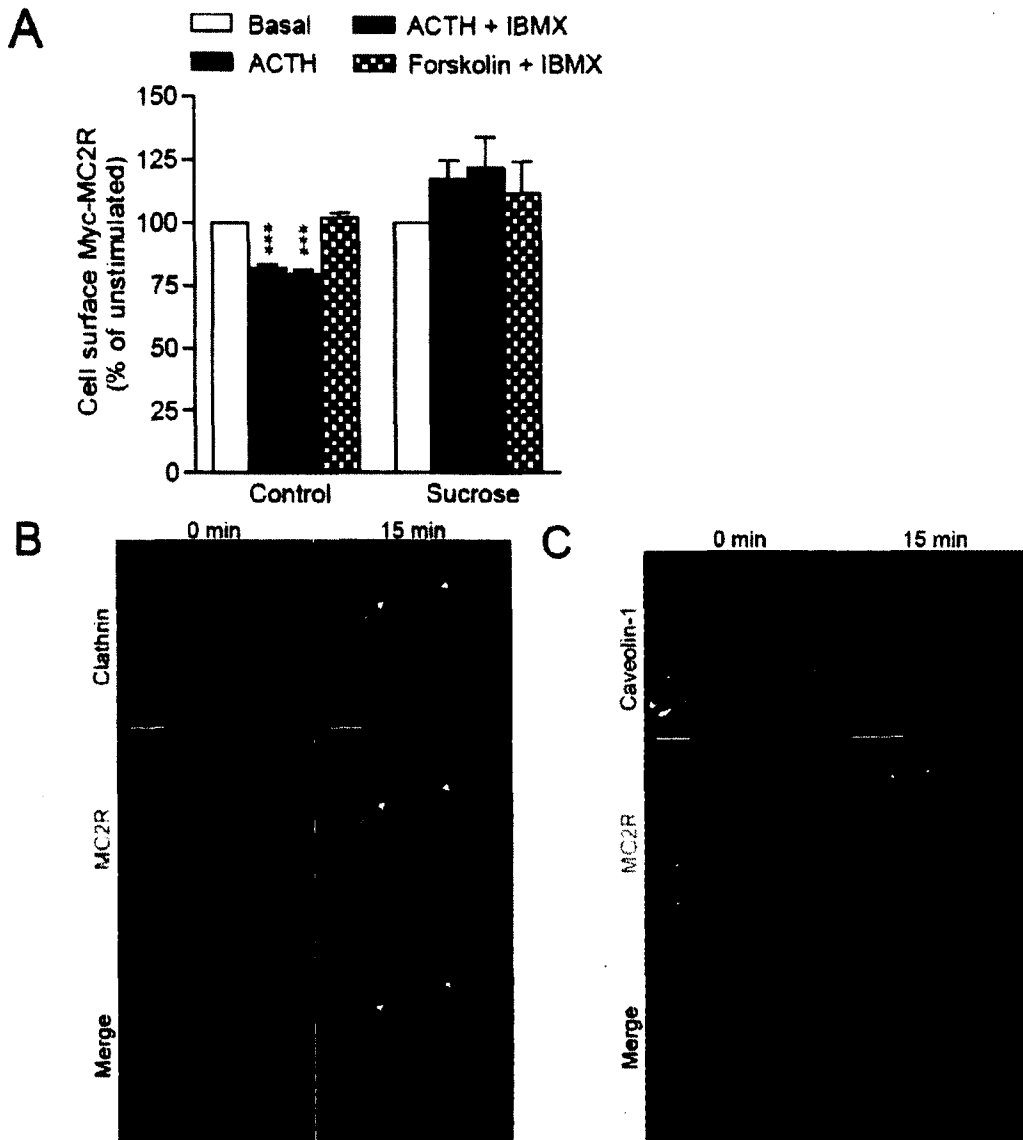
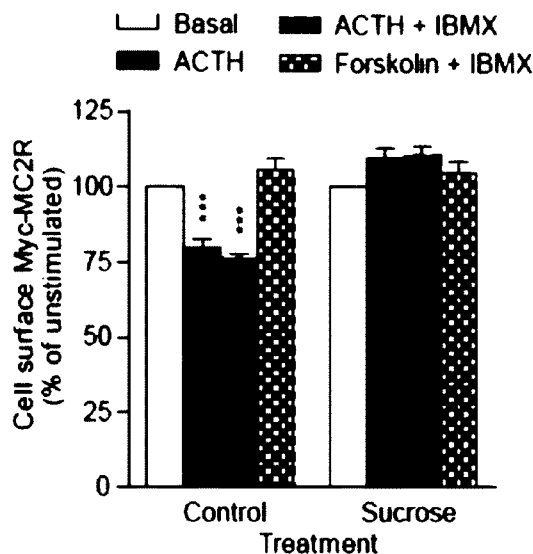


Fig. 3 Clathrin-mediated MC2R internalization. A) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were preincubated or not with 450 mM sucrose and stimulated with vehicle, 100 nM ACTH, 100 nM ACTH + 1 mM IBMX or 10 μ M forskolin + 1 mM IBMX for 30 min followed by measurement of cell-surface MC2R by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of 3 separate experiments. B-C) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were stimulated with ACTH 100 nM for 15 min and processed for static immunofluorescence microscopy. Clathrin (B) or caveolin-1 (C) and Myc-MC2R were indirectly labeled with rabbit polyclonal antibodies against the native proteins or mouse monoclonal anti-Myc antibody and detected with appropriate AlexaFluor-labeled secondary antibodies. Clathrin and Caveolin-1 are labeled in red and MC2R in green pseudo-colors in merged images. Arrows point at colocalization (yellow color). Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars, 10 μ m. Statistical significance, compared with control: ***p < 0.001.

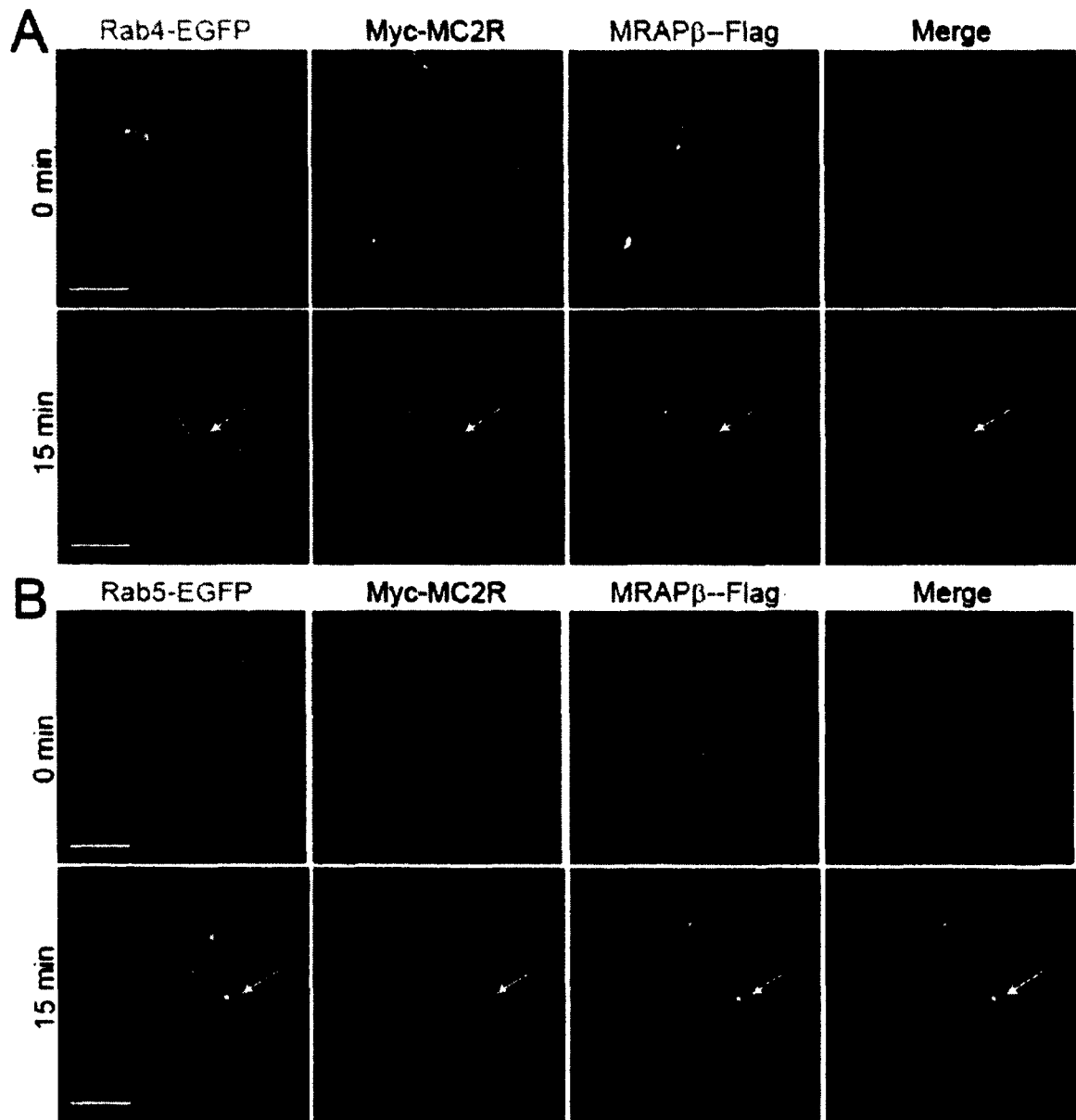


Supplemental Fig. 3 Clathrin-mediated MC2R internalization (with MRAP α). 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells were preincubated or not with 450 mM sucrose and stimulated with vehicle, 100 nM ACTH, 100 nM ACTH + 1 mM IBMX or 10 μ M forskolin + 1 mM IBMX for 30 min and cell-surface MC2R was measured by ELISA (n = 3).

Internalized MC2R traffics into recycling endosomes

To determine the behavior of MC2R and MRAPs after internalization, cells stably expressing MC2R and MRAP β (or MRAP α in Supplemental Figures 4-7) were transiently transfected with Rab4- (recycling endosomes), Rab5- (early endosomes), Rab7- (late endosomes and lysosomes) or Rab11-EGFP (slow recycling perinuclear/Golgi endosomes) (21, 22). Cells were incubated with vehicle or with 100 nM ACTH for different time periods and examined under a confocal microscope. MRAP β fluorescence colocalized with MC2R at the plasma membrane in control conditions and into endosomes upon ACTH stimulation, indicating a concomitant internalization of MC2R and MRAP. After ACTH stimulation, internalized MC2R and MRAP β colocalized with Rab4 (Fig. 4A), Rab5 (Fig. 4B) and Rab11 (Fig. 4D), but not with Rab7 (Fig. 4C) (see also Supplemental Figures 4-7). Results obtained using MRAP α , as an accessory protein for MC2R, were similar (Supplemental Figures 4-7). These data indicate that MC2R

traffics in different types of endosomes. These results hence suggest that MC2R and MRAPs may be recycled back to the plasma membrane.



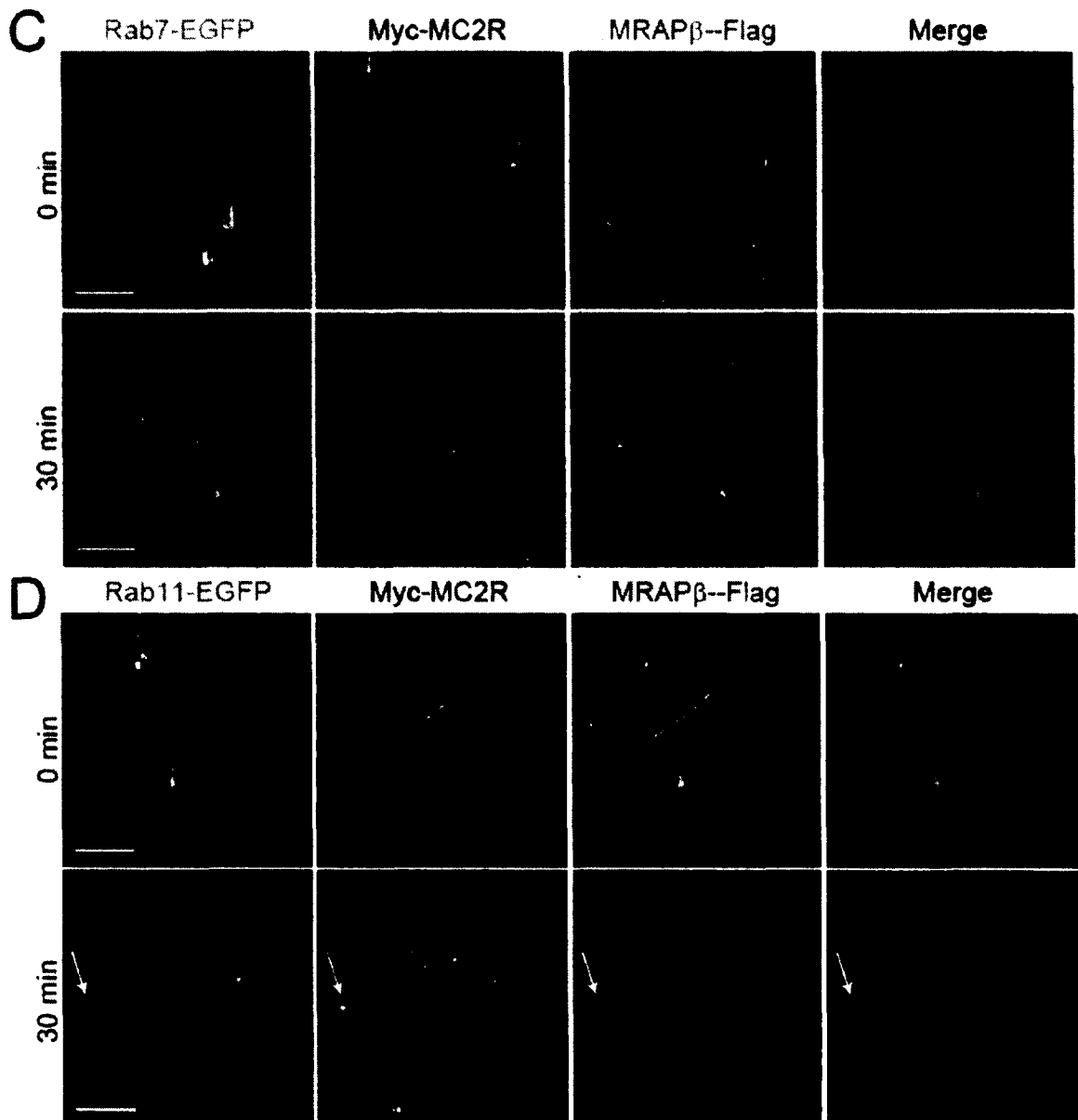
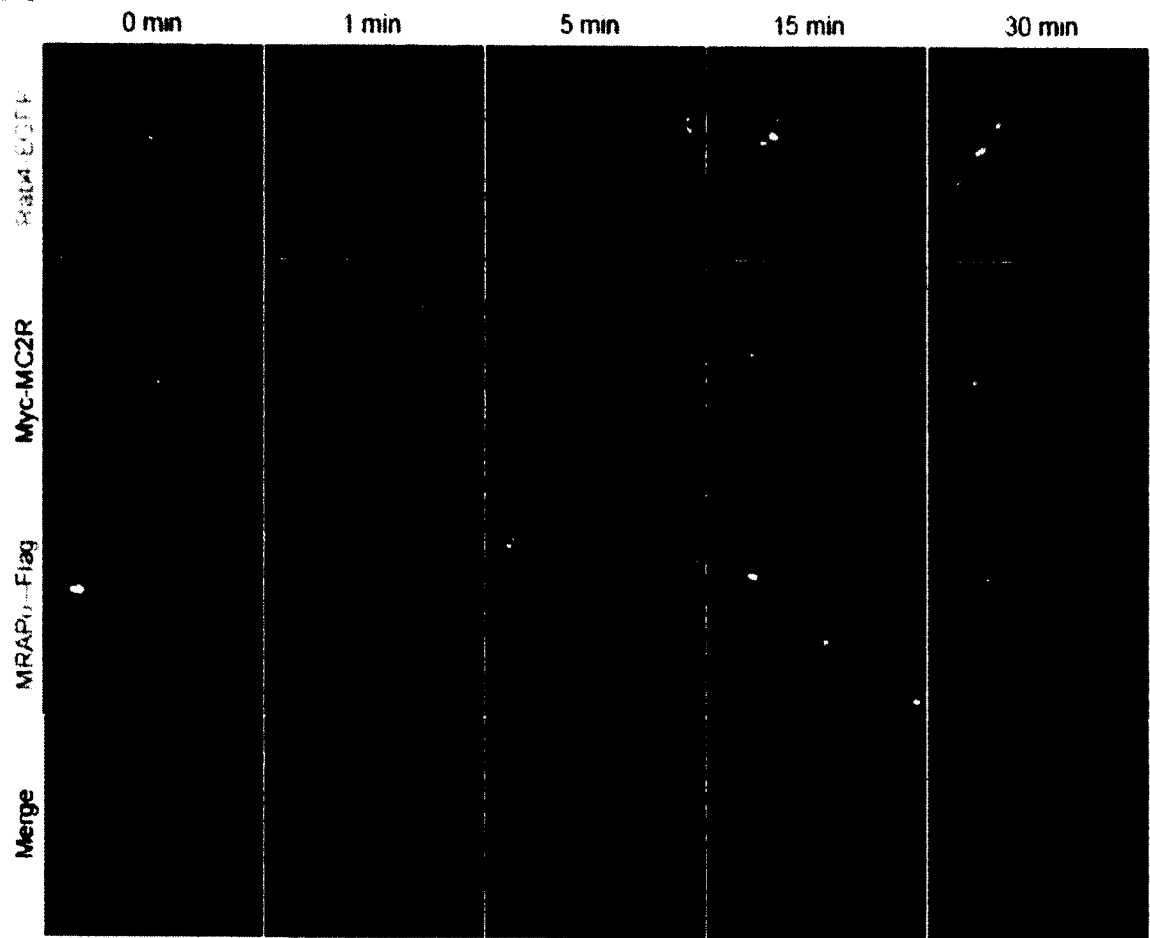
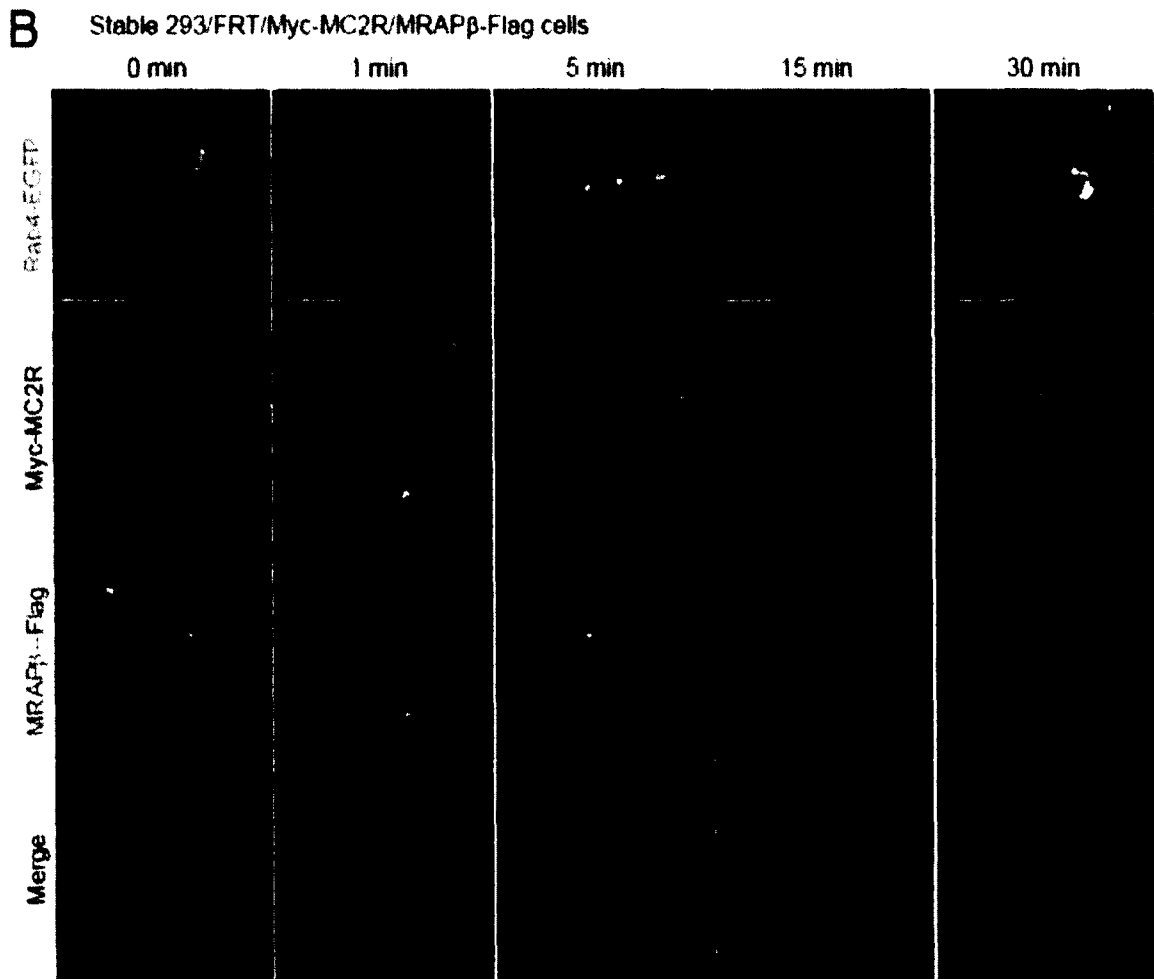


Fig. 4 ACTH-stimulated endosomal trafficking of MC2R and MRAP. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were transiently transfected with Rab4-EGFP (A), Rab5-EGFP (B), Rab7-EGFP (C) or Rab11-EGFP (D), stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for static immunofluorescence microscopy. Images are representative of three independent experiments. Rab proteins are labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. Arrows point at triple colocalization (white color). Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Scale bars, 10 μ m

A

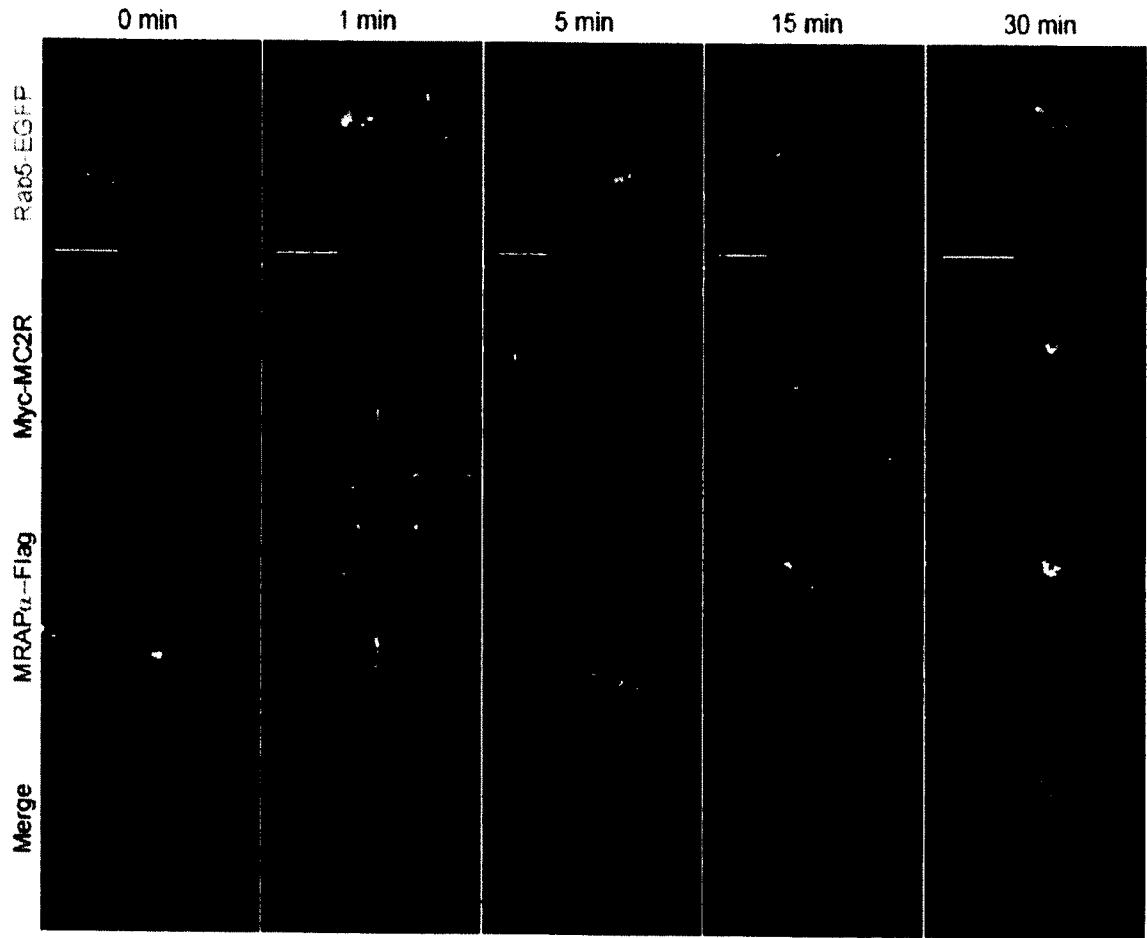
Stable 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells

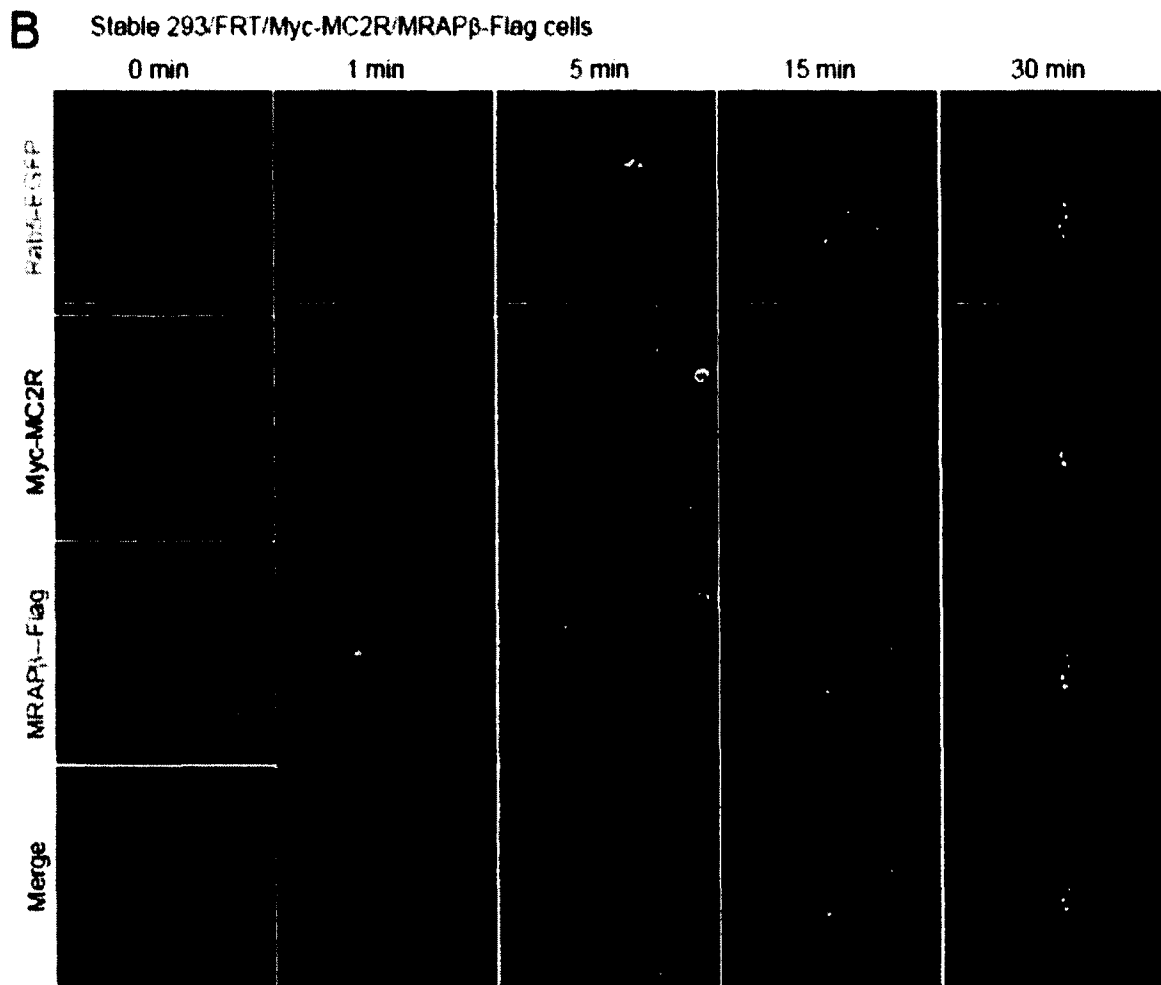




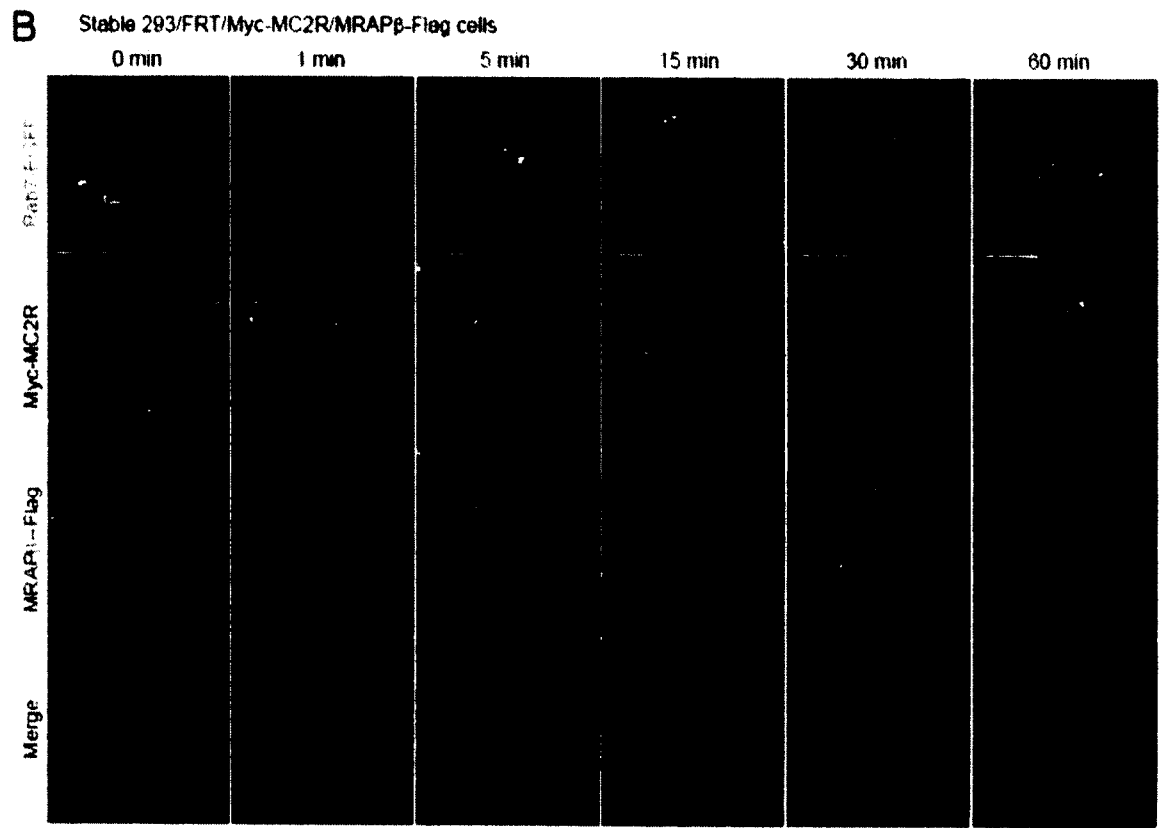
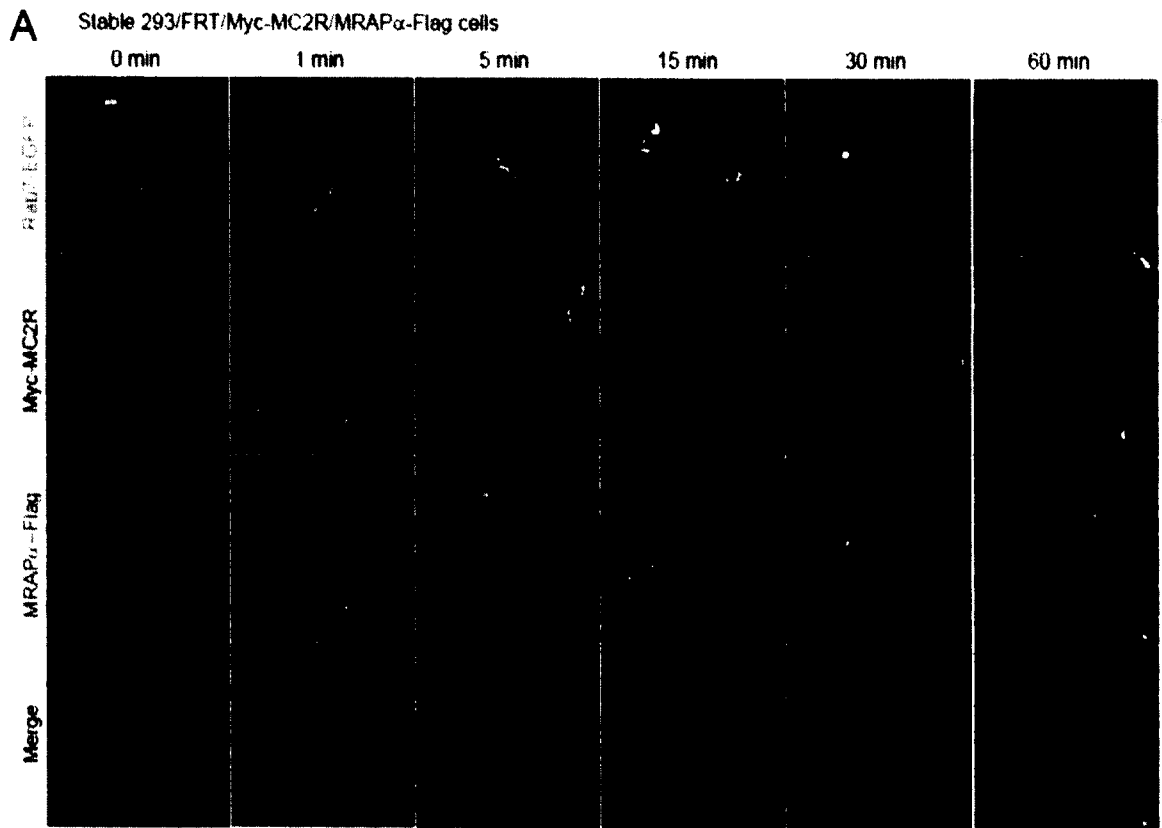
Supplemental Fig. 4 MC2R and MRAP trafficking in Rab4-positive endosomes. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag (B) cells were transiently transfected with Rab4-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Rab4 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Arrows point at triple colocalization (white color). Scale bars, 10 μ m.

A Stable 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells

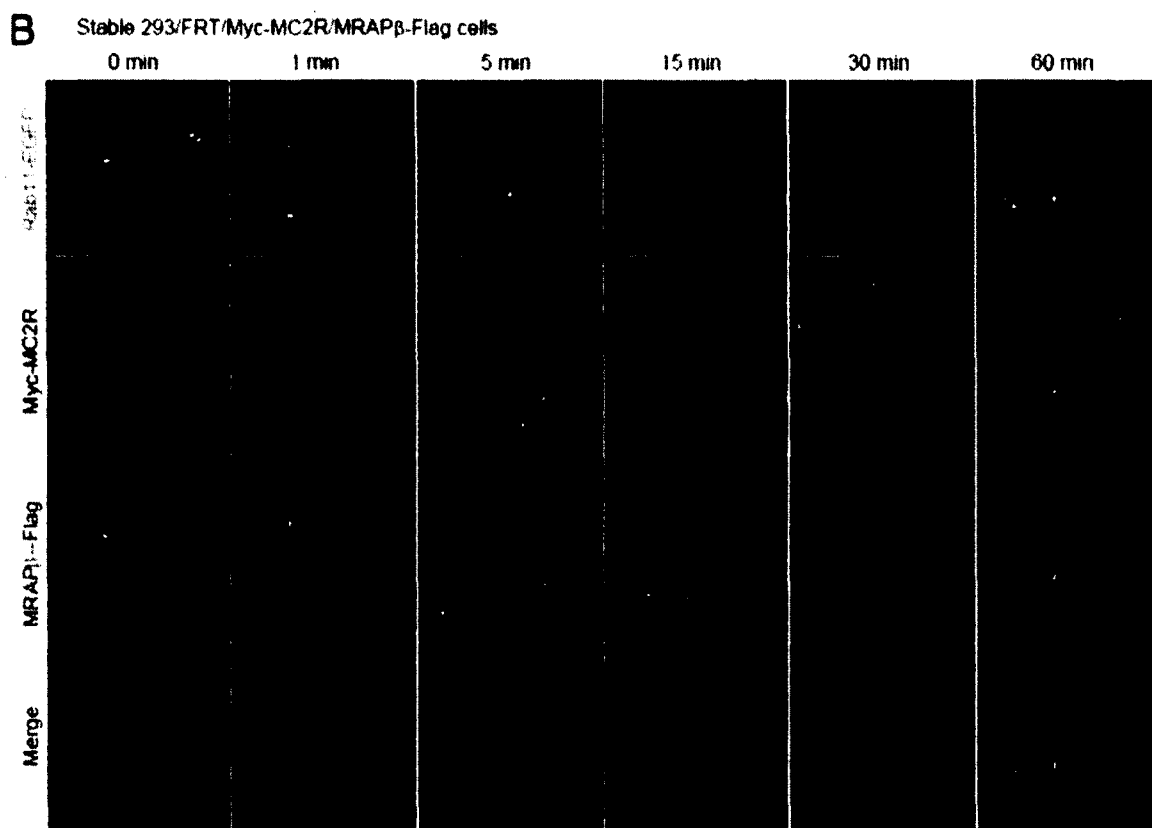
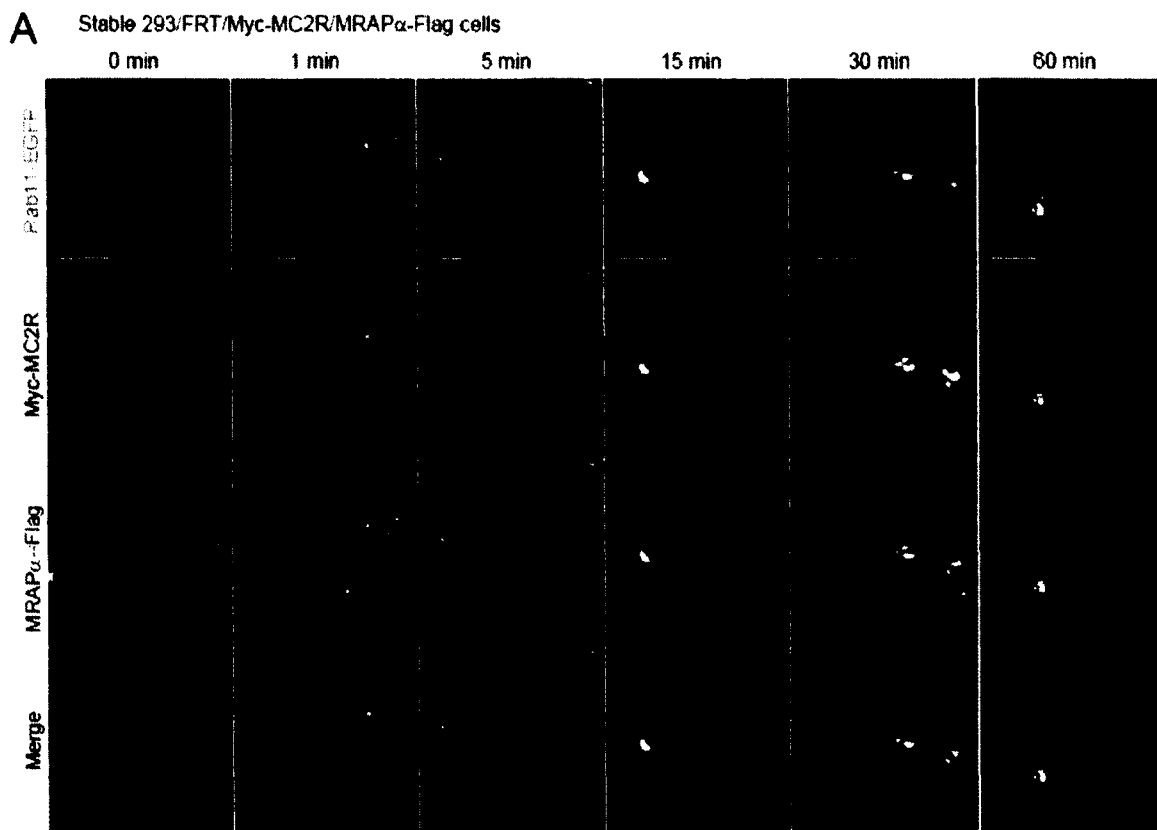




Supplemental Fig. 5 MC2R and MRAP trafficking in Rab5-positive endosomes. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag (B) cells were transiently transfected with Rab5-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Rab5 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Arrows point at triple colocalization (white color). Scale bars, 10 μ m.



Supplemental Fig. 6 MC2R and MRAP trafficking in Rab7-positive endosomes. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag (B) cells were transiently transfected with Rab7-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Rab7 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Arrows point at triple colocalization (white color). Scale bars, 10 μ m.



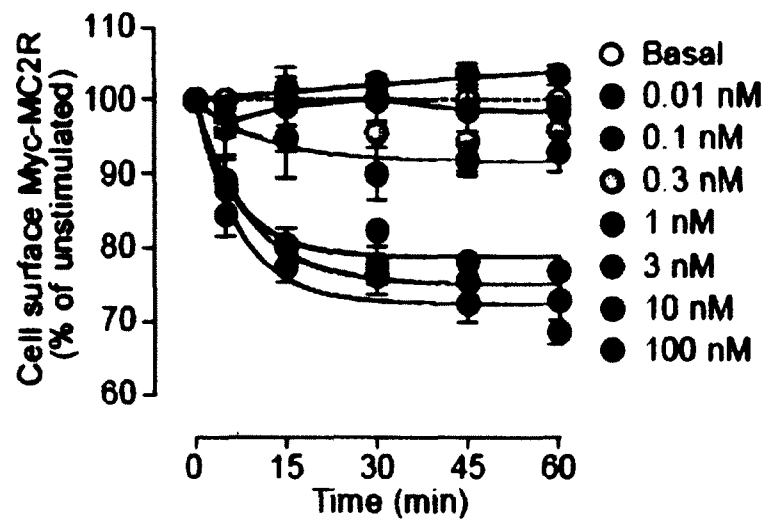
Supplemental Fig. 7 MC2R and MRAP trafficking in Rab11-positive endosomes. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (A) and 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag (B) cells were transiently transfected with Rab11-EGFP, stimulated with ACTH 100 nM for the indicated times and processed for confocal immunofluorescence microscopy. Rab11 is labeled in green, MC2R in blue and MRAP in red pseudo-colors in merged images. Images are representative of two independent experiments where at least 50 cells were examined. Arrows point at triple colocalization (white color). Scale bars, 10 μ m.

Cells were also stimulated with increasing concentrations of ACTH from 0.001 to 100 nM and stimulated for various durations for up to 60 min. The maximal loss in cell-surface Myc-MC2R (MC2R internalization) after 60 min under 100 nM ACTH was evaluated at $28 \pm 2\%$ ($t_{1/2, 100 \text{ nM}} = 6 \text{ min}$) (Fig. 5A). ACTH at concentrations lower than 0.3 nM did not induce any apparent internalization of MC2R. A characterization of MC2R internalization was also performed using MRAP α as an accessory protein (Supplemental Figure 8). Furthermore, MC2R did not internalize in absence of MRAP α or MRAP β (data not shown).

To determine whether MC2R was recycled back to the plasma membrane after ACTH stimulation, cells were preincubated in the absence or presence of the Golgi *cisternae*-disrupting agent brefeldin A (BFA) (10 μ g/ml) (36, 37) or of the endosome recycling inhibitor monensin (25 μ M) (38-40). Cells were then stimulated with low (0.1 nM) or high (100 nM) concentrations of ACTH and MC2R internalization was measured by ELISA. As shown in Fig. 5B-C, cells stimulated with 0.1 nM ACTH did not show any decrease in cell-surface receptor levels in the absence or presence of either BFA or monensin. Non-linear regression analyses indicated that, in the absence of BFA, 100 nM ACTH decreased cell-surface expression to 71%, thus induced a loss of cell-surface MC2R of $29 \pm 1 \%$ (raw internalization), which increased to $40 \pm 1 \%$ (net internalization) in the presence of BFA. These differences indicate that $28 \pm 2 \%$ of internalized receptors recycled back to the plasma membrane through a BFA-sensitive organelle (Fig. 5B). Similarly, in the absence of monensin, cell surface expression decreased to 67%, indicating raw internalization was $33 \pm 2 \%$, which increased to $51 \pm 2 \%$ in the presence of monensin, indicating that $35 \pm 4 \%$ of internalized receptors were recycled *via* monensin-sensitive endosomes (Fig. 5C). After a 90-min incubation in BFA-containing

medium, basal cell-surface levels of Myc-MC2R remained unchanged as compared to control cells (data not shown), thus eliminating the possible contribution of newly synthesized receptors to the plasma membrane population analyzed.

To investigate whether recycled receptors contribute to the sustained ACTH response, cAMP levels were measured in cells preincubated with or without BFA or monensin. After 60 min stimulation with 100 nM ACTH, cAMP levels were lower in BFA- and monensin-treated cells compared to control cells (Fig. 5D). Together, these results indicate that MC2R undergoes recycling at the plasma membrane and that these recycled receptors are functional, thus contributing to a high and sustained level of cAMP production under ACTH stimulation.



Supplemental Fig. 8 MC2R internalization. 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag cells were washed and incubated with varying ACTH concentrations without IBMX for the indicated times and fixed for extracellular Myc-tag detection by cell-surface ELISA procedures ($n = 3$). When possible, curves were fitted with an exponential decay non-linear regression. Results are expressed as mean \pm SEM of three separate experiments, each performed in duplicate.

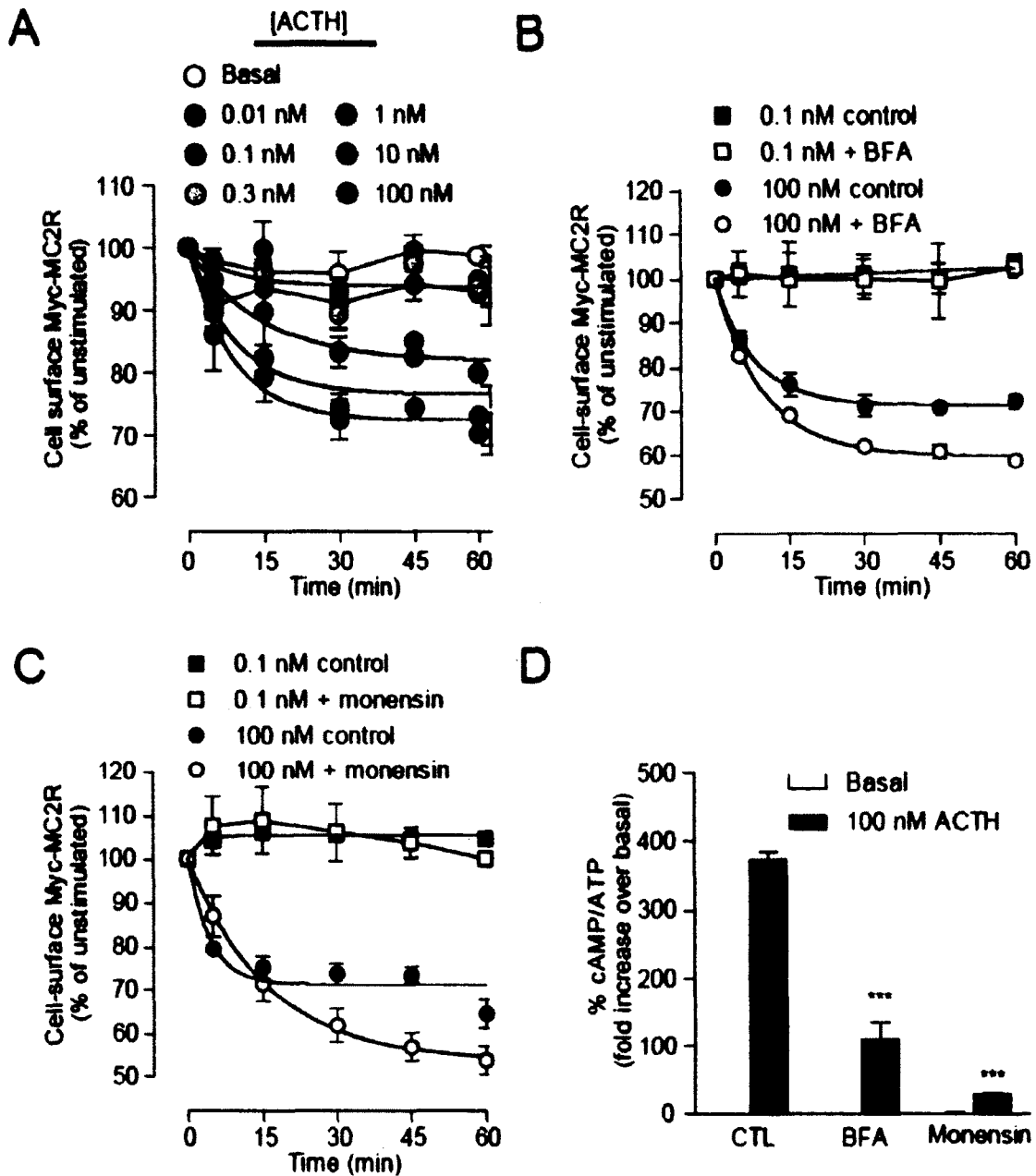


Fig. 5 MC2R internalization and recycling. A) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were washed and incubated with varying ACTH concentrations without IBMX for the indicated times and fixed for extracellular Myc tag detection by cell-surface ELISA procedures ($n = 3$). B-C) 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were incubated with ACTH (0.1 or 100 nM) for varying time periods in the presence or absence of 10 μ g/ml BFA (B) or 25 μ M monensin (C) and subsequently fixed for extracellular Myc tag detection by cell-surface ELISA procedures. D) Cells were preincubated 30 min with 10 μ g/ml BFA or 25 μ M monensin and cAMP formation was measured after 60 min stimulation with 100 nM ACTH. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of 3 separate experiments. Curves were fitted with an exponential decay non-linear regression function. Statistical significance, compared with control: *** $p < 0.001$.

Importance of MC2R S/T residues for its cell-surface expression

In addition to promoting receptor desensitization and internalization (41), receptor phosphorylation can regulate plasma membrane targeting of GPCRs (42). The aim of the following experiments was to identify the role of all intracellular *Ser* (S) and *Thr* (T) residues of MC2R as possible phosphorylation sites by PKA, PKC or other kinases involved in MC2R cell-surface expression and in MC2R-mediated cAMP accumulation and internalization. All intracellular S/T residues of MC2R were mutated into a non-phosphorylatable residue (*Ala*, A) or a residue partially mimicking phosphorylation (*Asp*, D) (Fig. 6). Additional T143 mutants (T143S, T143G and T143K) were generated and analyzed because the phosphorylation of the homologous residue (T157) from the melanocortin-1 receptor (MC1R) has been shown to be critical for receptor export to the plasma membrane (42, 43). In the case of T143A/D/S/G/K, the lateral chain of A provides a hydrophobic, neutral and apolar lateral chain; D is hydrophilic, negatively charged and polar; *Ser* (S) is hydrophilic, neutral and polar; *Gly* (G) has no lateral chain; and finally *Lys* (K) is hydrophilic, positively charged and polar.

As summarized in Fig. 6, according to NetPhosK with evolutionary stable site filtering analysis (www.cbs.dtu.udk/services) of the amino acid structure of MC2R, S140, T147, S208 and S294 may be phosphorylation targets for PKA while T143 (highest score above threshold), T204 and T209 may be targets for PKC.

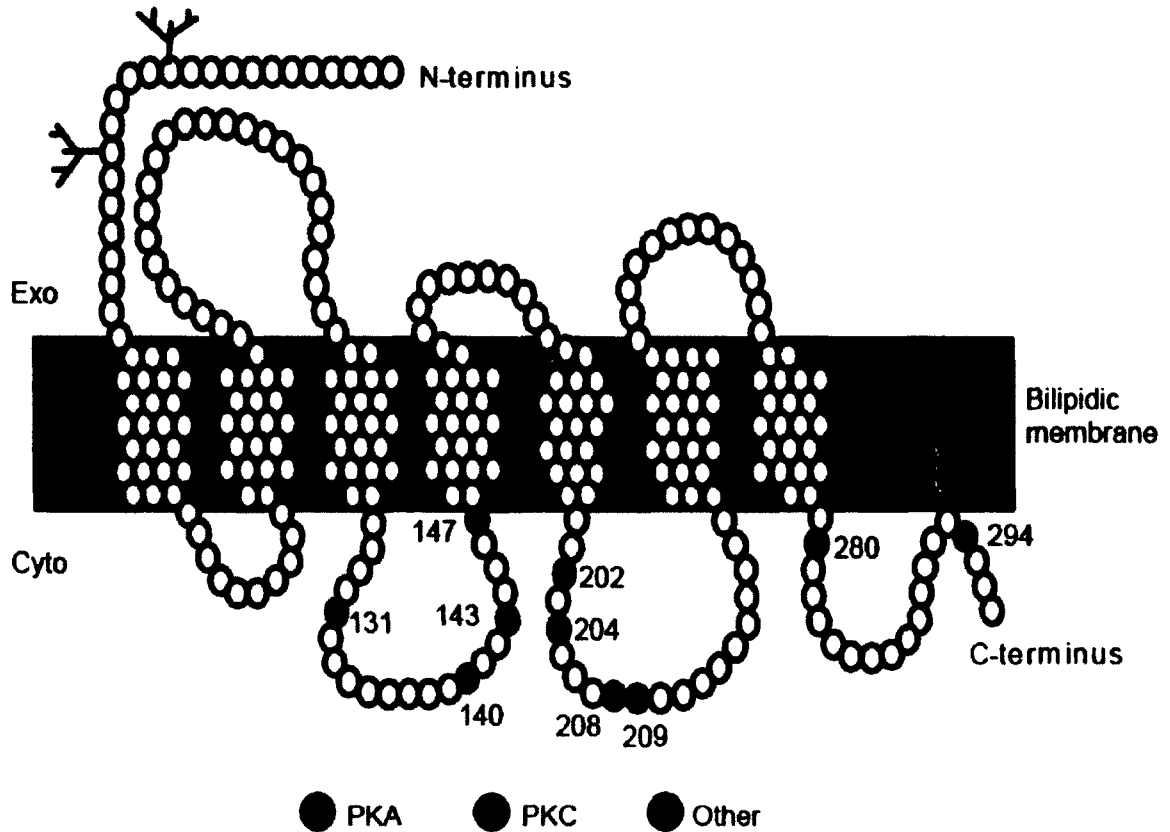
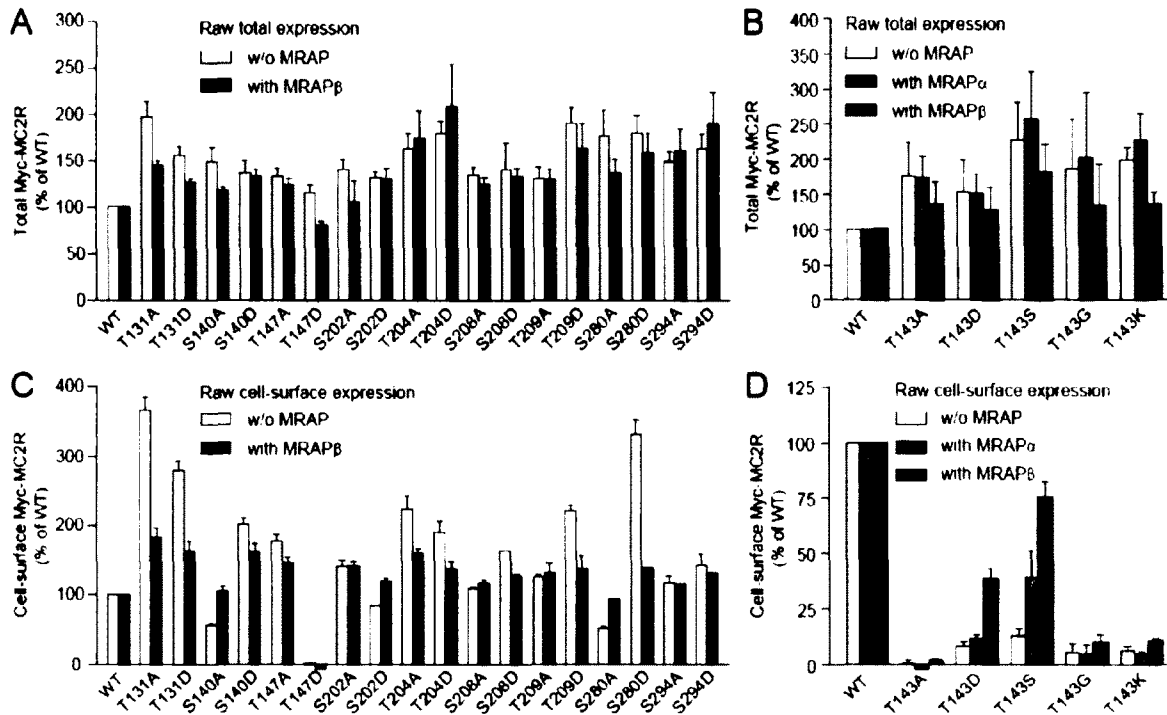


Fig. 6 Schematic representation of the human MC2R with predicted sites of phosphorylation and associated Ser/Thr kinases. Classical heptahelical snake-plot representation of MC2R. Each circle represents 1 amino acid. The sites of phosphorylation were predicted using NetPhosK 1.0 with ESS filtering (www.cbs.dtu.dk/services).



Supplemental Fig. 9 Role of S/T residues in MC2R cell-surface expression. A-D) Each individual 293/FRT/Myc-mutant cell line transfected with control (GFP) or indicated MRAP1s and were processed through whole-cell ELISA procedures to determine raw total (A-B) and raw cell-surface expression (C-D) of MC2R mutants. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments, each performed in duplicate.

All of the above S/T mutants were transiently transfected in cells stably expressing the receptors and transfected with GFP (control), MRAP α (only for T143A/D/S/G/K) or MRAP β , and assayed in whole-cell-based ELISA determinations of raw total expression (Supplemental Figure 9A-B), raw cell-surface expression (Supplemental Figure 9C-D), and normalized cell-surface expression (Fig. 7A, B) (summarized in Tables 1-2). When each MC2R mutant was stably expressed in its own individual cell line (absence of MRAP1 (12), thus with endogenous MRAP2 only (30), total expression of each mutant MC2R was within a 2.5-fold range as compared to the WT receptor in the WT cell line (Supplemental Figure 9A). Since total expression levels varied for each mutant expressed in individual cell lines, cell-surface expression data were normalized to total expression levels (Fig. 7A). The advantage of using such an approach is that differences in the ability of each mutant to be expressed at the plasma membrane are more accurate than raw

expression results since total expression is taken into account (30). In the absence of MRAP β , T131A, T131D, S140D, T147A, T204A and S280D mutants exhibited significantly higher normalized cell-surface expression than WT (Fig. 7A; Table 1). S140A, T147D, S202D, S280A and T143A/D/S/G/K (Fig. 7A, B; Table 1) exhibited lower normalized cell-surface expression than WT in the absence of MRAP1s (Table 1). As compared to the absence of MRAP1s, MRAP β completely rescued the cell-surface expressions of S140A and S202D mutants and partially increased the cell-surface expressions of S280A (Fig. 7 A; Table 2). Similarly, MRAP α or MRAP β completely rescued the cell-surface expressions of T143D, T143S, T143G and T143K (Fig. 7 B; Table 2). The addition of MRAP α or MRAP β however failed to overcome the drastic effects of T143A and T147D; however some T143A cell-surface expression was measurable. As compared to the absence of MRAP1s, MRAP β decreased the cell-surface expression abilities of T131A, T131D, S140D, T147A, T204A and S280D to normal (WT-like) levels and increased the cell-surface expression of S202A above that of WT (Fig. 7A, B; Table 2).

Because MC2R N-glycosylation is important for cell-surface expression of MC2R (30), mutant proteins contained in cell extracts from 293/FRT/MRAP β cells transiently transfected with the mutant MC2Rs were analyzed by reducing SDS-PAGE and Western blotting to verify if the mutants were N-glycosylated. A lack of N-glycosylation could account for the impairments in cell-surface expression of T143/A/D/S/G/K, T147D and S280A in presence of MRAP β (indicated in red in Fig. 7A-C). As compared to WT MC2R and to the unglycosylated MC2R mutant (QQQQ) (30), all mutants were fully N-glycosylated (Fig. 7C), and hence present in native (25 kDa), core-glycosylated (33 kDa) and terminally glycosylated (50-65 kDa) forms (30). Thus, T143/A/D/S/G/K, T147D and S280A did not suffer from a lack of N-glycosylation.

Table 1. Non-functional (without MRAP1s) characteristics of Myc-tagged MC2R and mutants.

Myc-MC2R	Surface MC2R expression w/o MRAP β (% of WT)	Total MC2R expression w/o MRAP (% of WT)	Normalized surface expression w/o MRAP (% of WT)
WT	100	100	100
T131A	365 \pm 20	196 \pm 16	181 \pm 17 ***
T131D	279 \pm 15	154 \pm 10	178 \pm 16 ***
S140A	55 \pm 3	147 \pm 15	37 \pm 5 ***
S140D	200 \pm 10	135 \pm 13	150 \pm 12 ***
T143A	1 \pm 2	176 \pm 48	1 \pm 1 ***
T143D	9 \pm 2	154 \pm 45	6 \pm 1 ***
T143S	13 \pm 4	226 \pm 55	5 \pm 1 ***
T143G	6 \pm 4	186 \pm 71	2 \pm 2 ***
T143K	6 \pm 2	199 \pm 18	3 \pm 1 ***
T147A	176 \pm 10	132 \pm 9	134 \pm 6 *
T147D	< 1	114 \pm 9	< 1 ***
S202A	141 \pm 8	138 \pm 11	102 \pm 5
S202D	84 \pm 1	131 \pm 7	65 \pm 4 *
T204A	224 \pm 19	161 \pm 17	140 \pm 5 **
T204D	189 \pm 16	178 \pm 14	106 \pm 1
S208A	108 \pm 2	133 \pm 9	81 \pm 7
S208D	163 \pm 1	139 \pm 29	123 \pm 26
T209A	125 \pm 4	129 \pm 12	99 \pm 10
T209D	221 \pm 8	188 \pm 17	119 \pm 7
S280A	51 \pm 4	175 \pm 29	31 \pm 7 ***
S280D	331 \pm 21	178 \pm 19	188 \pm 14 ***
S294A	116 \pm 10	147 \pm 11	80 \pm 7
S294D	142 \pm 16	162 \pm 15	85 \pm 1
QQQQ	3 \pm 1 ^t	69 \pm 10 ^t	5 \pm 1 ^t

Receptors were stably expressed in 293/FRT/Myc-mutant cell lines and transfected with a control (GFP). Cell-surface and total receptor expression were measured by ELISA. Results are shown as mean \pm SEM from 3 to 5 experiments. Statistical significances: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Statistical significance is only shown for the normalized data.

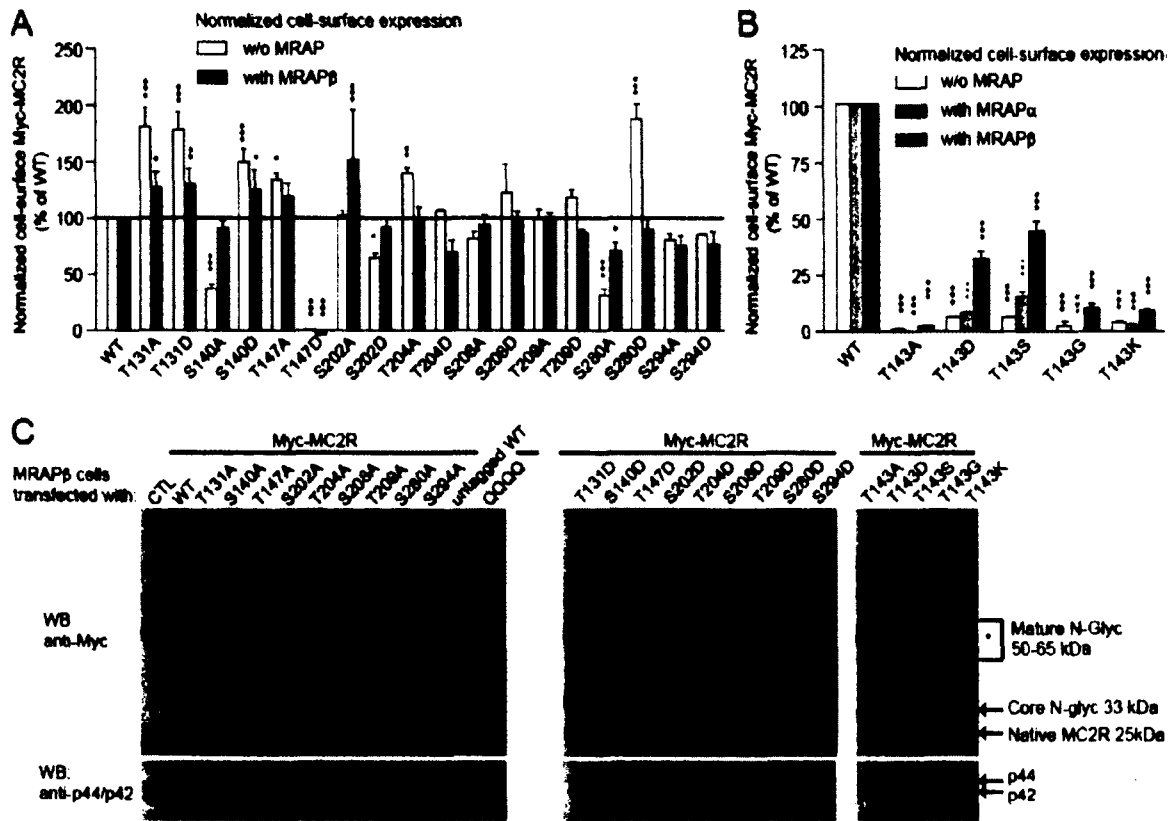


Fig. 7 Role of S/T residues in MC2R cell-surface expression. Each individual 293/FRT/Myc-mutant cell line was transfected with control (GFP) or indicated MRAP1s and was processed through whole-cell ELISA procedures to determine raw total and raw cell-surface expression of MC2R mutants. **A-B** Raw cell-surface expression was normalized over raw total expression of each mutant with or without MRAP1 expression. Mutants with decreased normalized cell-surface expressions are indicated in red. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to WT-MC2R. **C**) Each mutant MC2R was transiently transfected in stable 293/FRT/MRAP β cells and cell lysates were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis in denaturing conditions. Western blotting was performed against the Myc tag using monoclonal antibodies; membranes were then stripped to assess the presence of total p44/p42 expression in cell lysates as loading controls. Native, core-, and terminally N-glycosylated forms of Myc-MC2R (25, 33, 50-65 kDa) are indicated on the right. QQQQ is a mutant MC2R lacking all N-glycosylation sites whereas untagged-MC2R does not contain the N-terminal Myc-epitope. * designates the endogenous c-myc protein expressed in 293/FRT cells (60 kDa). This result was repeated twice with similar results.

Importance of S/T residues for MC2R internalization

Individual cell lines stably expressing MC2R mutants, including the QQQQ cell line (but not the T143G and T143K cell lines), were transfected with MRAP β . Cells were assayed in whole-cell-based internalization experiments and parameters (amount of cell-surface receptors remaining after 60 min and $t_{1/2}$) were monitored upon 100 nM ACTH stimulation (summarized in Table 2). As illustrated in Fig. 8A-F, certain mutants (T204D, S208A, T209A, S280A, S294A and S294D) maintained their ability to be internalized upon ACTH stimulation with similar internalization parameters as compared to WT-MC2R. On the other hand, T131A, T131D and S280D were unable to internalize whereas S140D internalization was very weak. Other mutants (T147A, S202A, S202D, T204A, S208D and T209D) exhibited partially impaired internalization profiles. Conversely, the maximal internalization of S140A and of T143A/D/S was rather increased and occurred faster than WT. In contrast, the maximal internalization of QQQQ (the unglycosylated MC2R mutant) was greater than WT but occurred 5 times slower (graph not shown; Table 2).

Importance of S/T residues for MC2R-mediated cAMP accumulation

As depicted in Fig. 9 and summarized in Table 2, most mutants (T131A, S140A, T143S, S202A, S202D, S208A, S208D, T209A, S280A and S294A) exhibited the same responses to ACTH as WT-MC2R ($t_{1/2}$ and R_{max}). For T131D, T143D, T143K, T204D and S280D, the rate of cAMP accumulation was faster than WT but only T131D, T143K and S280D concomitantly generated lower maximal cAMP accumulations. No mutant exhibited a slower rate of cAMP accumulation than WT. For other mutants, only the maximal cAMP accumulation (R_{max}) was modified but not the rate at which it occurred (increased: T147A and T204A; decreased: S140D, T209D and S294D). Finally, T143A low cell-surface expression was sufficient to generate very low cAMP accumulation whereas T147D was practically unable to produce cAMP.

Table 2. Functional characteristics of Myc-tagged MC2R and mutants coexpressed with MRAP β .

Myc-MC2R	Surface MC2R expression with MRAP β (% of WT)	Total MC2R expression with MRAP β (% of WT)	Normalized surface expression with MRAP β (% of WT)	T $_{1/2}$ cAMP (min)	R $_{max}$ cAMP (% of WT)	T $_{1/2}$ internalization (min)	Remaining surface receptors after 60 min ^{&} (% of WT)
WT	100	100	100	12.5 \pm 1.4	100	3.28 \pm 0.48	78 \pm 1
T131A	181 \pm 15	144 \pm 6	127 \pm 14 *	13.2	91 \pm 4	~ 0.08	95 \pm 2 ***
T131D	162 \pm 14	126 \pm 4	130 \pm 14 **	4.5 *	22 \pm 1 ***	N/D	~ 100 ***
S140A	105 \pm 6	117 \pm 4	91 \pm 8	14.8	94 \pm 3	2.54	72 \pm 1 ***
S140D	161 \pm 14	132 \pm 7	125 \pm 18 *	11.5	81 \pm 3 *	4.13	92 \pm 1 ***
T143A	2 \pm 1	135 \pm 33	1 \pm 1 ***	~ 0.01	3 \pm 1 ***	2.31	58 \pm 5 ***
T143D	38 \pm 5	128 \pm 32	32 \pm 4 ***	8.61 *	102 \pm 2	1.91	54 \pm 3 ***
T143S	75 \pm 8	181 \pm 41	44 \pm 5 ***	10.8	106 \pm 6	2.70	67 \pm 2 ***
T143G	10 \pm 3	135 \pm 58	9 \pm 3 ***	N/D	N/D	N/D	N/D
T143K	11 \pm 1	136 \pm 18	8 \pm 1 ***	5.14 *	35 \pm 3 ***	N/D	N/D
T147A	146 \pm 8	123 \pm 6	120 \pm 12	14.9	115 \pm 5 *	2.40	91 \pm 1 ***
T147D	< 1	81 \pm 4	< 1 ***	N/A	< 1 ***	~ 0.01	~ 42 ***
S202A	140 \pm 6	105 \pm 22	152 \pm 44 ***	16.7	104 \pm 4	3.85	83 \pm 1 *
S202D	118 \pm 5	130 \pm 11	92 \pm 8	16.3	107 \pm 8	6.94	86 \pm 2 **
T204A	160 \pm 6	172 \pm 30	98 \pm 11	12.6	119 \pm 7 **	2.07	89 \pm 2 **
T204D	138 \pm 9	207 \pm 46	69 \pm 12	6.08 *	101 \pm 5	3.72	80 \pm 2
S208A	115 \pm 5	124 \pm 7	93 \pm 9	12.7	105 \pm 3	2.33	78 \pm 2
S208D	126 \pm 4	132 \pm 9	96 \pm 10	11.3	95 \pm 3	6.11	88 \pm 2 **
T209A	131 \pm 14	129 \pm 11	101 \pm 4	12.1	109 \pm 9	3.08	80 \pm 2
T209D	138 \pm 17	162 \pm 27	87 \pm 4	11.9	89 \pm 4 *	2.16	85 \pm 1 **
S280A	93 \pm 8	135 \pm 15	70 \pm 9 *	13.3	96 \pm 4	5.12	81 \pm 2
S280D	140 \pm 16	157 \pm 21	90 \pm 10	10.4 *	69 \pm 1 ***	N/D	~ 100 ***
S294A	114 \pm 5	159 \pm 25	75 \pm 9	16.6	100 \pm 6	3.43	76 \pm 2
S294D	131 \pm 5	189 \pm 34	76 \pm 13	13.2	72 \pm 7 **	4.86	81 \pm 1
QQQQ	21 \pm 1 ^l	64 \pm 6 ^l	33 \pm 2 ^l	N/D	85 \pm 3 ^{ll}	16.0 ***	46 \pm 10 ***

Receptors were stably expressed in 293/FRT/Myc-mutant cell lines and transfected with MRAP β . Cells were stimulated with 100 nM ACTH in the presence (cAMP results) or absence (internalization results) of IBMX for different time intervals up to 60 min. Results are shown as mean \pm SEM from 2 to 5 experiments. [&] determined by non-linear regression. Data with ^l are from another publication (Roy *et al.*, 2010a) and ^{ll} was determined after 15 min of ACTH stimulation in a concentration-response experiment. QQQQ internalization parameters were measured in the same set of experiments as T143A, T143D and T143S and in parallel with WT. Statistical significances: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. N/D, not determined.

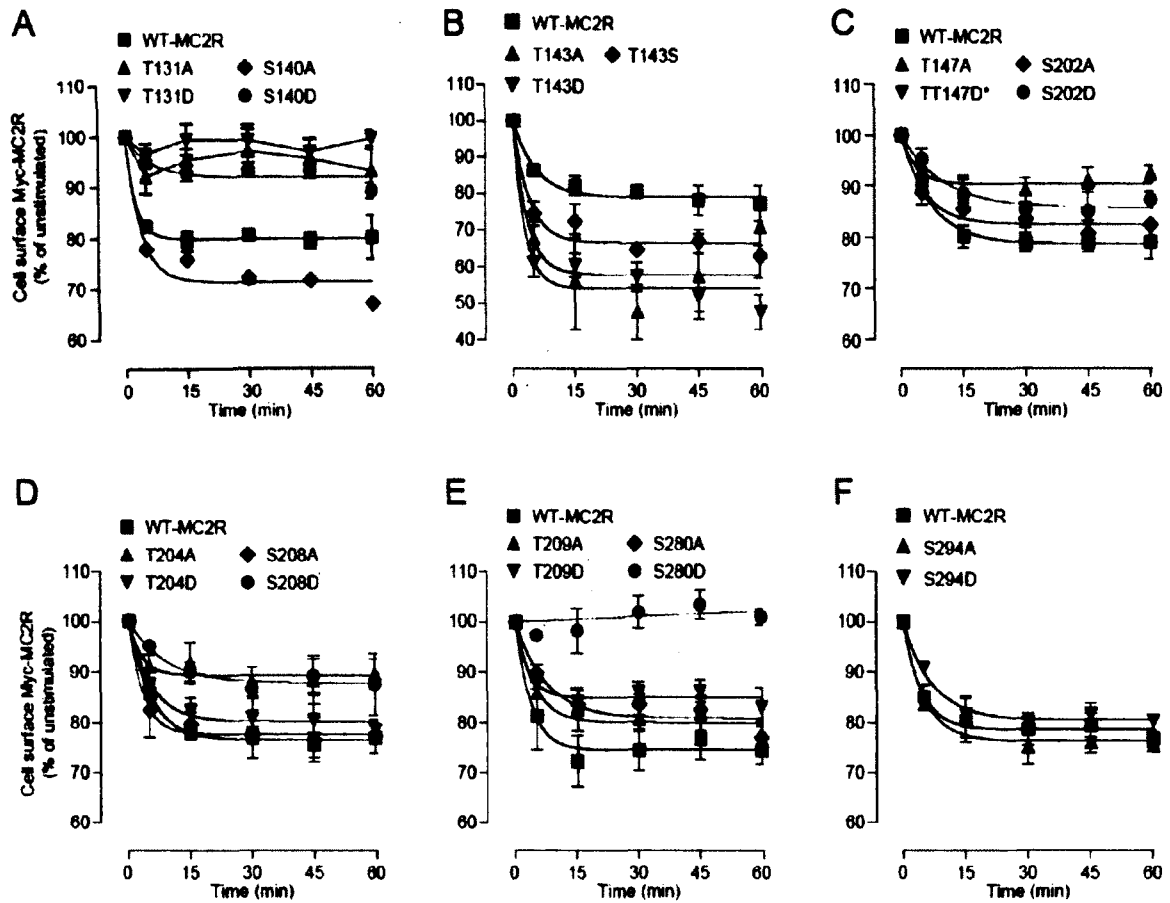


Fig. 8 Role of S/T residues in MC2R internalization. A-F) Each individual 293/FRT/Myc-mutant cell line transiently transfected with MRAP β was submitted to a time-course challenge with 100 nM ACTH, then processed by whole-cell ELISA procedures to determine the maximal extent and $t_{1/2}$ of internalization. Studies were conducted as shown in graphs and always in parallel with WT-MC2R. For T147D, * indicates that the results are not shown because initially, T147D is not expressed at the cell-surface and thus, we were unable to measure its internalization. Data were fitted by non-linear regression using an exponential decay. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of 3 separate experiments performed in duplicate.

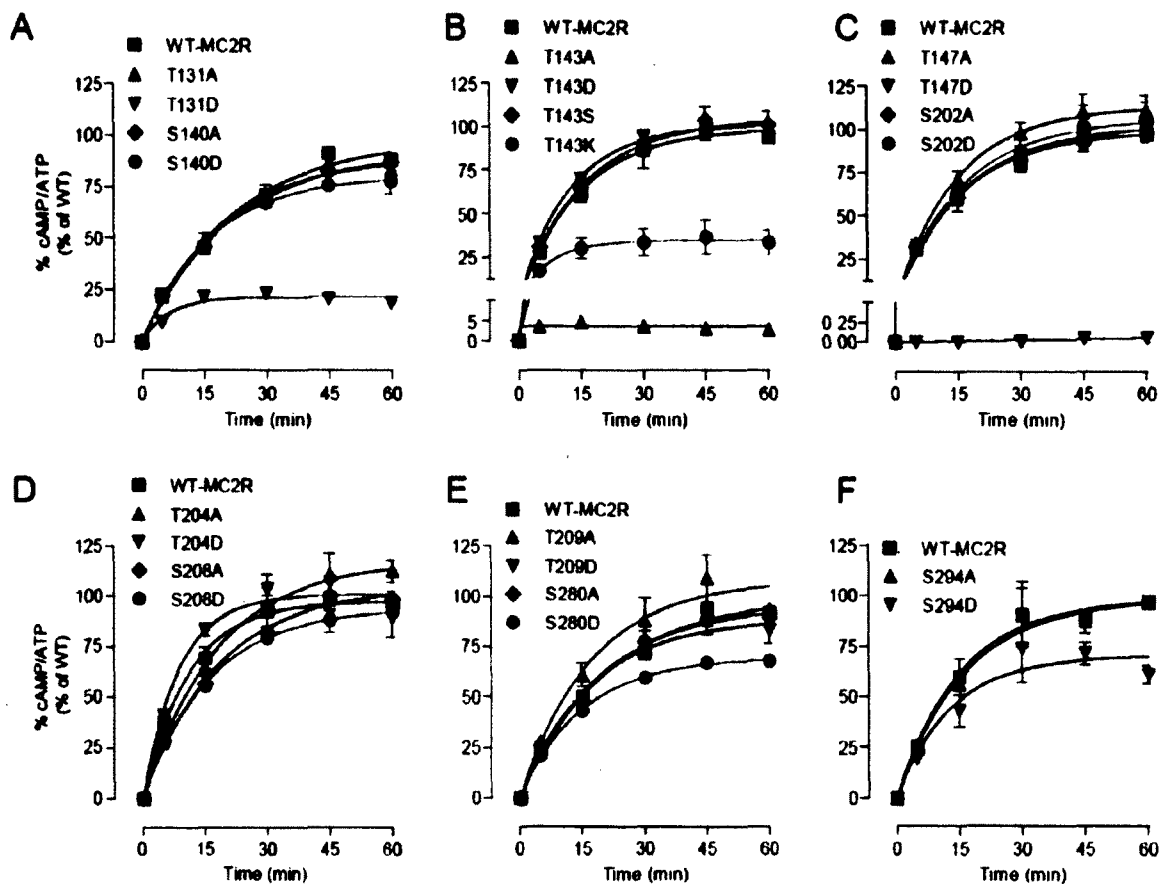
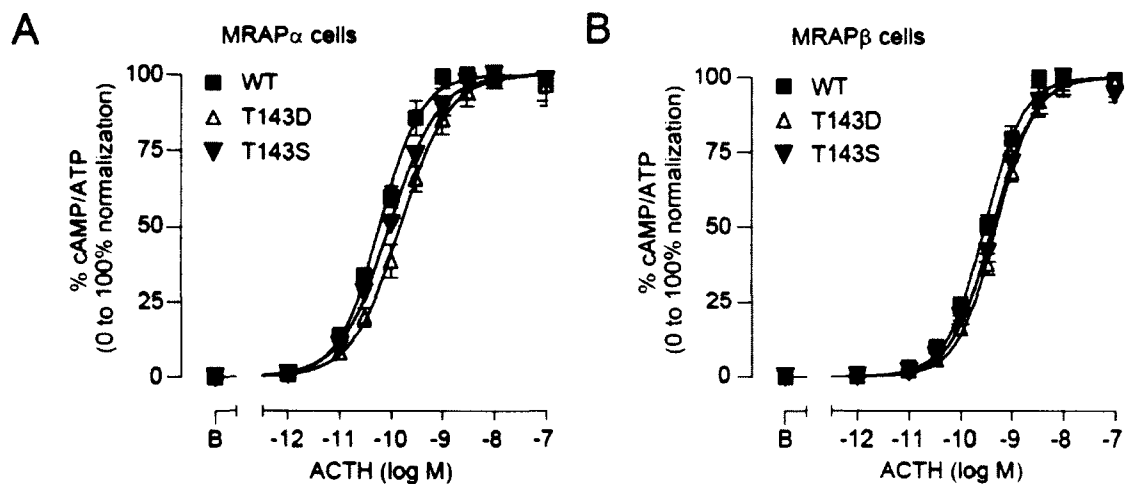


Fig. 9 Role of S/T residues in MC2R desensitization. A-F) 293/FRT/MRAP β cells were transfected separately with MC2R mutants and were submitted to a time-course challenge with 100 nM ACTH in the presence of 1 mM IBMX and were processed for cAMP measurements to determine maximal cAMP responses and $t_{1/2}$. Studies were conducted as shown in graphs and always in parallel with WT MC2R. Data were fitted by non-linear regression using an exponential decay. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of 3 separate experiments performed in duplicate.

To further understand the behavior of the T143A/D/S mutants, ACTH-responsiveness of these mutants was analyzed to specifically determine their ACTH potency (EC_{50}). In stable MRAP α -expressing cells transiently transfected with the receptors, EC_{50} values increased (thus ACTH potency decreased) from 60 [50, 72] pM for WT-MC2R to 150 [114, 199] pM for T143D ($p < 0.001$) and 96 [74, 123] pM for T143S ($p < 0.01$) (Supplemental Figure 10A). In MRAP β -expressing cells, EC_{50} values increased from 315 [263, 377] pM for WT to 509 [409, 633] pM for T143D ($p < 0.01$) and 415 [333, 518] pM (T143S) ($p < 0.05$) (Supplemental Figure 10B).



Supplemental Fig. 10 Functionality of T143 mutants. A-B) 293/FRT/MRAP α -Flag (A) or 293/FRT/MRAP β -Flag (B) cells, transiently transfected with WT, T143D or T143S, were washed and incubated with varying ACTH concentrations in the presence of IBMX for 15 min. The data obtained was normalized from 0 to 100 % (basal to R_{max}) for each transfection to better visualize the values of EC_{50} . Curves were fitted with a log agonist vs response non-linear regression. Results are expressed as mean \pm SEM of three separate experiments, each performed in triplicate.

Clustering analysis of mutant MC2R functionality

Characteristics of the various MC2R mutants were further explored by performing a correlation analysis between steady state of cAMP level (R_{max}), initial level of normalized cell surface expression with MRAP β and remaining surface receptors after 60 min. Clustering of the data was performed and the depicted three- (Fig 10A) or two- (Fig. 10B) dimensional representations clearly reveal five delimited clusters. A first cluster (circles), which included the WT-MC2R, grouped together receptors for which cell surface expression and remaining surface receptors after 60 min ranged between 80 to 100%, with a cAMP level similar to WT. However, in this cluster, it should be noted that T204D (14) and S280A (19) are in proximity to members of cluster 3. The second cluster (stars) included T131A, S140D, T147A and S202A (2, 5, 9, 10), in which cell surface expression was higher than WT-MC2R, but internalization and cAMP were roughly similar to cluster one. The three other clusters were very different from each other as well as from cluster 1 and 2. Cluster 3 (diamond) included T143D, T143S and QQQQ mutant (7, 8, 23), for which the cAMP level was similar or higher compared to the WT-MC2R, in spite of a low level of cell surface expression, and internalization varying between 35 and 50%. Cluster 4 (triangles), had two members (T143A and T147D) (6, 10) which are in fact nearly (T143A) or totally (T147D) non-functional, characterized by the near absence of cell-surface expression and cAMP production. Cluster 5 includes T131D (3) which exhibited a low cAMP accumulation in spite of WT-like cell-surface expression and an absence of internalization. The dendrogram representation (Fig. 10C) resulted in the same raw type classification of the mutants in five different classes, with T143A, T143S, T143D and T147D similar to QQQQ, but very distant from the others. This type of representation illustrates the similarities and differences among the various mutants, with the farthest clusters being the most divergent and the nearest clusters sharing similar properties.

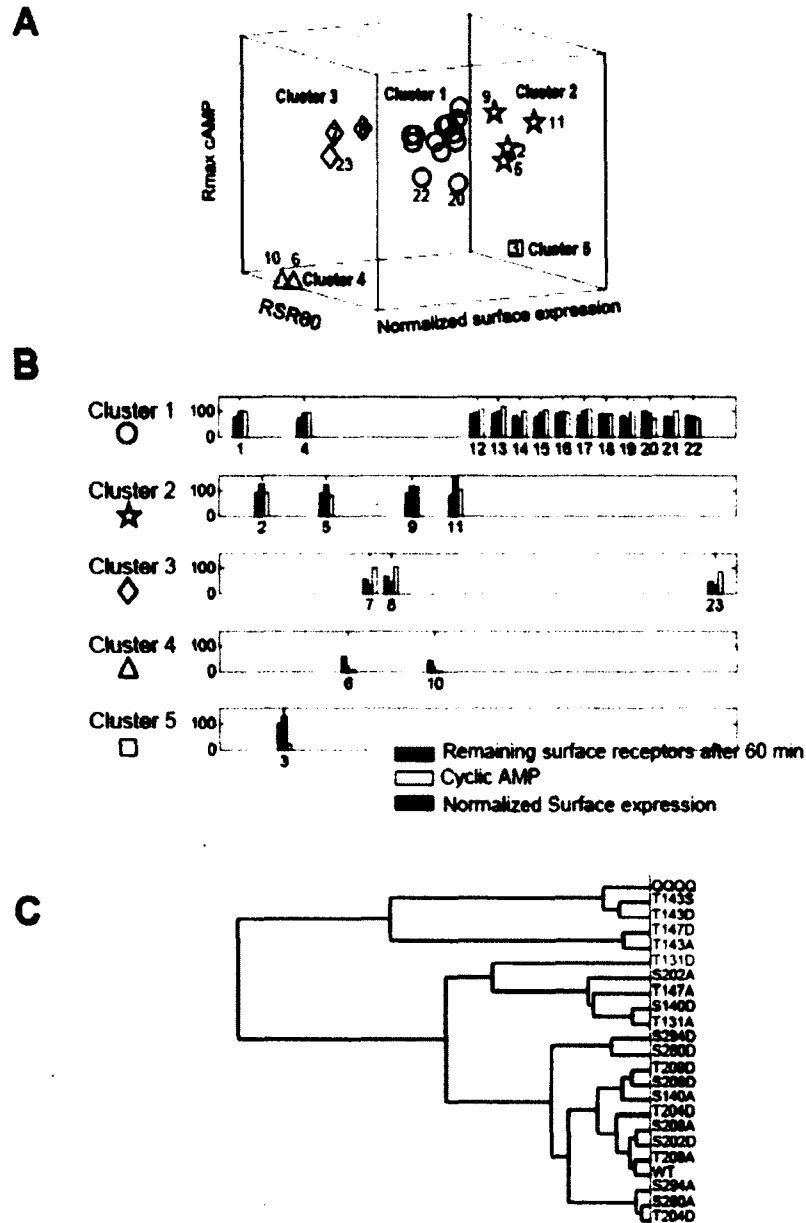


Fig. 10. Clustering analysis of mutant MC2R functionality. Three parameters were considered: normalized cell-surface expression with MRAP1, remaining surface receptors after 60 min (RSR60) (% of WT-MC2R) and Rmax cAMP (% of WT-MC2R). **A**) Three-dimensional representation of the five clusters, as identified from the kmeans analysis, as detailed in Methods. **B**) Two-dimensional representation of the five clusters. Comparative levels of cell-surface expression with MRAP1 (grey), remaining surface receptors after 60 min (RSR60) (% of WT) (black) and Rmax cAMP (% of WT) (white). **C**) Dendrogram or Cladistic representation was generated by using an agglomerative algorithm (Statistic toolbox, MATLAB). Mutants MC2R, with corresponding numbers assigned on the graphs: WT-MC2R (1), T131A (2), T131D (3), S140A (4), S140D (5), T143A (6), T143D (7), T143S (8), T147A (9), T147D (10), S202A (11), S202D (12), T204A (13), T204D (14), S208A (15), S208D (16), T209A (17), T209D (18), S280A (19), S280D (20), S294A (21), S294D (22) and QQQQ mutant (23).

DISCUSSION

Results herein provide new and detailed insight into the mechanisms involved in relatively short-term regulation of MC2R activity and reveal some hallmarks of the human ACTH receptor. Our findings indicate that MC2R internalization is ACTH concentration-dependent and accompanied by the concomitant trafficking of both MC2R and either MRAP1 isoform. Out of the population of internalized receptors, about one third are recycled back to the plasma membrane to promote sustained cAMP signaling. Moreover, the substitution of 5 intracellular S/T residues of MC2R (T131, S140, T143, T147, and S280) into either A or D had major repercussions on cell-surface expression, cAMP accumulation and/or internalization parameters, pointing mostly to the second intracellular loop as being crucial for MC2R expression and functional regulation. From the mutagenesis analyses, it also appeared that the phosphorylation of some residues can enhance receptor function and impair internalization.

MC2R internalization

The 293/FRT cells used in the present study, which stably express human MC2R and human MRAP1 isoforms in addition to endogenous MRAP2, have the advantage of expressing all currently known components of the functional human ACTH receptor (human MC2R, MRAP α or β and MRAP2). The maximal extent of MC2R internalization over a 60 min period (between 20 and 30 % depending on experiments and expression strategies) is consistent with that of a previous study in Y1 cells in which 20 % of cell-surface MC2R was internalized within a 30 min period (14). In addition, the reduction in cell-surface MC2R after ACTH exposure appears to be dependent on ACTH binding to MC2R since respective ACTH-independent increases in cAMP levels with forskolin or IBMX failed to induce or increase MC2R internalization. Moreover, low ACTH concentrations did not induce MC2R internalization.

The first aspect of this study was to determine whether arrestins were complexed with MC2R during internalization. Herein, a significant increase in MC2R internalization was observed when arrestin3 was overexpressed but not with arrestin2, thus suggesting a greater affinity of MC2R for arrestin3 during the internalization process. Furthermore, MC2R was immunoprecipitated with arrestin3 both with and without ACTH stimulation. This is in keeping with the observations obtained by confocal microscopy whereby both MC2R and arrestin3 could be observed at the plasma membrane without any ACTH stimulation. This pattern of co-localization is similar to that observed for β_2 AR or for the chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) (44). However, MC2R internalization was modest in comparison to β_2 AR expressed in the same conditions. These results are also in agreement with previous studies in which MC2R as well as other MCRs were shown to internalize with arrestin3 (β -arrestin2-GFP) (15, 45).

We also show that MC2R undergoes ACTH-mediated dynamin-dependent endocytosis. This result was of no surprise since receptor internalization occurs through vesicle scission from the plasma membrane and for which the role of dynamin is well established in this process (46) but had however never been investigated for MC2R. Hypertonic sucrose interference with clathrin involves the dispersion of clathrin lattices on the plasma membrane (47). This treatment confirmed clathrin lattices to be essential for MC2R internalization in 293/FRT cells. Our results are thus in agreement with previous studies in different cell types in which the mechanism of MC2R internalization and of other MCRs were shown to be clathrin-dependent (14, 15, 45).

MC2R recycling

The observation by confocal microscopy in which MC2R and MRAP isoforms co-internalized and trafficked conjointly in intracellular vesicles represents an important finding of this study. MRAP isoforms are essential for achieving MC2R functionality in most, if not all, cell types tested to date (7, 9, 12, 48). Thus, it could be hypothesized that

if MRAPs were not recycled with MC2R, one would not expect recycled MC2R to be ACTH-responsive and, hence, such recycling would be irrelevant for ACTH signaling.

For GPCRs that do undergo recycling and resensitization processes after internalization, the role of endosomes is critical because it enables the receptor to traffic through acidic compartments, thereby facilitating receptor dephosphorylation, resensitization and recycling, or alternatively, degradation. These endosomes are trafficked into cells with the help of Rab GTPases (21, 49). Results obtained herein could be interpreted as if internalized MC2R undergoes both rapid (Rab4) and slow recycling (Rab11) processes. Indeed and similarly to β_2 AR and the thyrotropin-releasing hormone receptor (TRHR) (50-52), MC2R colocalized with Rab4-, Rab5- and Rab11-associated endosomes, but less markedly into Rab7 endosomes. Based on internalization results obtained with 100 nM ACTH in the presence or absence of recycling inhibitors (BFA and monensin), it was determined that approximately one third of internalized receptors recycle back to the plasma membrane. BFA-mediated inhibition was 80 % as efficient as the inhibition mediated by monensin, suggesting that a large proportion of internalized MC2R are likely recycled after trafficking into the Golgi apparatus. Importantly, ACTH-induced cAMP production in cells incubated with BFA or monensin was not sustained. Moreover, with the use of the above recycling inhibitors, results showed that, at low ACTH concentrations (< 1 nM), MC2R does not internalize. To our knowledge, these data represent the first evidences of MC2R trafficking, recycling and resensitization after internalization. Also, recycled/resensitized receptors contribute to sustained coupling to cAMP production.

Importance of MC2R intracellular S/T residues

As recently summarized by Dores (13) and by Fridmanis et al. (53), MC2R differs from the other MCRs by its high level of expression and ligand-binding properties. In spite of the significant progress achieved in the past five years, there is limited information as to the molecular mechanisms linking MC2R structure with its functional properties. As previously observed with QQQQ (30), even though T143D and T143S

(cluster 4) displayed a reduced cell-surface expression (less than 50% of the WT), their ACTH-induced cAMP accumulation remained nearly intact, indicating that a small fraction of cell-surface receptors are sufficient for achieving maximal efficacy, as previously observed in both rat and human cells (10, 28-30). For T131D, S140D and S280D however, there was a discrepancy between their low extent of internalization and their reduced ACTH-induced cAMP accumulations that could not be attributed to lower cell-surface expression. One possibility is that the introduced mutation (D) mimics a constitutively phosphorylated and desensitized state of the receptor. Another possibility is that the mutations have a major impact on MC2R structure rather than just blocking or mimicking phosphorylation. This mimicking of constitutive phosphorylation (with D) often appeared to block MC2R internalization (T131D, S140D and S280D). Indeed, T131D (cluster 2), S140D and S280D (cluster 1) were resistant to internalization and highly expressed at the plasma membrane. However, T131D exhibited a desensitized phenotype (reduced cAMP accumulation and fast $t_{1/2}$). Therefore, if T131 is phosphorylated *in vivo*, it may serve to preserve MC2R cell-surface expression with the guarantee of signal desensitization. In contrast, the behavior of T131A (designed to block phosphorylation; also in cluster 2) argues in favor of a structural effect of the mutation since it was also internalization-deficient. Mutations of T131 may thus interfere with the nearby DRY motif (127-DRYIT-131) and create a major structural change in the receptor (54, 55). On the other hand, S280 phosphorylation, mimicked by S280D, may have a similar, yet less profound, impact on MC2R desensitization than T131D. In addition, internalization and cAMP data obtained with S280A were almost identical to WT, thus eliminating an effect on MC2R structure. Furthermore, S140, T204, T209 and S294 (cluster 1) led to alterations in ACTH-responsiveness consistent with an inhibitory role of phosphorylation in MC2R function. The remaining intracellular S/T residues (S202 and S208) (also in cluster 1) were considered of less importance for MC2R regulation since the experimental data recorded with the A/D mutants were either less evident or without effect.

Plasma membrane expression is fundamental for every membrane-anchored receptor to achieve its cellular function in transmitting the signal from the extracellular

space to the interior of a cell. The T143A mutation in itself provides evidence that a single amino acid can shut down receptor export and function almost completely. According to the substitution analysis of T143 into A/D/S/G/K, an amino acid with a hydroxyl group or a negative charge at position 143 is essential for plasma membrane expression and normal function of MC2R in the presence of MRAP α or MRAP β , and likely more so than positively-charged (K), lateral chain-deleted (G) or hydrophobic (A) substitutions. In contrast to WT-MC2R, T143S and T143D (cluster 3) appeared to rely almost exclusively on MRAP1 expression for their export to the plasma membrane, increasing the ratio of functional (MRAP1-dependent) to non-functional (MRAP1-independent) receptors at the plasma membrane. As mentioned earlier in the introduction, MRAP2 mainly serves to export MC2R at plasma membrane and induces only a very marginal role in cAMP production even when overexpressed (30). Since 293/FRT cells endogenously express MRAP2 (30, 56), it is therefore plausible that, in basal conditions, up to 50% of WT-MC2R cell-surface receptors may be under the control of endogenously expressed MRAP2 (30). In accordance with this hypothesis, T143A/D/S and QQQQ appeared to be internalized to a greater extent than WT-MC2R. However, in contrast to T143S and T143D which exhibit WT-like functions, the rate of internalization of QQQQ was almost 5 times slower than WT-MC2R, hence indicating that MC2R N-glycosylation is important for overall rate of receptor internalization.

Our results raise an important question: is MC2R phosphorylation essential for function? Our S/T to A/D scan suggests that phosphorylation of MC2R may be relevant in its functional regulation. Indeed, blocking phosphorylation (with the A mutation) sometimes increased internalization or decreased basal cell-surface expression. In fact, S140, T147, T204, T209, S280 and S294 mutants exhibited the expected profile from an A/D scan (the A mutant gaining function and the D mutant losing function). Similarly to T143A, another evidence that the modification of a single amino acid can completely shut down receptor export and function stems from the mutant mimicking the constitutive phosphorylation of T147 (T147D). Results suggest that if T143 phosphorylation is essential for MC2R export, in contrast, T147 phosphorylation can efficiently turn off ACTH signaling. Both T143 and T147 are within a 5 amino acid motif located at the

carboxy terminus of the second intracellular loop. Moreover, T143A and T147D stand out from all other S/T mutants examined herein in that they are well expressed and N-glycosylated but are barely expressed at the plasma membrane (T143A > T147D). Therefore the absence of ACTH-induced cAMP accumulation for these mutants is not surprising. Indeed, in addition to promoting receptor desensitization and internalization (41, 57), receptor phosphorylation can positively regulate plasma membrane targeting of GPCRs (42).

The second intracellular loop of MC2R is defined as 127-DRYITIFHALRYHSIV**TMRR**T-147 (T143 and T147 are in bold; PKC-like motif is underlined). An S or T residue located in the carboxy-terminus of the second intracellular loop is often conserved among GPCRs (58), including all MCRs. This conserved S/T residue may serve for G protein coupling or for proper folding of the receptor, as observed for other GPCRs (58-60). For instance, the MC1R-T157A mutant abolishes NDP-MSH binding and signaling to undetectable levels (43). Interestingly, the loss-of-function mutation MC2R-R146H located near MC2R-T143, identified in patients suffering from familial glucocorticoid deficiency (61), is linked to inefficient cell-surface expression and signaling of MC2R (7, 62). Similarly, MC1R-R160W, located within the PKC motif with MC1R-T157, is associated with MC1R loss-of-function, ER retention and red-hair in humans. In addition, MC1R-T157 has been shown to be phosphorylated *in vivo* (42). Therefore, disrupting the PKC motif of MC2R (143-TMRR-146) prevents T143 phosphorylation and receptor cell-surface expression. These observations strongly suggest that MC1R-T157 and MC2R-T143 (and probably other homologous threonine from all MCRs) phosphorylation by PKC may be a key regulatory event of MCR exocytosis.

In a recent study, Fridmanis et al. implemented the construction of a series of chimeric MC2R/MC4R to identify the regions of MC2R responsible for cell-surface expression and binding specificity (53). Results from the direct investigation of S/T residues in the present study are in agreement with their observations in that they found that the N-terminus as well as the third and fourth transmembrane domains are involved in intracellular retention of MC2R. Indeed, we previously demonstrated that MC2R N-

glycosylation in its N-terminus is important for its cell-surface expression (30) while herein, T143 and T147, located in the C-terminal segment of the second intracellular loop (in-between the third and fourth transmembrane domains) were largely deficient mutants due to intracellular retention. Respectively, T143 and T147 phosphorylation may therefore positively or negatively affect the necessary structure for MC2R cell-surface expression.

Conclusion

This study provides evidence that following ACTH binding, MC2R is subjected to internalization and recycling. Occurrences without the intervention of newly synthesized receptors or of accessory proteins, MC2R recycling and resensitization reveals a mode of regulation that is both rapid and efficient. This property may be important to ensure adequate glucocorticoid blood levels, necessary to maintain metabolic homeostasis (63) or to cope with critical illness (64). In addition, analyses of MC2R cell-surface expression, cAMP production and internalization performed with A/D-scanned intracellular S/T enabled to delineate key amino acids such as T143, as a crucial determinant of receptor function. Thus, MC2R phosphorylation on specific residues may promote plasma membrane receptor trafficking and function in addition to promoting desensitization and internalization.

MATERIALS and METHODS

Materials

The chemicals used in the present study were obtained from the following sources: FBS, the *Flp* recombinase-mediated homologous recombination system (Flp-In™), Lipofectamine and PLUS Reagent were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada); high glucose DMEM was from Wisent (St-Jean-Baptiste, QC, Canada). PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail was from Roche (Laval, QC, Canada). NuPAGE sample

buffer was from Invitrogen (Carlsbad, CA) and reducing agent from Fermentas Canada (Burlington, ON). Phusion DNA polymerase and restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). The HaloTag technology was from Promega (San Luis Obispo, CA, USA). Dynamin-K44A in pcDNA3 vector was a kind gift from Dr. Stephen Ferguson (Department of Physiology & Pharmacology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada). The mouse monoclonal anti-Myc-producing hybridoma clone 9E10 and the Myc- β_2 -adrenergic receptor (Myc- β_2 AR) cDNA supplied in pcDNA3 were obtained from Dr. Michel Bouvier (Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). The pcDNA3/AT₁R-Flag vector was from Dr Richard Leduc (Département de Pharmacologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada). Rab4-, Rab5-, Rab7-, Rab11-arrestin2-, arrestin3-GFP (in pEGFP vector), arrestin2-HA, arrestin2(319-418) (Arr2-DN), arrestin3-HA and arrestin3(201-409) (Arr3-DN) were from Dr J-L Parent (Service de Rhumatologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada). ACTH-(1–24) peptide (Cortrosyn) was purchased from Organon (Toronto, Canada). Ang II was from Bachem (Marina Delphen, CA). Alexa-Fluor coupled secondary antibodies were from Invitrogen. The Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection system was from GE Healthcare (Baie d’Urfe, Quebec, Canada). Forskolin, ACTH (1-24), IBMX, isoproterenol, monensin, BFA, and tunicamycin were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); all other chemicals were of A-grade purity.

Expression vectors and site-directed mutagenesis

Myc-MC2R and MRAP-Flag both contained in the pcDNA5/FRT vector constructions have been described previously (12). Myc-MC2R/MRAP α -Flag and Myc-MC2R/MRAP β -Flag indicate that both MC2R and MRAP are encoded in the same pcDNA5/FRT expression vector. In order to generate the pcDNA5/FRT/Halo-Myc-MC2R/MRAP β -Flag expression vector, primers (forward: tcagtctcgagccaccatgggatccgaaatcggtacagc; reverse: gagagtactcgaggccggccagcccggggagccagc) were used to amplify the HaloTag cDNA by PCR from the pHT2 vector and to introduce *Xho* I restriction sites at the 5’ and 3’ ends of

the PCR product using Phusion DNA polymerase. *Xho* I restriction was used to adjoin the HaloTag cDNA 5' upstream and in frame with the Myc-MC2R cDNA in pcDNA3. Thereafter, the Halo-Myc-MC2R cDNA fusion was subcloned into pcDNA5/FRT, and the MRAP β -Flag cistron was introduced using *Sph* I to generate a bicistronic vector as described previously (12). The resulting expression vector was used to generate a stable cell line by *Flp* recombinase-mediated homologous recombination (12). Halo-Myc-MC2R is a 606 aa fusion protein.

For MC2R site-directed mutagenesis, individual S/T \rightarrow A/D mutants (T131A, T131D, S140A, S140D, T147A T147D, S202A, S202D, T204A, T204D, S208A, S208D, T209A, T209D, S280A, S280D, S294A and S294D) and T143 \rightarrow A/D/S/G/K mutants of MC2R were generated by PCR according to the *Pfu* turbo method using complementary primers barring the desired codons to replace the original *Ser* or *Thr* codons. To avoid any unwanted mutation in the template vector, mutagenesis was performed on the pcDNA3/Myc-MC2R template after which the coding sequences were then subcloned in pcDNA5/FRT as described previously (12). Plasmids were sequenced at the Nanuq sequencing platform (Génome Québec, Université McGill, Montréal, QC, Canada). All vector maps, cloning steps, restriction and sequencing analyses were simulated and designed using Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen Corp), for which appropriate files are available on request, as well as primer used.

Cell culture, transfection and isogenic cell lines

The *Flp* recombinase-mediated homologous recombination system (Flp-InTM) was used to generate human embryonic kidney 293/FRT (*Flp* Recombinase Target site) cell lines stably expressing both Myc-MC2R and MRAP α -Flag or MRAP β -Flag (12). Unless stated otherwise, all experiments were performed with 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells (main characterization results) or with 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP α -Flag (supplemental characterization results). Cell culture and characterization of these cell lines have been described previously (12). The establishment of other cell lines (i.e. stable

MC2R mutant cell lines) was also performed with Flp-InTM recombination. When required, cells were transfected with 0.5 µg/35 mm dish or 0.125 µg/well (24-well plates) at 50% confluency using Lipofectamine and PLUS reagent. To maintain similar transcriptional and translational activity when required, transfection of pEGFP, of an empty vector or of the untagged version of MC2R were used as controls when appropriate.

Cyclic AMP measurements

Intracellular cAMP accumulation was determined after time-course studies performed in cells contained in 35 mm dishes. Cells were loaded with tritiated adenine for 2 h, washed once in Hank's buffered saline (130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₂, 5 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 g/l dextrose and 0.1 % BSA) and subsequently stimulated with ACTH, in the presence or absence of the phosphodiesterase inhibitor IBMX, at 37 °C. At the end of the stimulations, cells were lysed in 5 % trichloroacetic acid (TCA), and intracellular cAMP accumulation was determined by measuring the conversion of [³H]-ATP into [³H]-cAMP eluted from Dowex and neutral alumina chromatography columns as described previously (12).

Time-course studies

Cells were washed once in Hank's buffered saline (130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₂, 5 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 g/l dextrose and 0.1 % BSA), and subsequently stimulated with ACTH concentrations from 1 pM to 100 nM for 0, 5, 15, 30, 45 or 60 min, in the presence or absence of the phosphodiesterase inhibitor IBMX, at 37 °C. At the end of the stimulations, cells were lysed in 5 % trichloroacetic (TCA) acid for cAMP measurements, as described (12). To investigate Myc-MC2R internalization, cells were stimulated with graded ACTH concentrations for 0, 5, 15, 30, 45 or 60 min and processed for whole cell ELISA procedures. To investigate Myc-MC2R recycling, cells were incubated with or without the recycling inhibitor monensin (25 µM) (38, 40, 50) or the Golgi cisternae-disrupting agent brefeldin A (BFA; 10 µg/ml) (36). When required, cells were preincubated in Hanks

buffered saline and inhibitors, such as monensin, BFA, H89, GF109203X, for 30 min prior to ACTH stimulation. In experiments requiring transfection, such as Rabs, arrestins, MC2R mutants or MRAPs, cells were transfected 24h prior to the experiments.

Whole-cell ELISA procedures

Time-course studies as well as direct determinations were performed on cells seeded in 24-well plates. The amount of cell-surface Myc-MC2R was measured by detecting the extracellular Myc-tag fused to MC2R. Anti-Myc antibodies were applied after formaldehyde fixation (without cell membrane permeabilization). Alternatively, whole-cell Myc-tagged receptor expression was measured after MeOH fixation as described previously (30). Horseradish peroxidase-linked antibodies with 0.003% H₂O₂ and 1 µg/ml *o*-phenylenediamine were used to reveal receptor abundance as described previously (12). Non-specific background levels were established with native 293/FRT cells (transiently transfected with MRAP β). Basal levels were considered as 100%. Cell-surface receptor losses reflect receptor internalization (100% - receptor loss %). Net internalization refers to MC2R internalization in the presence of monensin or BFA. Gross internalization refers to MC2R internalization in the absence of these reagents. The percentage of recycled receptors was calculated as follows: (net internalization - gross internalization) / net internalization.

Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded on poly-L-lysine glass coverslips placed in 35 mm dishes, transfected the next day with the indicated plasmids and were starved for 30 min with fresh DMEM one day later prior to the experiments. Thereafter, cells were stimulated with 100 nM ACTH for 0, 5, 15, 30, 45 or 60 min. After a single wash in cold PBS followed by fixation in MeOH, labeling for Myc-MC2R and MRAP-Flag was performed as described previously (12). Anti-Myc and anti-Flag primary antibodies were detected with goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled to Alexa-Fluo647 and Alexa-Fluor568 respectively while DAPI was used to stain the nuclei. In other instances,

clathrin and caveolin-1 were detected with polyclonal antibodies against the endogenous proteins expressed in 293/FRT cells, followed by suitable secondary antibodies. Images were acquired on an Olympus Fluoview 1000 (FV1000) laser-scanning confocal microscope (Olympus, Japan) built around an IX81-ZDC inverted microscope fitted with a U Plan S-Apo 60X (1.35 NA) oil immersion objective (Olympus URFL-T, MAG Biosystems). Emissions from each fluorophore were acquired sequentially to avoid fluorophore bleeding. All images were magnified 2 to 3 times with Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.). White color corresponds to color superposition of green, red and blue colors, while purple is the overlap between red and blue colors.

For live-cell imaging, stable 293/FRT/Halo-Myc-MC2R/MRAP β -Flag cells were seeded in poly-L-lysine-coated MatTek 35 mm dishes containing a central glass plate 48 h prior to the experiments. Cells were washed with serum-free DMEM and incubated with HaloTag-AlexaFluor488 cell-impermeable ligand for 15 min at 37 C in a CO₂ incubator. Subsequently, cells were washed thoroughly to label only cell-surface HaloTag enzyme fused at the extracellular N-terminus of MC2R. Each dish was then mounted onto the confocal microscope and cells were examined every 30 s in the presence or absence (not shown) of 100 nM ACTH or 1 μ M NDP-MSH, added as 10x concentrates. In other experiments, cells were transiently transfected with dominant negative pcDNA3/Dynamin-K44A 24 h before the experiment. Confocal images were acquired with a U Plan S-Apo 60 X oil objective using a CSU-XI confocal scanner unit (Yokogawa Electric), mounted onto an Olympus IX81-ZDC inverted microscope (Olympus) using a QuantEM:512SC EMCCD camera (Photometrics, Tucson). Temperature was maintained at 37 C with a microincubator model TB-3 CCD (Warner Instruments, Hamden, CT) throughout the experiments. All acquisitions were controlled by MetaMorph 7.5 software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Laser excitation was performed by a FRAP-3D laser launch from MAG Biosystems (Photometrics, Tucson).

Immunoprecipitation and Western blotting

Immunoprecipitation was performed as described previously (50) and further detailed in the supplemental Materials and Methods. Briefly, native 293/FRT cells transiently transfected with pcDNA5/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag and arrestin3-HA were stimulated or not with 100 nM ACTH for 30 min. Cells lysates were clarified, incubated with 2 μ g of anti-HA monoclonal antibodies to immunoprecipitate arrestins, after which protein A-agarose was added, followed by an overnight incubation at 4 °C. Initial lysates and immunoprecipitated proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE gels and immunoblotting was performed using anti-HA or anti-Myc antibodies on nitrocellulose membranes (30).

Data analysis

Unless stated otherwise, results are presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments, each conducted in duplicate or triplicate points. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for data manipulations and for establishing all non-linear regressions used to determine EC₅₀, 95% CI, SEM, halftimes ($t_{1/2}$), maximal effects and other regression parameters. P values on curve fits were obtained with the extra sum-of-squares F test. Statistical analyses of other data were performed by ANOVA followed by Bonferonni's post hoc test.

Clustering of the observations was performed with the kmeans subroutine of the MATLAB software (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA). Clustering algorithms are methods to divide a set of n observations in m groups so that members of the same group are more alike than members of different groups. The function kmeans partitions data into k mutually exclusive clusters, and returns the index of the cluster to which it has assigned each observation. Each cluster in the partition is defined by its number object and y its centroid. The centroid for each cluster is the point to which the sum of distances from all objects in that cluster is minimized. The algorithm moves objects between clusters until the sum of distances of each object to its cluster centroid cannot be decreased further.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lucie Chouinard as well as the other members of the laboratory for their technical assistance in performing cAMP assays and in preparing primary cell cultures of human fasciculata cells. We thank Dr. Roger D. Cone (Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon) for providing us with the human MC2R cDNA, Dr. Michel Bouvier (Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) for providing us with the anti-Myc antibody and Dr. Stephen Ferguson (Department of Physiology & Pharmacology, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada) for the gift of dynamin-K44A. We thank Drs. Robert Dumaine and Philippe Sarret for use of their confocal microscope and Jean Lainé for help with confocal studies. We are also grateful to Dr. Marcel D. Payet for his kind assistance with data analyses as well as critical review of the manuscript and to Pierre Pothier for critical review of the manuscript.

FOOTNOTES

Abbreviations : A, alanine; arr2 and arr3, arrestin2 and arrestin3; AT₁R, angiotensin II type 1 receptor; β_2 AR, β_2 -adrenergic receptor; BFA, brefeldin A; ER, endoplasmic reticulum; FRT, *Flp* recombinase target; D, aspartate; G, glycine; DN, dominant negative; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK 293, human embryonic kidney; HRP, horseradish peroxidase; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; K, lysine; MCR, melanocortin receptor; MCR, melanocortin-1 receptor; MC2R, melanocortin-2 receptor; MRAP, MC2R accessory protein; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; S, serine; T, threonine; WB, Western blot; WT, wild-type; 293/FRT, HEK 293 cell line with single genome-integrated FRT site.

REFERENCES

1. **Sewer MB, Waterman MR** 2003 ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61:300-307
2. **Forti FL, Dias MH, Armelin HA** 2006 ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem* 293:147-160
3. **Gallo-Payet N, Payet MD** 2003 Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61:275-287
4. **Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD** 1992 The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251
5. **Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y** 2007 Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18205-18210
6. **Clark AJ, McLoughlin L, Grossman A** 1993 Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 341:461-462
7. **Chung TT, Webb TR, Chan LF, Cooray SN, Metherell LA, King PJ, Chapple JP, Clark AJ** 2008 The majority of adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) mutations found in familial glucocorticoid deficiency type 1 lead to defective trafficking of the receptor to the cell surface. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4948-4954
8. **Clark AJ, Chan LF, Chung TT, Metherell LA** 2009 The genetics of familial glucocorticoid deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:159-165
9. **Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJ** 2005 Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 37:166-170
10. **Lefkowitz RJ, Roth J, Pricer W, Pastan I** 1970 ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:745-752
11. **Penhoat A, Naville D, Begeot M** 2001 The adrenocorticotrophic hormone receptor. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 8:112-117

12. **Roy S, Rached M, Gallo-Payet N** 2007 Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol* 21:1656-1669
13. **Dores RM** 2009 Adrenocorticotropin hormone, melanocyte-stimulating hormone, and the melanocortin receptors: revisiting the work of Robert Schwyzer: a thirty-year retrospective. *Ann N Y Acad Sci* 1163:93-100
14. **Baig AH, Swords FM, Szaszak M, King PJ, Hunyady L, Clark AJ** 2002 Agonist activated adrenocorticotropin receptor internalizes via a clathrin-mediated G protein receptor kinase dependent mechanism. *Endocr Res* 28:281-289
15. **Kilianova Z, Basora N, Kilian P, Payet MD, Gallo-Payet N** 2006 Human MC2R expression and functionality. Effect of PKA and PKC on desensitization and internalization. *Endocrinology* 147:2325-2337
16. **Clark AJ, Baig AH, Noon L, Swords FM, Hunyady L, King PJ** 2003 Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). *Ann N Y Acad Sci* 994:111-117
17. **Lefkowitz RJ, Shenoy SK** 2005 Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-517
18. **Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG** 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
19. **Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG** 2000 The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275:23120-23126
20. **Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J** 2008 G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:601-629
21. **Seachrist JL, Ferguson SS** 2003 Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* 74:225-235
22. **Gaborik Z, Hunyady L** 2004 Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:286-293
23. **Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A** 2007 Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 120:3905-3910
24. **Noon LA, Franklin JM, King PJ, Goulding NJ, Hunyady L, Clark AJ** 2002 Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum

in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol* 174:17-25

25. **Rached M, El Mourabit H, Buronfosse A, Blondet A, Naville D, Begeot M, Penhoat A** 2005 Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides* 26:1842-1847
26. **Hinkle PM, Sebag JA** 2009 Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP). *Mol Cell Endocrinol* 300:25-31
27. **Webb TR, Clark AJ** 2010 Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins. *Mol Endocrinol* 24:475-484
28. **Gallo-Payet N, Payet MD** 1989 Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J Endocrinol* 120:409-421
29. **Gallo-Payet N, Grazzini E, Côté M, Bilodeau L, Chorvatova A, Payet MD, Chouinard L, Guillon G** 1996 Role of calcium in the mechanism of action of ACTH in human adrenocortical cells. *J Clin Invest* 98:460-466
30. **Roy S, Perron B, Gallo-Payet N** 2010 Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology* 151:660-670
31. **Sebag JA, Hinkle PM** 2009 Regions of melanocortin 2 (MC2) receptor accessory protein necessary for dual topology and MC2 receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* 284:610-618
32. **Baig AH, Swords FM, Noon LA, King PJ, Hunyady L, Clark AJ** 2001 Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. *J Biol Chem* 276:44792-44797
33. **Orsini MJ, Benovic JL** 1998 Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 273:34616-34622
34. **Mundell SJ, Orsini MJ, Benovic JL** 2002 Characterization of arrestin expression and function. *Methods Enzymol* 343:600-611
35. **Takei K, Slepnev VI, De Camilli P** 2001 Interactions of dynamin and amphiphysin with liposomes. *Methods Enzymol* 329:478-486
36. **Dinter A, Berger EG** 1998 Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109:571-590

37. **Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD** 1992 Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360:350-352
38. **Lichtshtein D, Dunlop K, Kaback HR, Blume AJ** 1979 Mechanism of monensin-induced hyperpolarization of neuroblastoma-glioma hybrid NG108-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:2580-2584
39. **Schioth HB, Chhajlani V, Muceniece R, Klusa V, Wikberg JE** 1996 Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci* 59:797-801
40. **Stein BS, Bensch KG, Sussman HH** 1984 Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells. *J Biol Chem* 259:14762-14772
41. **Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ** 1988 Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-373
42. **Sanchez-Laorden BL, Herraiz C, Valencia JC, Hearing VJ, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borrón JC** 2009 Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. *J Cell Physiol* 220:640-654
43. **Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borrón JC** 2007 Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J Biol Chem* 282:3241-3451
44. **Roy SJ, Parent A, Gallant MA, de Brum-Fernandes AJ, Stankova J, Parent JL** 2010 Characterization of C-terminal tail determinants involved in CRTH2 receptor trafficking: identification of a recycling motif. *Eur J Pharmacol* 630:10-18
45. **Cai M, Varga EV, Stankova M, Mayorov A, Perry JW, Yamamura HI, Trivedi D, Hruby VJ** 2006 Cell signaling and trafficking of human melanocortin receptors in real time using two-photon fluorescence and confocal laser microscopy: differentiation of agonists and antagonists. *Chem Biol Drug Des* 68:183-193
46. **Sever S, Damke H, Schmid SL** 2000 Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 150:1137-1148
47. **Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B** 1993 Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 121:61-72

48. **Sebag JA, Hinkle PM** 2007 Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20244-20249
49. **Mellman I** 1996 Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575-625
50. **Parent A, Hamelin E, Germain P, Parent JL** 2009 Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem J* 418:163-172
51. **Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS** 2000 beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem* 275:27221-27228
52. **Jones BW, Hinkle PM** 2009 Subcellular trafficking of the TRH receptor: effect of phosphorylation. *Mol Endocrinol* 23:1466-1478
53. **Fridmanis D, Petrovska R, Kalnina I, Slaidina M, Peculis R, Schioth HB, Klovinis J** 2010 Identification of domains responsible for specific membrane transport and ligand specificity of the ACTH receptor (MC2R). *Mol Cell Endocrinol* 321:175-183
54. **Moore SA, Patel AS, Huang N, Lavin BC, Grammatopoulos TN, Andres RD, Weyhenmeyer JA** 2002 Effects of mutations in the highly conserved DRY motif on binding affinity, expression, and G-protein recruitment of the human angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 109:161-167
55. **Yamano Y, Kamon R, Yoshimizu T, Toda Y, Oshida Y, Chaki S, Yoshioka M, Morishima I** 2004 The role of the DRY motif of human MC4R for receptor activation. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1369-1371
56. **Hwang GW, Oh SE, Takahashi T, Lee JY, Naganuma A** 2010 siRNA-mediated knockdown of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) gene confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J Toxicol Sci* 35:947-950
57. **Ricks TK, Trejo J** 2009 Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J Biol Chem* 284:34444-34457
58. **Lembo PM, Ghahremani MH, Morris SJ, Albert PR** 1997 A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor directs signaling specificity. *Mol Pharmacol* 52:164-171
59. **Kushwaha N, Harwood SC, Wilson AM, Berger M, Tecott LH, Roth BL, Albert PR** 2006 Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G-protein coupling. *Mol Pharmacol* 69:1518-1526

60. **Prado GN, Mierke DF, Pellegrini M, Taylor L, Polgar P** 1998 Motif mutation of bradykinin B2 receptor second intracellular loop and proximal C terminus is critical for signal transduction, internalization, and resensitization. *J Biol Chem* 273:33548-33555
61. **Slavotinek AM, Hurst JA, Dunger D, Wilkie AO** 1998 ACTH receptor mutation in a girl with familial glucocorticoid deficiency. *Clin Genet* 53:57-62
62. **Elias LL, Huebner A, Pullinger GD, Mirtella A, Clark AJ** 1999 Functional characterization of naturally occurring mutations of the human adrenocorticotropin receptor: poor correlation of phenotype and genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2766-2770
63. **Roberge C, Carpentier AC, Langlois MF, Baillargeon JP, Ardilouze JL, Maheux P, Gallo-Payet N** 2007 Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1465-E1478
64. **Gallo-Payet N, Roussy J-F, Chagnon F, Roberge C, Lesur O** 2008 Hypothalamic/ pituitary axis and MODS in critical illness: a special focus on Arginine-Vasopressin (AVP) and Apelin (APL). *J Organ Disfunction* 4:216-229

3.3.1 Résultats complémentaires sur la désensibilisation de MC2R

La désensibilisation du système ACTH/MC2R/MRAP β /AC a été évaluée en mesurant l'accumulation (en présence d'IBMX) ou le niveau absolu (en absence d'IBMX) d'AMPc présent dans les cellules suite à une stimulation prolongée avec l'ACTH. En présence d'IBMX (Figure 20A), l'accumulation d'AMPc dans le temps suit une régression non-linéaire de déclin exponentiel qui tend vers un plateau maximal. Ce plateau maximal est atteint aux concentrations d'ACTH égales ou inférieures à 1 nM et représente la désensibilisation de MC2R (les mêmes qui n'induisent peu ou pas d'internalisation à la Fig. 5 de la section 3.3). Les courbes obtenues avec l'ACTH 10 et 100 nM tendent aussi vers un plateau qui n'est pas atteint à l'intérieur de la période de 60 min, signifiant que MC2R est toujours fonctionnel à ces concentrations d'ACTH.

En absence d'IBMX (Figure 20B), la quantité d'AMPc absolue contenue dans les cellules stimulées à des concentrations égales ou plus petites que 1 nM diminue après avoir atteint un pic maximal aux alentours de 15 min. L'ACTH 10 nM et surtout 100 nM entraînent des niveaux d'AMPc soutenus à l'intérieur des cellules, signifiant encore que MC2R est toujours fonctionnel à ces concentrations d'ACTH.

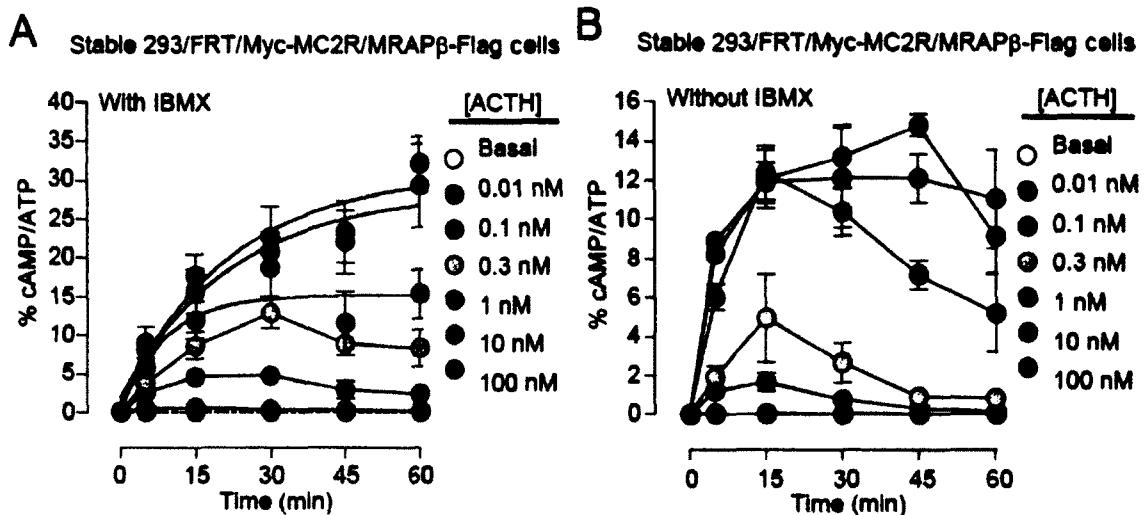


Figure 20. Production d'AMPc en présence ou en absence d'inhibiteur de PDEs. Les cellules 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag ont été préincubées 15 min en présence (A) ou en absence (B) d'IBMX 1mM et stimulées à rebours en présence de différentes concentrations d'ACTH pour différents temps. Les résultats sont la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de trois expériences.

3.3.2 Résultat complémentaire sur le mécanisme d'internalisation de MC2R

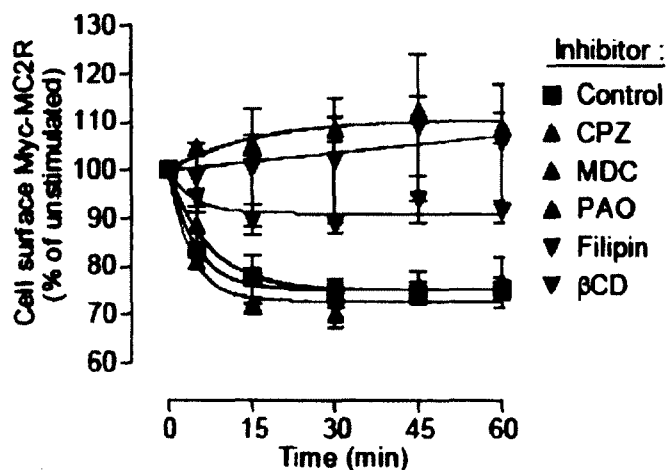


Figure 21. Effets des inhibiteurs d'internalisation clathrine- et caveolae-dépendante. Les cellules stables 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag ont été pré-incubées 30 min avec des inhibiteurs d'internalisation clathrine- (CPZ, chlorpromazine; MDC, monodansylcadavérine; PAO, oxide de phenyl arsine) ou caveolae-dépendante (Filipine; β CD, β -hydroxy-cyclodextrine). Les résultats sont la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de trois expériences.

Les cellules stables 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag ont été pré-incubées 30 min avec des inhibiteurs d'internalisation clathrine- ou caveolae-dépendante (Figure 21). Le PAO, la filipine et la β CD bloquent l'internalisation de MC2R. En plus, le PAO exerce un effet toxique sur les cellules et ne permet pas la production d'AMPc (résultats non-montrés), ce qui explique probablement pourquoi MC2R n'internalise pas en présence de PAO.

3.3.3 Résultat complémentaire sur la nécessité des MRAPs dans l'expression de surface de certains mutants de MC2R.

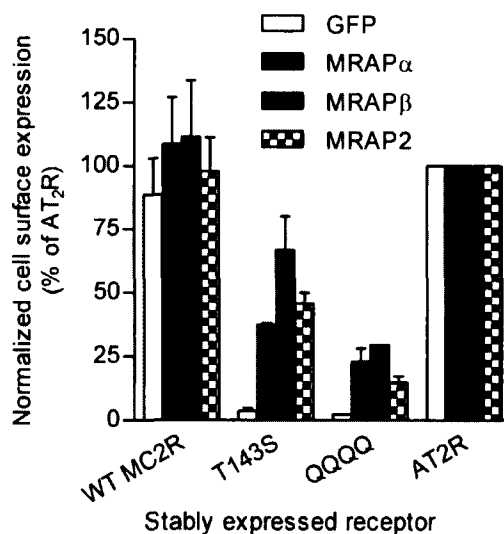


Figure 22 L'expression membranaire MRAP1-indépendante est-elle MRAP2-dépendante? Les cellules exprimant de façon stable MC2R WT, T143S, QQQQ ou AT₂R ont été transfectées avec les plasmides codant pour un contrôle (GFP), MRAP α , MRAP β ou MRAP2 et l'expression de surface et totale des récepteurs étiquetés avec Myc ont été mesurés par ELISA sur cellules entières (Roy *et al.*, 2010a). L'expression de surface a été normalisée sur l'expression totale et les résultats obtenus avec AT₂R ont été considéré comme 100% pour chaque transfection. Les résultats montrés sont la moyenne \pm l'erreur standard de deux expériences.

Grâce à la normalisation de l'expression de surface sur l'expression protéique totale de MC2R, nous pouvons observer que l'expression de surface de WT-MC2R est proportionnelle à son expression totale (Figure 22). Pour T143S et de QQQQ, leurs expressions de surface ne sont pas proportionnelles à leur expressions totales induites par chacune des MRAPs. L'expression de surface de T143S et QQQQ est quasiment nulle en absence de MRAPs exogènes et l'apport en MRAPs réchappe en partie leurs expressions de surface, peu importe si MRAP1 ou MRAP2 est utilisé. Ces résultats indiquent que MRAP2 régule tout autant l'expression de surface du WT MC2R que celle des mutants T143S et QQQQ, donc ces derniers ne sont pas MRAP2-indépendants. AT₂R a été utilisé comme contrôle puisque son expression n'est pas modifiée par la présence des MRAPs.

Chapitre 4 – Discussion

Les études effectuées au cours de mon doctorat ont porté sur les mécanismes de régulation de MC2R. Suite à l'établissement du modèle expérimental et avant d'entreprendre les études de désensibilisation et d'internalisation de MC2R, j'ai jugé primordial de mieux comprendre le rôle des protéines MRAPs dans la régulation fonctionnelle de MC2R afin de mieux connaître les outils (protéines) que j'allais utiliser dans toutes les expérimentations qui allaient suivre. Il est à noter qu'au début de ma thèse en 2006, rien n'était connu sur les protéines MRAPs outre le fait qu'elles semblaient nécessaires à la fonction de MC2R (Metherell *et al.*). Ainsi avec le modèle cellulaire en mains, j'ai d'abord voulu savoir si les MRAPs permettaient la N-glycosylation de MC2R car des protéines comme les RAMPs (section 1.7.4) peuvent influencer la N-glycosylation des récepteurs avec lesquels ils interagissent (Mclatchie *et al.*, 1998). J'ai ensuite voulu vérifier les propriétés des protéines MRAPs, car de toute évidence, les isoformes MRAP α et MRAP β et tous les orthologues de MRAP1 ont des domaines C-terminaux entièrement différents (mais des domaines N-terminaux et transmembranaires hautement conservés) et ceux-ci pourraient engendrer des propriétés fonctionnelles distinctes à chaque MRAP1 de chaque espèce, un peu comme les autres protéines accessoires à un seul domaine transmembranaire (section 1.7.4). Une fois certain que les études de désensibilisation et d'internalisation de MC2R ne seraient pas encombrées par notre manque de connaissance sur les protéines MRAPs, le projet principal de cette thèse a pris son cours et s'est soldé par une analyse du mécanisme d'internalisation de MC2R et des phénomènes pouvant y être reliés (comme l'activation des MAPK) . Ces travaux novateurs se sont conclus, pour la quasi-totalité, par des publications dans d'excellents journaux du domaine.

4.1 Expression fonctionnelle de MC2R

Dans l'article de la section 3.1, les études d'immunofluorescence et d'ELISA, effectuées sur des cellules 293/FRT fixées et non-perméabilisées, indiquent clairement que MC2R est localisé à la surface cellulaire, en l'absence des isoformes MRAP1. La comparaison entre Myc-MC2R et MC2R-GFP indique que bien que l'approche de la fusion C-terminale de GFP ait été utilisée avec succès pour plusieurs autres RCPGs, y compris MC3R, MC4R, et le β_2 AR (Rached *et al.*, 2003; Blondet *et al.*, 2004; Hynes *et al.*, 2004), elle ne semble pas appropriée pour MC2R, le plus petit RCPG humain. Comme il a été publié et confirmé dans cette étude, la fusion de GFP au C-terminus de MC2R altère son trafic intracellulaire et sa signalisation (Noon *et al.*, 2002; Rached *et al.*, 2003; Rached *et al.*, 2005), comme pour d'autres RCPGs (McLean and Milligan, 2000; Wang *et al.*, 2008) Il est connu que l'intégrité du motif dileucine de MC1R situé dans sa queue C-terminale est particulièrement importante pour son expression à la surface cellulaire (Sanchez-Mas *et al.*, 2005b). L'analyse mutationnelle de ce motif dileucine a également confirmé son importance pour l'expression à la surface cellulaire et la fonction de MC4R (Vanleuwen *et al.*, 2003). Un motif similaire, M290 et I291 situé dans le court domaine C-terminal de MC2R, est potentiellement obstrué dans la protéine de fusion MC2R-GFP comparativement à Myc-MC2R. En effet, l'étiquetage d'un épitope N-terminal sur MC1R, MC2R, ou MC4R ne semble pas affecter le trafic ou la fonction de ces récepteurs (Tao and Segaloff, 2005; Kilianova *et al.*, 2006; Sanchez-Laorden *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation de l'épitope c-Myc en immunofluorescence permet de détecter uniquement Myc-MC2R par la technique d'immunofluorescence puisque l'épitope correspondant sur la protéine endogène c-Myc est localisé dans une partie non-accessible de la protéine c-Myc lorsqu'elle est exprimée dans les cellules dans sa conformation quaternaire.

Dans notre étude, et comme décrit précédemment avec la Mrap de souris (Metherell *et al.*, 2005), la transfection du MC2R humain et des isoformes MRAP1 humaines permet la production d'AMPc suite à une stimulation par l'ACTH (Roy *et al.*, 2007). Dans leur étude, Metherell *et al.* ont montré une interaction entre Mrap et MC2R-

GFP et la conséquence fonctionnelle de ces interactions en termes de réponse à l'ACTH. Dans la lignée cellulaire SK-N-SH qui exprime des MCRs endogènes, la fonctionnalité de MC2R avait été montrée avec une seule concentration d'ACTH (1 μ M) et en présence d'IBMX 10 μ M (concentrations 10 fois plus élevées que celles utilisées dans notre étude). Dans une étude antérieure effectuée dans notre laboratoire, en utilisant des cellules de mélanome murin M3 transfectées avec Myc-MC2R, nous avons obtenu des valeurs d' EC_{50} variant de 7,6 nM à 11,9 nM. Une stimulation maximale allant de 20.9 ± 0.7 à 24.7 ± 0.7 -fois le taux d'AMPC basal, ce qui représentait une faible fonctionnalité de MC2R par rapport aux résultats *in vivo* ou *in vitro* obtenus avec des cellules de corticosurrénale en culture primaire (Gallo-Payet and Payet, 1989; Lebrethon *et al.*, 1994; Gallo-Payet *et al.*, 1996). Les résultats obtenus dans notre nouveau modèle cellulaire entièrement humain sont les premiers à reproduire les courbes concentration-réponse de l'ACTH sur la production d'AMPC en présentant des propriétés similaires à celle précédemment décrites dans des cultures primaires de cellules glomérulée et fasciculée humaines (Gallo-Payet *et al.*, 1996). En effet, comme les cellules de surrénale de rat, la stimulation par l'ACTH dans notre modèle est initiée à un seuil physiologique très bas (pM) avoisinant les concentrations circulantes basales, et induit une stimulation maximale élevée (plus de 60 fois le niveau basal) (Gallo-Payet and Escher, 1985; Clark and Cammas, 1996; Penhoat *et al.*, 2001). Ainsi, notre modèle cellulaire reconstitué est capable de reproduire la fonctionnalité de MC2R à des concentrations d'ACTH physiologiques.

Les mesures de l'expression de surface de MC2R par ELISA, ainsi que les études d'immunofluorescence, corroborent les capacités de liaison de l'ACTH iodée utilisée et indiquent que les isoformes MRAP1 augmentent l'expression de surface de MC2R et ce, à des niveaux différents pour chaque isoforme MRAP1. De plus, les études de liaison hormone-récepteur indiquent que MRAP α procure à l'ACTH une affinité légèrement plus élevée (2-fois) pour lier MC2R que MRAP β . Par conséquent, les courbes doses-réponses révèlent une sensibilité 4-fois plus grande à la stimulation par l'ACTH dans les cellules exprimant MRAP α comparativement à MRAP β . Les réponses maximales sont pourtant 1,4-fois plus élevées dans les cellules exprimant MRAP β . Bien que la différence dans les valeurs de EC_{50} et de réponses maximales soient modestes, nos données fournissent une

preuve que les isoformes MRAP1 modulent différemment l'expression membranaire de MC2R et affectent la réponse AMPc à la fois en amplitude et en sensibilité.

Contrairement à MC2R, les extrémités C-terminales des isoformes MRAP1 étaient très peu présentes à la membrane plasmique lorsqu'elles étaient exprimées de façon stables et isogéniques dans les cellules 293/FRT/MRAP. En outre, MC2R n'est dans un état fonctionnel qu'en présence de MRAP α ou MRAP β . Ces résultats suggèrent que, en plus de promouvoir une plus grande expression de surface à MC2R, les isoformes MRAP1 pourraient aussi favoriser l'expression à la membrane plasmique de protéines essentielles pour le couplage, telles les sous-unités β et γ des protéines G_s ou les ACs de type 2 ou 4 impliquées dans la réponse à l'ACTH (Ostrom *et al.*, 2004; Rui *et al.*, 2004). Les isoformes MRAP1 pourraient aussi faire partie d'un complexe d'échafaudage. Par exemple, les composants des radeaux lipidiques peuvent moduler l'activité de AC5 et AC6 (Ostrom *et al.*, 2004) impliquées dans les voies de signalisation et la stéroïdogenèse surrénalienne (Shen *et al.*, 1997; Côté *et al.*, 2001). Comme signalé pour d'autres récepteurs (Mclatchie *et al.*, 1998; Mizrachi and Segaloff, 2004; Conner *et al.*, 2006), des déterminants moléculaires faisant partie de la structure protéique de MC2R sont probablement requis pour les interactions allostériques et/ou la régulation par des protéines accessoires (May *et al.*, 2007) afin de permettre l'expression de surface et la transduction du signal de MC2R (Metherell *et al.*, 2006).

Les avantages du notre nouveau modèle d'expression pour MC2R décrit dans la section 3.1, par rapport à la lignée cellulaire M3 par exemple, peuvent être résumés comme suit: 1) le modèle élimine la possible régulation croisée avec des récepteurs endogènes comme Mc1r dans les cellules M3, en particulier parce que MC1R est connu pour s'homodimériser (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006) et possiblement s'hétérodimériser (potentiellement avec MC2R si exprimé dans les cellules M3); 2) il élimine le risque de divergences observées lors de l'utilisation des lignées cellulaires d'origine murine (cellules Y6 et M3) dans lesquelles la Mrap souris endogène peut ne pas être aussi efficace que les isoformes MRAP1 humaines à activer la fonction du MC2R humain; 3) il permet un contrôle flexible sur l'expression transitoire vs stable des gènes soit MC2R, MRAP α ,

MRAP β , ou autres protéines d'intérêt; 4) le modèle est adaptable à des vecteurs polycistroniques et permet l'intégration d'au moins deux gènes d'intérêt dans un seul locus génomique transcriptionnellement actif qui, dans le cas de MC2R et des isoformes MRAP1 isoformes, est nécessaire pour atteindre l'expression fonctionnelle et 5) la recombinaison homologe de n'importe quel gène d'intérêt ne prend guère plus de 2 semaines à réaliser et ce, de façon rapide et efficace afin d'obtenir des lignées d'expression stables et isogéniques.

4.2 N-glycosylation de MC2R

Article non-présenté dans cette thèse.

Roy, S., B. Perron and N. Gallo-Payet. Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. Endocrinology 151, 660-670 (2010).

Les cellules corticosurréaliennes de rat ou humaines qui expriment MC2R de façon endogène ne peuvent pas être facilement transfectées avec de l'ADN plasmidique (comme les mutants). Nous avons utilisé des conditions artificielles afin de reproduire un système fonctionnel pour la caractérisation de la N-glycosylation de MC2R. Ainsi, une version étiquetée de MC2R et des mutants de N-glycosylation (Myc-MC2R) ont été exprimés dans les cellules humaines 293/FRT qui n'expriment pas de MCRs endogènes (Roy *et al.*, 2007).

Les résultats montrent que dans les cellules 293/FRT, Myc-MC2R est exprimé sous trois espèces moléculaires. Dans les cellules traitées avec la tunicamycine ainsi que le produit final de la digestion des protéines par la PNGase F (peptide: N glycosidase F) donnent des espèces immunoréactives de 25 kDa exclusivement, indiquant que cette dernière est la forme non-glycosylée, native et monomérique de Myc-MC2R. La forme intermédiaire de 33 kDa, sensible à la tunicamycine-, l'endo H (endoglycosidase H) et la PNGase F, représente la forme glycosylée immature monomérique de Myc-MC2R. La

forme 50-65 kDa, également la principale forme de Myc-MC2R retrouvée dans les cellules stables exprimant Myc-MC2R, n'est sensible qu'à la déglycosylation par la PNGase F mais pas Endo H, ce qui correspond à la forme mature terminalement glycosylée de MC2R. Les résultats obtenus avec Myc-MC2R (297 + 11 aa de l'étiquette Myc) sont compatibles avec les résultats obtenus avec Flag-MC1R (317 aa + étiquette Flag) pour lequel il a été rapporté que les formes à 30 et 36 kDa sont des monomères (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006). Dans une étude récente utilisant hémagglutinine (HA)-MC2R exprimé dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), Sebag et al. ont rapporté la présence d'espèces 25, 36 et 50-65 kDa (Sebag and Hinkle, 2007). Ces variations subtiles dans les profils électrophorétiques de MC2R peuvent s'expliquer par la différence dans les cellules hôtes ou par les différentes méthodes utilisées dans la préparation des échantillons de protéines ou par le pouvoir de résolution SDS-PAGE ainsi que le marqueur de masse moléculaire utilisé.

Les analyses mutationnelles (mutants QQNN, NNQQ et QQQQ) montrent de façon concluante que Myc-MC2R est N-glycosylé sur ses deux sites putatifs. Les mutants pour lesquels un seul des deux sites est aboli (QQNN et NNQQ) montrent une variation de masse moléculaire de 4 kDa de leur formes immatures (29 kDa) comparativement au MC2R sauvage (33 kDa ; 25 + 4 + 4 kDa). Comme prévu, le mutant QQQQ n'est pas glycosylé. Après l'analyse des séquences MC2R de différentes espèces, un équivalent à l'Asn-12 est conservé dans toutes les espèces sauf chez le poisson. Bien que l'Asn-12 soit également conservée chez les rongeurs, il est peu probable qu'elle soit N-glycosylée puisqu'une Asp est positionnée en X dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (Welply *et al.*, 1983). Dans la séquence de MC2R d'autres espèces, X est défini par Gly, Ser ou Ala, qui sont tolérés par la machinerie cellulaire de N-glycosylation (Welply *et al.*, 1983). Un équivalent au résidu Asn-17 est conservé chez toutes les espèces représentées dans l'alignement de séquences.

Dans notre étude, le mutant NNQQ (N17-18Q) a eu les effets les plus importants sur l'expression de surface de MC2R (sans MRAP) et sur l'activité dépendante de l'ACTH en comparaison avec QQNN (N12-13Q). Par conséquent, Asn-17 est

probablement une cible de N-glycosylation bien conservée dans MC2R chez plusieurs espèces. Mis à part MC2R, aucun autre MCR ne possède des sites consensus de N-glycosylation organisé comme une succession d'asparagine (Asn12-Asn13-Thr14 et Asn17-Asn18-Ser19). Alors que d'autres MCRs humains possèdent aussi des sites putatifs de N-glycosylation dans leurs domaines N-terminaux extracellulaires, ces MCRs montrent cependant peu de conservation au niveau de leurs séquences d'acides aminés dans leur domaine N-terminal, rendant impossible d'extrapoler les résultats obtenus avec MC2R à d'autres MCRs.

Fonctionnellement, la suppression d'un seul ou des deux sites de N-glycosylation n'a pas eu un effet très important sur la réponse maximale d'AMPC induite par l'ACTH. La concentration EC_{50} pour la production d'AMPC a légèrement augmenté avec QQNN et NNQQ et augmenté de façon plus significative avec QQQQ, et ce, indépendamment de la MRAP1 co-exprimée (MRAP α , β ou dCT). Ces résultats suggèrent donc que la N-glycosylation de MC2R n'est pas critique, mais influence légèrement l'activité de MC2R en ce qui concerne la réponse à l'ACTH. De façon analogue à la relation entre MC2R et les isoformes MRAP1, la fonctionnalité du récepteur du goût amer 16 humain (TAS2R16) non-glycosylé est partiellement rattrapée par la présence de protéines de transport de récepteurs (RTP3 et RTP4) (Reichling *et al.*, 2008), ce qui suggère que pour MC2R et TAS2R16, la N-glycosylation module, mais n'est pas cruciale pour leur fonctionnalité. Comme observé pour d'autres RCPG, y compris le β_2 AR (Mialet-Perez *et al.*, 2004), la N-glycosylation peut possiblement faciliter le fonctionnement de MC2R par l'enrichissement des récepteurs dans des compartiments cellulaires comme les radeaux lipidiques (Kohno and Igarashi, 2004), ou en interagissant dans la signalisation des récepteurs, dans les échafaudages protéiques, la désensibilisation, l'internalisation, le recyclage et la dégradation, sujets qui nécessitent une étude plus approfondie (voir section 3.3).

Les ELISA quantitatifs et les images d'immunofluorescence obtenues avec des cellules exprimant de façon stable QQNN ou NNQQ (un seul site de N-glycosylation) indiquent que, par rapport à leur expression totale, leur potentiel d'expression de surface

est similaire au WT (MC2R sauvage). Toutefois pour QQQQ, le potentiel d'expression de surface n'a été r chapp  qu'à 33% des niveaux du WT, indiquant que l'ablation des deux sites de N-glycosylation a un impact plus drastique en matière de trafic de MC2R vers la surface (membrane plasmique) que l'ablation d'un seul site. En comparaison, les résultats obtenus avec les autres RCPGs mutants pour leur N-glycosylation tels que AT₁R (Jayadev *et al.*, 1999; Lanctot *et al.*, 1999; Lanctot *et al.*, 2005), le récepteur de la bradykinine (Michineau *et al.*, 2004) ou le β_2 AR (Rands *et al.*, 1990) ont montré que la N-glycosylation de ces récepteurs est importante pour leurs expressions de surface et leur ciblage. En revanche, pour le récepteur H2 de l'histamine (Fukushima *et al.*, 1995), le récepteur α_1 adrénergique (Sawutz *et al.*, 1987) et le récepteur muscarinique M2 (Van Koppen and Nathanson, 1990), la N-glycosylation n'est pas importante. Par conséquent la N-glycosylation joue un rôle non-redondant chez les RCPGs.

Nous avons montré qu'en absence de N-glycosylation, l'expression de surface de MC2R est fortement altérée, tandis que son activité fonctionnelle (la production d'AMPC) est légèrement touchée. En outre, la N-glycosylation de MC2R sur au moins un site semble indispensable pour l'expression de surface de MC2R en absence de facteurs exogènes comme les isoformes MRAP1. En présence d'au moins une isoforme MRAP1, la N-glycosylation facilite l'expression membranaire de MC2R.

En comparaison avec le WT, l'absence totale de N-glycosylation (mutant QQQQ) a abouti à ~ 21% de récepteurs exprimés à la surface cellulaire en présence du MRAP, niveaux néanmoins suffisants pour assurer une réponse ~ 80% efficace par rapport au WT. Ces résultats suggèrent qu'une population de protéines WT (~ 50%) est localisée à la surface cellulaire mais n'est pas recrutée dans la production d'AMPC induite par ACTH. La perte d'expression de surface de ces récepteurs supplémentaires non-fonctionnels (et non pas des récepteurs de réserve) appar it concomitante avec la perte de sa N-glycosylation (comme avec QQQQ). Une étude antérieure réalisée avec MC1R, MC3R, MC4R et MC5R tronqués de leurs domaines N-terminaux avait conclu que l'absence du domaine N-terminal des MCRs, qui comprennent la plupart des sites de N-glycosylation,

avait peu d'influence sur la fonction de ces récepteurs (Schioth *et al.*, 1997). Nos observations avec le MC2R humain sont en accord avec cette dernière étude. En effet, bien que l'expression totale de QQQQ et sa capacité d'être exprimé à la membrane plasmique soient réduites, l'activité fonctionnelle de QQQQ n'est pas considérablement entravée comparativement au WT. Ces résultats sont très similaires aux effets de l'ablation des sites de N-glycosylation du récepteur aux opioïdes μ (Petaja-Repo *et al.*, 2000), surtout lorsqu'exprimé dans des cellules 293/FRT inductibles (Markkanen and Petaja-Repo, 2008).

Comme indiqué précédemment (sections 1.6.3 et 3.1), la recherche sur MC2R avait été entravée par l'absence d'un modèle fonctionnel pour son expression (Noon *et al.*, 2002; Rached *et al.*, 2005). Notre modèle actuel a l'avantage de fournir un environnement tout-humain pour l'expression fonctionnelle de MC2R et des MRAPs (Roy *et al.*, 2007). Si le rôle des isoformes MRAP1 était de permettre la N-glycosylation de MC2R afin de permettre son expression à la surface des cellules et sa fonctionnalité, alors le mutant QQQQ ne serait donc pas dirigé vers la membrane plasmique puisqu'il n'est jamais N-glycosylé, même en présence des isoformes MRAP1. Plutôt, nous montrons que MRAP α et MRAP β sont capables de conserver ou même de promouvoir l'expression de surface de tous les mutants de N-glycosylation, ce qui indique que l'un des rôles des MRAP1, en particulier de MRAP β réside dans l'augmentation du trafic de MC2R vers la surface cellulaire, mais probablement pas dans la N-glycosylation tel que proposé initialement (Sebag and Hinkle, 2007). Toutefois, cette possibilité ne peut être totalement exclue de notre étude parce que MC2R était facilement N-glycosylé dans les cellules 293/FRT natives avant l'introduction des MRAP1 exogènes. En effet, nous avons détecté l'ARNm de MRAP2 dans les cellules 293/FRT. Cette expression endogène de MRAP2 explique possiblement l'expression basale de MC2R à la surface cellulaire en absence d'isoformes MRAP1. En outre, nous montrons aussi que MRAP2 permet une réponse à l'ACTH marginale et non-significative si son expression est augmentée par transfection stable ou transitoire. Par conséquent, MRAP2 endogène peut fournir une explication à l'expression basale de MC2R à la surface cellulaire et l'absence de fonction lorsque les isoformes MRAP1 ne sont pas co-exprimées avec MC2R (Roy *et al.*, 2007). Toutefois, en raison de

la présence endogène de MRAP2 dans les cellules 293-FRT, nous ne pouvons pas conclure si les MRAP1s (et MRAP2) facilitent la N-glycosylation de MC2R. Malgré cela, nos résultats montrent néanmoins que les augmentations de l'expression totale de MC2R varient avec la coexpression des isoformes MRAP1 (surtout avec MRAP β). Ceci est probablement une conséquence de l'interaction fonctionnelle entre MC2R, MRAP et d'autres protéines qui peuvent favoriser la maturation MC2R, autrement que lorsqu'il est exprimé seul.

Une des principales conclusions de cette étude est que l'absence de N-glycosylation de MC2R est essentielle pour l'expression de surface de MC2R en absence des isoformes MRAP1. Les résultats présentés indiquent que MC2R est N-glycosylé dans les cellules 293/FRT et ce, sans l'expression exogène des isoformes MRAP1. En présence de MRAP2 endogène, lorsque MC2R est N-glycosylé, il peut être exprimé à la membrane plasmique sans assistance exogène des isoformes MRAP1 dans les cellules 293/FRT. MC2R est N-glycosylé au niveau de ses deux sites putatifs par un processus impliquant une glycosylation de base (glycans immatures de 4 kDa sur chaque site de glycosylation) et une glycosylation terminale (addition de 25-40 kDa de sucres matures sur MC2R natif de 25 kDa). Une fois à la membrane plasmique, la N-glycosylation de MC2R, bien qu'elle ne soit pas une exigence absolue, augmente légèrement la puissance de l'ACTH à stimuler la production d'AMPc.

4.3 Rôles des parties C-terminales des isoformes MRAP1

Nos résultats de la section 3.2 suggèrent que l'isoforme MRAP α est exprimée au début de la voie d'exocytose/sécrétion des protéines transmembranaires ou dans les systèmes de transport rétrogrades ou encore dans la voie de dégradation lysosomale (ER, endosomes Rab1, Rab7 et Rab11), tandis que MRAP β a été observé en association avec les étapes ultérieures de la voie d'exocytose/sécrétion (membrane plasmique, endosomes Rab4, Rab5 et Rab11, mais pas Rab7). Entre les deux, la version tronquée de MRAP1 dépourvue du domaine C-terminal (MRAPdCT) a été presque exclusivement retrouvée

dans l'appareil de Golgi et dans les endosomes Rab1-positif, ce qui suggère fortement que les domaines C-terminaux de MRAP1 possèdent une séquence d'acides aminés qui est essentielle pour le tri des molécules au niveau de l'appareil de Golgi. Nos observations indiquent que, en l'absence de MC2R, MRAP α est normalement triée dans des compartiments pré-Golgi et MRAP β est préférentiellement triée dans des compartiments post-Golgi. En dépit de ces observations, le rôle des MRAPs en l'absence de MC2R reste inconnu, mais suggère que les MRAP1s pourraient être différemment impliqués dans le transport des protéines non-liées à la signalisation de l'ACTH, tel que décrit initialement dans les adipocytes (Xu *et al.*, 2002). En raison de sa localisation, MRAP α pourrait être impliquée dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi (Lippincott-Schwartz, 1993b; Lippincott-Schwartz, 1993a) ou pourrait être impliquée dans l'interaction entre MC2R et la nucleoporine 50 (Doufexis *et al.*, 2007). Fait à noter, les localisations de MRAP α et MRAP β se chevauchent parfois en fonction de leurs niveaux d'expression. Par exemple, dans les cellules les exprimant de façon stable, la localisation à la membrane plasmique de MRAP α est très faible mais n'est pas totalement absente et celle-ci peut être accentuée par transfection transitoire (surexpression) (Roy *et al.*, 2007). De plus, MRAP β surexprimé se trouve parfois dans les régions périnucléaires. L'intégration du gène d'intérêt dans les cellules stables 293/FRT mène à une faible expression des protéines (c'est-à-dire que le MC2R stable ou les isoformes MRAP1 exprimées seuls sont difficiles à détecter par WB) puisque le gène d'intérêt s'insert dans un seul locus génomique. Par conséquent, à faibles niveaux d'expression, les isoformes MRAP1 sont préférentiellement ciblées vers des localisations différentes, qui parfois se chevauchent entre elles en fonction de leurs propres niveaux d'expression et de ceux de MRAP2 et de MC2R.

La surexpression de MRAP2 a été utilisée pour étudier son effet. MRAP2 colocalise avec MRAP α et augmente sa localisation à la membrane plasmique. En conséquence, et comme déjà observé (Chan *et al.*, 2009), MRAP2, MRAP α ainsi que MRAP β peuvent être retrouvées dans le même complexe protéique après immunoprécipitation. Ceci indique que le domaine N-terminal conservé est probablement suffisant pour cette interaction (Chan *et al.*, 2009; Sebag and Hinkle, 2010). MRAP2 est

capable de promouvoir l'expression de surface de MC2R (Chan *et al.*, 2009; Sebag and Hinkle, 2010). Cependant, la raison pour laquelle MRAP2 favorise le ciblage de MRAP α à la membrane plasmique reste inconnue, mais cette fonction pourrait être liée à des événements physiologiques indépendants de la signalisation de l'ACTH. Ainsi, il a été récemment rapporté que l'expression de MRAP2 augmente la sensibilité des cellules HEK293 au méthylmercure (Hwang *et al.*, 2010), un polluant environnemental. Contrairement aux résultats antérieurs indiquant que MRAP2 de souris régule négativement la signalisation de ACTH (Sebag and Hinkle, 2010), nos résultats montrent plutôt que MRAP2 régule positivement l'expression de surface et l'expression totale de MC2R, mais est sans effet sur l'AMPc induite par l'ACTH (Roy *et al.*, 2010a). Les résultats de la section 3.2 sont plutôt en accord avec nos études précédentes réalisées chez le poisson zèbre, où la co-expression de zfMRAP2a et de zfMRAP2b renforçait les effets de zfMRAP1 sur la signalisation zfMC2R (Agulleiro *et al.*, 2010). Une hypothèse pour réconcilier ces différentes données est que MRAP2 pourrait réguler l'expression et/ou la fonctionnalité des différentes MRAP1s en fonction de leurs différents domaines C-terminaux. L'observation que MRAP2 cause une augmentation de l'expression protéique de MRAP α et de MRAP β , et *vice et versa*, est en faveur de cette hypothèse.

Nos travaux ont montré que le MC2R humain et celui du poisson zèbre sont capables de moduler la localisation des isoformes MRAP1 et de promouvoir la signalisation de l'ACTH. Il est déjà connu que les MRAP1s induisent des augmentations d'expression de MC2R dans des lignées cellulaires humaines et de rongeurs (Sebag and Hinkle, 2007; Roy *et al.*, 2010a). Cependant, nous avons fourni ici la preuve que l'expression protéique de MRAP α et de MRAP β peut aussi être augmentée par la coexpression de MC2R ou de MRAP2. Cette information suggère fortement que MC2R, les MRAP1s et MRAP2 stabilisent leur expression mutuellement ou réduisent leur dégradation.

Il est généralement admis que les RCPGs, y compris MC2R, adoptent la topologie classique en heptahélice à travers les bicouches lipidiques, telle que la membrane plasmique, et possèdent un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminale

intracellulaire (Xu *et al.*, 2002; Sebag and Hinkle, 2007). En revanche, les isoformes MRAP1 sont des protéines membranaires uniques parce qu'elles adoptent une double topologie (Sebag and Hinkle, 2007; Cooray *et al.*, 2008). Il a déjà été montré que MRAP1 de souris forme des homodimères antiparallèles qui interagissent avec le MC2R humain exprimé à la surface cellulaire des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) et dans les cellules Y1 de tumeur surrénalienne de souris (Sebag and Hinkle, 2007; Cooray *et al.*, 2008). Ces études ont indiqué que MRAP1 de souris est N-glycosylée et qu'elle adopte deux orientations opposées dans la membrane plasmique. La molécule présente dans la membrane plasmique en topologie de type II ($N_{\text{cyto}}/C_{\text{exo}}$) n'est pas N-glycosylée alors que celle en topologie de type I ($N_{\text{exo}}/C_{\text{cyto}}$) l'est. Dans la même étude, les molécules MRAP1 de type I et de type II étaient exprimées à la membrane plasmique dans un rapport d'environ 50: 50 (Sebag and Hinkle, 2007). Ceci est hautement similaire à ce qui a été observé pour MRAP β et MRAPdCT dans les sections 3.1 et 3.2. Ainsi la double topologie semble être une caractéristique structurelle de MRAP1 conservée et le principal facteur déterminant pour cette caractéristique se situe dans leurs domaines N-terminaux hautement conservés (Figure 18) (Sebag and Hinkle, 2009). Bien que dans nos expériences la double topologie de MRAP β et de MRAPdCT soit clairement observée, seule l'extrémité C-terminale de MRAP α a pu être détectée à l'extérieur des cellules. Cette dernière information indique que les molécules MRAP α présentes à la membrane plasmique sont toutes dans la topologie de type II. Ce résultat est en accord avec l'analyse bioinformatique qui prédit que le domaine C-terminal de MRAP α peut être O-glycosylé. En effet, dans les analyses Western, plusieurs bandes ont été observées qui pourraient correspondre à des formes O-glycosylées de MRAP α . Cependant, au moins une forme de MRAP α était sensible au traitement des cellules avec la tunicamycine, un inhibiteur de N-glycosylation. Comme les glycans sont habituellement retrouvés dans les compartiments extracellulaires telles que les matrices du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des vésicules, et rarement dans le cytoplasme, alors la topologie de type I de MRAP α existe probablement (Webb *et al.*, 2009). Toutefois, cette topologie de type I de MRAP α semble alors réservée aux membranes de vésicules ou aux compartiments intracellulaires et non pas à la membrane plasmique puisque la portion de MRAP α qui est exprimée à la surface cellulaire est de type II ($N_{\text{cyto}}/C_{\text{exo}}$) et donc ne peut être N-glycosylée en son

domaine N-terminal, mais pourrait être O-glycosylé dans son domaine C-terminal. Globalement, il semble que le domaine C-terminal de MRAP α compartimente sa double topologie différemment entre la membrane plasmique et l'intérieur des cellules. La proportion de MRAP α pouvant être exprimée à la membrane plasmique en topologie de type II pourrait aussi dimériser avec les molécules MRAP2 de type I.

Le rôle exact des protéines à double topologie n'a pas été établi jusqu'à présent. Si les domaines N-et C-terminaux de MRAP1 peuvent être localisés dans le cytoplasme, ils pourraient éventuellement être régulés par des protéines cytoplasmiques telles que des kinases et phosphatases ou interagir avec des molécules de signalisation comme les protéines G, les arrestines ou autres systèmes de régulation du trafic et de la signalisation des RCPGs. En outre, la double topologie des MRAPs pourrait jouer un rôle dans la fusion des membranes aux autres membranes ou dans les événements de liaison et d'ancrages de ces membranes. Par exemple, les MRAPs pourraient posséder la capacité de s'insérer dans les membranes bilipidiques sans avoir besoin de se retourner une fois insérées puisque qu'elles sont déjà dans deux orientations (topologies). Une telle stratégie pourrait être utile et de moindre coût énergétique pour la cellule afin d'effectuer certains processus cellulaires critiques et essentiels. Sinon, la double-topologie pourrait être impliquée dans un mécanisme de chaperonnage moléculaire, aidant le repliement de MC2R au cours de sa biogenèse dans le réticulum endoplasmique ou encore pourrait être impliqué dans la translocation des hélices α à travers les membranes du réticulum endoplasmique (Hegde and Lingappa, 1997; Goder and Spiess, 2001; Goder and Spiess, 2003). Il est possible que les MRAPs servent à transloquer une hélice α transmembranaire de MC2R dans l'orientation correcte, similaire à ce qui est observé au cours de la topogenèse de l'aquaporine-1 (Skach and Lingappa, 1994; Hegde and Lingappa, 1997; Goder and Spiess, 2001; Dohke and Turner, 2002; Goder and Spiess, 2003; Buck and Skach, 2005).

Enfin, nos données de la section 3.2 indiquent clairement que les segments C-terminaux des isoformes MRAP1 modulent les réponses AMPc et p44/p42^{mapk} stimulées par l'ACTH. Corroborant les études précédentes qui utilisaient différentes versions

tronquées de MRAP1 humain ou souris (Sebag and Hinkle, 2007; Webb *et al.*, 2009), nous avons constaté que MRAPdCT est suffisant pour amener l'expression fonctionnelle de MC2R (Roy *et al.*, 2010a). Cependant, la coexpression de MRAPdCT avec MC2R induit une réponse maximale intermédiaire pour l'AMPc et pour la phosphorylation de p44/p42^{mapk}. Aussi, la diminution de la sensibilité de l'ACTH en ce qui concerne la production d'AMPc observée en présence de MRAPdCT indique que les domaines C-terminaux des isoformes MRAP1 humaines sont impliqués dans la signalisation en augmentant la puissance de l'ACTH. Cela peut se produire en modifiant l'affinité de MC2R pour l'ACTH (Roy *et al.*, 2007). La puissance de l'ACTH semble ainsi MRAP1 isoforme-dépendante et spécifique à l'espèce puisque les domaines C-terminaux de MRAP1 de poisson zèbre, de souris et de l'humain sont radicalement différents. En effet, MRAP1 de poisson zèbre a eu un effet majeur sur la puissance de l'ACTH. D'autre part les réponses maximales obtenues à l'aide des différentes MRAP1s sont corrélées avec les niveaux d'expression de surface de MC2R qu'ils induisent. La modulation de la puissance de l'ACTH et de son efficacité sur MC2R lors de la réponse des cellules corticosurréaliennes à l'ACTH peut jouer un rôle important dans la régulation fine de la sécrétion de glucocorticoïdes qui est nécessaire pour maintenir non seulement l'homéostasie du glucose et des lipides, mais aussi l'homéostasie générale (Roberge *et al.*, 2007).

4.4 Phosphorylation, désensibilisation, internalisation et recyclage de MC2R

Les résultats de la section 3.3 illustrent de façon nouvelle et détaillée les mécanismes impliqués dans la régulation à court terme de l'activité de MC2R et révèlent des caractéristiques propres au récepteur de l'ACTH. Nos résultats indiquent que l'internalisation de MC2R est dépendante de la concentration d'ACTH et est accompagnée par le trafic concomitant de MC2R et des isoformes MRAP1. De la population des récepteurs internalisés, environ un tiers sont recyclés vers la membrane plasmique pour

promouvoir une signalisation de l'AMPc soutenue. La substitution de 5 résidus S/T intracellulaires de MC2R (T131, S140, T143, T147 et S280) en A ou D a eu un impact majeur sur l'expression de surface, l'accumulation d'AMPc et/ou les paramètres de l'internalisation. La seconde boucle intracellulaire semble cruciale pour l'expression de MC2R et sa régulation fonctionnelle. Les analyses de mutagenèse indiquent que la mutagenèse en A ou en D de certains S/T intracellulaires de MC2R peut en améliorer la fonction ou mettre en péril son internalisation.

Les cellules 293/FRT utilisées dans cette étude, exprimant de façon stable le MC2R humain et les isoformes MRAP1, en plus du MRAP2 endogène, ont l'avantage d'exprimer tous les éléments connus à ce jour d'un récepteur de l'ACTH fonctionnel (MC2R humain, MRAP α ou MRAP β , et MRAP2). L'étendue maximale de l'internalisation MC2R sur une période de 60 min (entre 20 et 30% selon les expériences et les stratégies d'expression) est conforme à celle d'une étude précédente réalisée dans les cellules Y1 dans laquelle 20% des MC2R initialement présents à la surface cellulaire étaient internalisés après une période de 30 min. En outre, la réduction de MC2R à la surface cellulaire après exposition à l'ACTH semble être dépendante de la liaison ACTH-MC2R parce que les agents élevant les concentrations intracellulaires d'AMPc, FSK et IBMX, ne provoquent pas d'augmentation de l'internalisation MC2R. En outre, les concentrations faibles d'ACTH n'induisent pas l'internalisation MC2R, mais seulement sa désensibilisation (Figure 20; section 3.3.1).

Le premier aspect de cette étude était de déterminer si les arrestines étaient complexées avec MC2R au cours de son internalisation. Une augmentation significative dans l'internalisation de MC2R a été observée lorsque l'arrestine3 a été surexprimée, mais pas avec l'arrestine2, suggérant ainsi une plus grande affinité de MC2R pour l'arrestine3 au cours du processus d'internalisation. En outre, MC2R a été immunoprécipité avec l'arrestine3 avec et sans stimulation par l'ACTH. Ceci est cohérent avec les observations obtenues par microscopie confocale dans lesquelles MC2R et l'arrestine3 ont pu être observés à la membrane plasmique sans aucune stimulation à l'ACTH. Ce patron de co-localisation est en partie similaire à celui observé pour le β_2 AR et pour le récepteur

chimiotactique exprimé sur les cellules Th2 (CRTH2) lors de leur stimulation (Roy *et al.*, 2010c). Toutefois, l'internalisation de MC2R est modeste par rapport à β_2 AR exprimé dans les mêmes conditions et le β_2 AR n'interagit pas avec les arrestines de façon constitutive. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures dans lesquelles MC2R ou les autres MCRs internalisaient avec l'arrestine3 (β -arrestine2-GFP) (Cai *et al.*, 2006; Kilianova *et al.*, 2006).

Nous avons aussi montré que l'internalisation de MC2R induite par l'ACTH est dynamine-dépendante. Ce résultat était sans surprise parce que l'internalisation de récepteurs par le biais du processus de scission des vésicules de la membrane plasmique et le rôle de la GTPase dynamine est bien établie (Sever *et al.*, 2000), mais n'avait cependant jamais été étudié pour MC2R. L'interférence du sucrose hypertonique avec la clathrine implique la dispersion des triskélions de clathrine sur la membrane plasmique (Hansen *et al.*, 1993). Ce traitement a confirmé que la clathrine est essentielle pour l'internalisation de MC2R dans les cellules 293/FRT. Nos résultats sont donc en accord avec les études précédentes effectuées dans différents types cellulaires et dans lesquelles le mécanisme d'internalisation de MC2R et d'autres MCRs se révélait dépendant de la clathrine (Baig *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2006; Kilianova *et al.*, 2006).

Néanmoins, certains de nos résultats non-publiés (Figure 21; section 3.3.2) suggèrent aussi que MC2R pourrait être compartimenté dans des microdomaines de type caveolae. Il y a quelques années, Clark *et al.* (Clark *et al.*, 2003) ont proposé l'existence de deux populations de MC2R à la surface cellulaire: les récepteurs qui sont compartimentés dans les radeaux lipidiques et ceux qui sont «non protégés», plus enclins à la désensibilisation et à l'internalisation (Clark *et al.*, 2003). En effet, dans l'article de la section 3.3, une partie des MC2R localisés à la surface sont colocalisés avec la cavéoline-1 sans stimulation par l'ACTH, alors qu'une grande partie des récepteurs sont colocalisés avec la clathrine après la stimulation avec l'ACTH. Ces observations sont donc en faveur d'une population de récepteurs compartimentés à la membrane plasmique. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que la voie de l'endocytose médiée par les *caveolae* et celle médiée par la clathrine sont impliquées dans l'internalisation de MC2R. L'hypothèse

émise par Clark *et al.*, ainsi que les résultats ici présents coïncident donc. Un tel mécanisme pourrait également impliquer une relocalisation de MC2R d'un domaine à l'autre lors de la stimulation par l'ACTH.

Les observations par microscopie confocale dans lesquelles MC2R et les isoformes MRAP1 co-internalisent conjointement dans des vésicules intracellulaires représentent un résultat important de l'étude de la section 3.3. Les isoformes MRAP1 sont essentielles pour assurer la fonctionnalité de MC2R dans la plupart, sinon dans la totalité des types de cellules testés à ce jour (Metherell *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007; Sebag and Hinkle, 2007; Chung *et al.*, 2008). Ainsi, si les MRAP1s n'étaient pas recyclées avec MC2R, les récepteurs recyclés ne seraient probablement pas sensibles à l'ACTH et, par conséquent, son recyclage ne serait pas pertinent pour la signalisation de l'ACTH.

Pour les RCPGs qui subissent un processus de recyclage et de resensibilisation après leur internalisation, le rôle des endosomes est essentiel parce qu'il permet au récepteur de voyager à travers de nombreux compartiments acides pour médier leur déphosphorylation, le découplage des arrestines, leur resensibilisation et leur recyclage, ou encore leur dégradation. La spécificité des endosomes est donnée pas les protéines qui y sont associées. Les différents types d'endosomes sont triés dans les cellules à l'aide de Rab GTPases (Mellman, 1996; Seachrist and Ferguson, 2003). Les résultats obtenus dans la section 3.3 pourraient être interprétés comme si le MC2R internalisé subissait à la fois un recyclage rapide (Rab4) et lent (Rab11). En effet, et de façon similaire au β_2 AR et au récepteur de l'hormone de libération de la thyrotropine (TRHR) (Seachrist *et al.*, 2000; Does, 2009; Jones and Hinkle, 2009; Parent *et al.*, 2009; Fridmanis *et al.*, 2010), MC2R colocalise avec les endosomes associés à Rab4, Rab5 et Rab11, et de façon bien moins marquée avec les endosomes de dégradation Rab7. Basé sur les résultats d'internalisation obtenus avec l'ACTH 100 nM en présence ou non d'inhibiteurs de recyclage - brefeldin A (BFA) et monensine - nous avons déterminé qu'environ un tiers des récepteurs internalisés sont réintroduits à la membrane plasmique. L'inhibition médiée par la BFA a été aussi efficace (à 80%) que l'inhibition médiée par la monensine, ce qui suggère qu'une grande proportion des MC2Rs internalisés sont recyclés après un parcours endosomal passant par

l'appareil de Golgi. Surtout, la production d'AMPc par l'ACTH dans les cellules incubées avec la BFA ou la monensine n'est pas soutenue et ainsi les récepteurs qui sont normalement recyclés en absence de ces inhibiteurs sont fonctionnels. De plus, les résultats obtenus avec des concentrations faibles d'ACTH (< 1 nM) ont montré que MC2R n'internalise pas à ces concentrations. La BFA et la monensine n' affectaient pas les niveaux d'expression membranaire de MC2R en absence d'ACTH, et ce, durant 90 min d'incubation constante, excluant ainsi la participation de récepteurs nouvellement synthétisés. À notre connaissance, ces données représentent la première preuve du recyclage de MC2R et de sa resensibilisation après son internalisation (section 3.3.3).

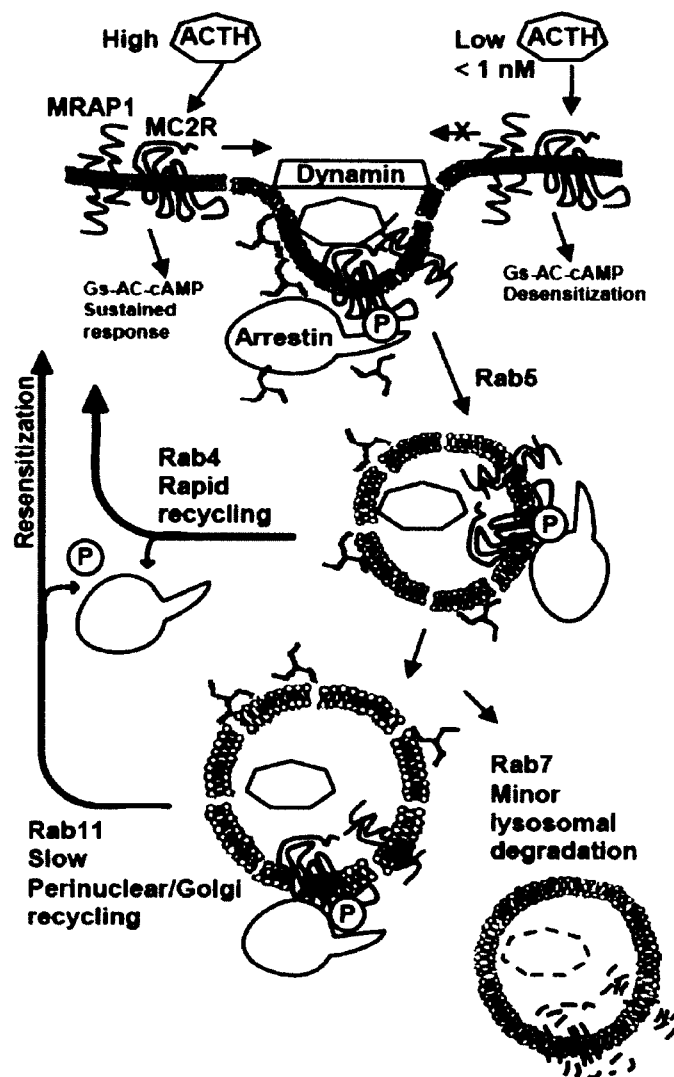


Figure 23. Mécanisme d'internalisation et de recyclage de MC2R proposé.

En résumé de cette première partie de la discussion en lien avec la section 3.3, nous proposons un modèle expliquant l'accumulation accrue d'AMPC induite par l'ACTH grâce aux mécanismes d'internalisation et de recyclage de MC2R. D'après nos travaux, en présence d'une isoforme MRAP1, MC2R est couplé à la production intracellulaire d'AMPC. En présence de faibles concentrations d'ACTH (< 1 nM), MC2R est désensibilisé et la production d'AMPC devient nulle en l'espace de 30 min d'exposition. Une exposition à de fortes concentrations d'ACTH (10 ou 100 nM) entraîne l'internalisation de MC2R dans des puits tapissés de clathrine. Ce mécanisme est dépendant de la dynamine et du recrutement des arrestines. MC2R est ensuite recyclé et resensibilisé de façon plus ou moins rapide. Les récepteurs recyclés sont alors pleinement aptes à répondre à la présence d'ACTH et entraînent ainsi une réponse d'AMPC soutenue (Figure 23).

Comme récemment résumé (Dores, 2009; Fridmanis *et al.*, 2010), MC2R diffère des autres MCRs par son haut niveau d'expression et son phénotype pharmacologique. En dépit des énormes progrès réalisés au cours des cinq dernières années, il y a encore peu d'informations sur les mécanismes moléculaires reliant la structure de MC2R avec ses propriétés fonctionnelles. Comme nous l'avons montré avec QQQQ (Roy *et al.*, 2010a 892), même si T143D et T143S affichent une expression de surface basale réduite (moins de 50% de la WT), les accumulations d'AMPC induites par l'ACTH restent pratiquement intactes, ce qui indique qu'une petite fraction des récepteurs présents à la surface cellulaire est suffisante pour induire une efficacité maximale, comme précédemment observé dans les cellules corticosurréaliennes de rat et humaines (Lefkowitz *et al.*, 1970; Gallo-Payet and Payet, 1989; Gallo-Payet *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 2010a). L'écart de EC₅₀ obtenu avec T143D indique une sensibilité à l'ACTH réduite de 2.5 fois, ce qui physiologiquement se traduit par une légère perte de puissance de l'ACTH envers son récepteur, ce qui s'apparente à la différence de EC₅₀ obtenue avec MRAP α et MRAP β (Roy *et al.*, 2007).

Pour T131D, S140D et S280D, il y avait un écart inexplicé entre leur internalisation et leurs faibles accumulations d'AMPC induites par l'ACTH. Cet écart ne peut être attribué à leur expression de surface initiale inférieure. Une possibilité est que la

mutation introduite (D) imite un état du récepteur constitutivement phosphorylé et désensibilisé. Une autre possibilité est que les mutations introduites ont eu un impact majeur sur la structure MC2R plutôt que de simplement bloquer ou mimer la phosphorylation. Curieusement, plusieurs mutations (T131D, S140D et S280D) tentant de mimer un état de phosphorylation constitutive (avec D) ont bloqué l'internalisation de MC2R.

T131A, T131D, S140D et S280D sont résistants à l'internalisation induite par l'ACTH et sont fortement exprimés à la membrane plasmique. Toutefois, la mutation T131D procure un phénotype hautement désensibilisé (accumulation d'AMPc réduite et $t_{1/2}$ petit). Par conséquent, si T131 est phosphorylé *in vivo*, il pourrait servir à préserver l'expression de MC2R à la surface cellulaire tout en étant désensibilisé. En revanche, le comportement de T131A (qui devrait bloquer la phosphorylation) est en faveur d'un effet structurel de la mutation car il est également déficient pour l'internalisation. Les mutations de T131 interfèrent possiblement avec le motif DRY situé à proximité (127-DRYIT-131), créant possiblement un changement structurel majeur du récepteur (Moore *et al.*, 2002; Yamano *et al.*, 2004). D'autre part, S280D a un effet semblable à T131D (pas d'internalisation) sans impact sur l'accumulation d'AMPc. En outre, des résultats d'internalisation et d'AMPc obtenus avec S280A sont presque identiques au WT, éliminant ainsi un effet sur la structure MC2R.

Quant à eux, S140, T204, T209 et S294 conduisent à des modifications de la réponse à l'ACTH qui seraient compatibles avec un rôle inhibiteur de la phosphorylation dans la fonction MC2R si elle a lieu. Le reste des résidus S/T intracellulaires analysés (S202 et S208) sont considérés comme de moindre importance pour la régulation de MC2R puisque les données expérimentales obtenues avec les mutants A/D ont été plus ou moins sans effet.

L'expression des RCPGs à la membrane plasmique est fondamentale afin qu'ils remplissent leurs fonctions cellulaires dans la transmission du signal provenant de l'espace extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. En soi, la mutation T143A fournit la preuve

qu'un seul acide aminé peut bloquer l'adressage membranaire et la fonction des récepteurs. Selon l'analyse de substitution de T143 en A/D/S/G/K, un acide aminé ayant un groupement hydroxyle ou une charge négative à la position 143 est essentiel pour l'expression de surface et la fonction normale de MC2R en présence de MRAP α ou de MRAP β , plus qu'une charge positive (K), pas de chaîne latérale (G) ou une substitution hydrophobe (A). Contrairement au WT, T143S et T143D semblent dépendre presque exclusivement sur l'expression MRAP1 pour leur adressage vers la membrane plasmique, ce qui augmente le rapport entre les récepteurs fonctionnels (MRAP1-dépendants) comparativement aux récepteurs non-fonctionnels (MRAP1-indépendants) présents à la membrane plasmique. Comme indiqué dans l'introduction des sections 3.2 et 3.3, MRAP2 sert principalement à l'adressage de MC2R vers la membrane plasmique et induit une fonctionnalité très marginale à MC2R même lorsqu'il est surexprimé (Roy *et al.*, 2010a 892). Comme les cellules 293/FRT expriment MRAP2 (Hwang *et al.*, 2010 97; Roy *et al.*, 2010a 892), nous pensons donc que, dans des conditions basales, 50% des récepteurs WT présents à la surface cellulaire sont possiblement sous le contrôle de l'expression endogène de MRAP2 (Roy *et al.*, 2010a 892). Conséquemment, T143S et T143D semblent être internalisés dans une plus grande proportion que le WT. Nos analyses suggèrent donc que l'expression de surface MRAP1-indépendante de MC2R crée l'illusion que l'internalisation du WT est faible (22%) contrairement à l'internalisation de T143S et T143D (33 et 46% respectivement). En effet, une grande proportion de récepteurs WT initialement présents à la surface cellulaire n'internalisent pas malgré la stimulation par l'ACTH. Nous proposons donc l'hypothèse que les récepteurs WT ne peuvent pas lier l'ACTH avec haute affinité puisqu'ils sont sous le contrôle de MRAP2 (Chan *et al.*, 2009; Sebag and Hinkle, 2009; Roy *et al.*, 2010a) et ce, contrairement à T143S, T143D et QQQQ. Toutefois, contrairement à T143S et T143D, la vitesse d'internalisation du mutant QQQQ est presque 5 fois plus lente que pour le WT. Par conséquent la N-glycosylation de MC2R est importante pour la vitesse d'internalisation du récepteur.

J'ouvre une parenthèse ici pour discuter d'une observation qui revient fréquemment avec les mutants QQQQ et T143A/D/S/G/K, soit le fait qu'il semble exister

une expression de surface MRAP1-dépendante (fonctionnelle) et MRAP1-indépendante (non-fonctionnelle) de MC2R (Roy *et al.*, 2010a). J'insiste pour ne pas remplacer l'expression MRAP1-indépendante par MRAP2-dépendante car la surexpression de MRAP2 est capable d'augmenter l'expression de surface de T143S et de QQQQ et ce, même si au départ (sans MRAPs exogènes et incluant MRAP2 endogène) T143S et QQQQ ne sont pas exprimés à la surface des cellules (Figure 22; section 3.3.3). Il existe deux explications possibles: 1) QQQQ et T143/A/D/S/G/K ont une plus faible affinité que le WT pour l'interaction avec MRAP2; 2) les cellules 293/FRT utilisées expriment un cofacteur inconnu qui régule l'expression basale de MC2R indépendamment des MRAP1s et de MRAP2. La seconde hypothèse semble plus plausible car nos tentatives de réprimer l'expression endogène de MRAP2 dans les cellules 293/FRT à l'aide de 5 différents shRNAs se sont avérées inefficaces à réduire l'expression de surface du WT-MC2R (résultats préliminaires non-montrés et non-publiés). Ensuite, la surexpression de MRAP2 engendre une expression de surface pour T143S et de QQQQ similaire à ce que MRAP α et MRAP β induisent. Donc, T143S et QQQQ ne semblent pas être MRAP2-indépendants.

Nos résultats soulèvent une question importante: est-ce que la phosphorylation de MC2R est essentielle pour sa fonctionnalité? Notre scan des S/T en A/D suggère que la phosphorylation de MC2R pourrait être importante pour sa régulation. En bloquant la phosphorylation (avec A), l'expression basale et l'internalisation des récepteurs étaient parfois augmentée ou diminuée. En fait, les mutants S140, T147, T204, T209, S280 et S294 présentent le profil attendu d'un scan A/D (c'est-à-dire que normalement un mutant en A gagne et un mutant D perd de la fonction). De même que pour T143A, le mutant mimant la phosphorylation constitutive de T147 (T147D) constitue une autre preuve que la modification d'un seul acide aminé peut complètement entraver l'adressage membranaire et la fonction du récepteur. Nos résultats suggèrent que, si elle a effectivement lieu, la phosphorylation de T143 est essentielle pour l'adressage membranaire de MC2R, en revanche, la phosphorylation de T147 peut efficacement désactiver la réponse à l'ACTH. Les résidus T143 et T147 sont situés dans un motif de 5 acides aminés situé à l'extrémité carboxy-terminale de la deuxième boucle intracellulaire. T143A et T147D se démarquent de tous les autres mutants S/T examinés dans le sens que

leurs expressions protéiques totales et leurs N-glycosylations sont identiques au WT, mais ils sont très peu exprimés à la membrane plasmique (T143A plus que T147D). Par conséquent, pour ces mutants, l'absence quasi-totale d'accumulation d'AMPC en présence d'ACTH n'est pas surprenante. En effet, en plus de promouvoir la désensibilisation des récepteurs et leur internalisation (Bouvier *et al.*, 1988; Ricks and Trejo, 2009), la phosphorylation peut aussi réguler l'exocytose des RCPGs vers la membrane plasmique (Sanchez-Laorden *et al.*, 2009).

La seconde boucle intracellulaire de MC2R est définie comme suit : 127-DRYITIFHALRYHSIVTMRRT-147 (T143 et T147 sont en caractères gras; un motif PKC est souligné). Un S ou T résidu situé à l'extrémité carboxy-terminale de la deuxième boucle intracellulaire est souvent conservée parmi les RCPGs (Lembo *et al.*, 1997 234), y compris chez tous les MCRs. Ces résidus S/T conservés peuvent servir au couplage des protéines G ou au repliement approprié des RCPGs, comme observé pour d'autres RCPGs (Lembo *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 1998; Kushwaha *et al.*, 2006). Par exemple, le mutant T157A de MC1R (MC1R-T157A) abolit la liaison du NDP-MSH et la signalisation à des niveaux indétectables (Sanchez-Laorden *et al.*, 2007). Fait intéressant, la perte de fonction introduite par la mutation naturelle R146H de MC2R, identifiée chez des patients souffrant de FGD (Slavotinek *et al.*, 1998), se situe à proximité de MC2R-T143 et est liée à une expression de surface et une signalisation inefficace de MC2R (Elias *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2008). De même, la mutation MC1R-R160W, située dans un motif PKC avec MC1R-T157, est associée à une perte de fonction de MC1R, sa rétention dans le réticulum endoplasmique et le phénotype des cheveux roux chez l'homme (Sanchez-Laorden *et al.*, 2009). De plus, le résidu MC1R-T157 est phosphorylé *in vivo* (Sanchez-Laorden *et al.*, 2009). Par conséquent, la perturbation du motif PKC de MC2R (143-TMRR-146) pourrait empêcher la phosphorylation de T143 et l'expression de surface du récepteur. Ces informations suggèrent fortement que la phosphorylation par PKC de MC1R-T157 et de MC2R-T143 (et probablement d'autres thréonines homologues chez les MCRs) est probablement un élément clé de la régulation de l'exocytose des MCRs.

Dans une étude récente, une série de constructions chimériques MC2R/MC4R a permis d'identifier les régions du MC2R responsables de l'expression à la surface cellulaire et la spécificité de liaison avec l'ACTH (Fridmanis *et al.*, 2010). Notre propre recherche sur le répertoire des S/T intracellulaires de MC2R est en accord avec certaines de leurs observations. Ils ont trouvé que le domaine N-terminal extracellulaire de MC2R, et que les troisième et quatrième domaines transmembranaires sont impliqués dans la rétention intracellulaire des MC2R. En effet, nous avons déjà constaté que la N-glycosylation de MC2R dans son extrémité N-terminale est importante pour son expression à la surface cellulaire (Roy *et al.*, 2010a) et dans la section 3.3, T143 et T147, situés dans le segment C-terminal de la deuxième boucle intracellulaire sont donc entre le troisième et le quatrième domaine transmembranaire. T143 et T147 sont aussi à la marge de l'extrémité N-terminale du quatrième domaine transmembranaire, donc T143, T147 et leur phosphorylation (si elle a lieu) peuvent affecter négativement ou positivement la structure de MC2R qui est nécessaire à son expression à la membrane plasmique.

4.5 Activation des MAPKs par l'ACTH

Article non-présenté dans cette thèse.

Roy, S., S. Pinard, L. Chouinard and N. Gallo-Payet. Adrenocorticotropin hormone (ACTH) effects on MAPK phosphorylation in human fasciculata cells and in embryonic kidney 293 cells expressing human melanocortin 2 receptor (MC2R) and MC2R accessory protein (MRAP)beta. Mol Cell Endocrinol (2010).

Comme décrit précédemment dans les cellules corticosurréaliennes Y1 (Le and Schimmer, 2001; Lotfi and Armelin, 2001), les cellules H295R (Janes *et al.*, 2008) et plus récemment dans les cellules ovariennes de hamster chinois transfectées avec MC2R et MRAP souris (Sebag and Hinkle, 2010), nos résultats montrent que l'ACTH induit une augmentation rapide et concentration-dépendante de la phosphorylation de p44/p42^{mapk} et stimule aussi la phosphorylation de p38^{mapk}. Par contre, la phosphorylation de JNK est peu

sollicitée dans les mêmes conditions. Nos résultats indiquent que la phosphorylation de p44/p42^{mapk} induite par l'ACTH est encouragée par un mécanisme qui est indépendant de l'interaction de MC2R avec les arrestines, mais qui est plutôt dépendant de la production d'AMPc induite par ACTH (Figure 24) (Roy *et al.*, 2010b).

Parce que les cellules 293/FRT natives transfectées avec MC2R ou MRAP β séparément n'ont pas permis à l'ACTH d'induire la phosphorylation de p42/p44^{mapk}, nos résultats montrent que l'effet de l'ACTH sur la phosphorylation de p42/p44^{mapk} nécessite un récepteur de l'ACTH fonctionnel à la membrane plasmique, c'est-à-dire MC2R plus MRAP β (ou MRAP α en section 3.2). La combinaison de MC2R avec une des deux isoformes MRAP1 permet à l'ACTH de se lier avec une affinité élevée au récepteur (section 3.1) (Roy *et al.*, 2007).

Un certain nombre d'arguments suggèrent que l'activation de p44/p42^{mapk} par l'ACTH est en partie médiée par des procédés dépendants de l'AMPc, plutôt que par l'internalisation MC2R et son interaction avec les arrestines (section 3.3) (Kilianova *et al.*, 2006). Tout d'abord, ni la surexpression des arrestines de type sauvage, arrestine2, arrestin3 ou de leurs formes dominantes-négatives, arrestine2-DN et arrestin3-DN, n'ont affecté le profil de phosphorylation de p44/p42^{mapk}. Ce résultat suggère fortement que la phosphorylation de p44/p42^{mapk} n'est pas médiée par un échafaudage multiprotéique avec les arrestines lors de l'internalisation de MC2R (section 3.3). Deuxièmement, les drogues utilisées pour inhiber le recyclage et la resensibilisation des récepteurs (section 3.3 ; BFA et monensine) ont permis de réduire la phosphorylation p44/p42^{mapk} et la production d'AMPc induite par l'ACTH. Des résultats similaires ont également été signalés pour des cellules H295R (Janes *et al.*, 2008). En outre, les résultats montrent qu'à elle seule, la forskoline peut induire une légère phosphorylation de p44/p42^{mapk} proportionnelle à l'AMPc qu'elle produit (les 2 sont plus faibles que l'ACTH) (Roy *et al.*, 2010b). De plus, les inhibiteurs de PKA - H89 et PKI (6-22) - diminuent la phosphorylation de p44/p42^{mapk}. Ces résultats suggèrent que l'AMPc participe à l'activation de p44/p42^{mapk} de manière dépendante (totalement ou en partie) de la PKA.

L'AMPC peut aussi stimuler les protéines Epac1/2, qui peuvent à leur tour stimuler la phosphorylation de p44/p42^{mapk}. Cette dernière voie de signalisation a été initialement décrite dans les cellules neuronales (Stork and Schmitt, 2002), mais a également été récemment identifiée dans les cellules corticosurréaliennes (Aumo *et al.*, 2010). Il n'a pas été possible de déterminer la contribution de Epac1/2 puisqu'au moment de l'étude nous ne disposions pas d'inhibiteur spécifique pour bloquer Epac1/2 dans son état inactif. Au total, la stimulation par l'ACTH de la phosphorylation de p44/p42^{mapk} semble donc être liée à la stimulation de la voie AMPC/PKA et possiblement aussi de la voie AMPC/Epac1/2 (Figure 24).

L'accumulation massive de p44/p42^{mapk} phosphorylée observée dans le cytoplasme soutient l'idée que l'activité de p44/p42^{mapk} peut être associée à la différenciation cellulaire et autres fonctions cellulaires, telles que la prolifération, la migration, l'hypertrophie (Houslay and Kolch, 2000; Pouyssegur *et al.*, 2002) ou la biosynthèse des stéroïdes (Poderoso *et al.*, 2008). En effet, nous avons déjà montré que l'activation de p44/p42^{mapk} et de p38^{mapk} par l'Ang II sont nécessaires pour augmenter la synthèse des protéines et l'hypertrophie des cellules glomérulées (Otis *et al.*, 2005). Aussi, la biosynthèse des stéroïdes dans les cellules de Leydig MA10 nécessite la phosphorylation de StAR par p42/p44 et PKA (Poderoso *et al.*, 2008). La petite proportion de p44/p42^{mapk} phosphorylée retrouvée au niveau du noyau peut être associée à une expression accrue des facteurs de transcription nécessaires à la synthèse ou à l'activation des enzymes de la stéroïdogénèse, plutôt que la prolifération cellulaire (Marshall, 1995; Pouyssegur *et al.*, 2002). Cette notion est renforcée par l'observation que l'augmentation transitoire dans le noyau est généralement associée à l'activation, et non pas à l'inhibition de la prolifération (Marshall, 1995; Pouyssegur *et al.* 2002; May *et al.* 2008).

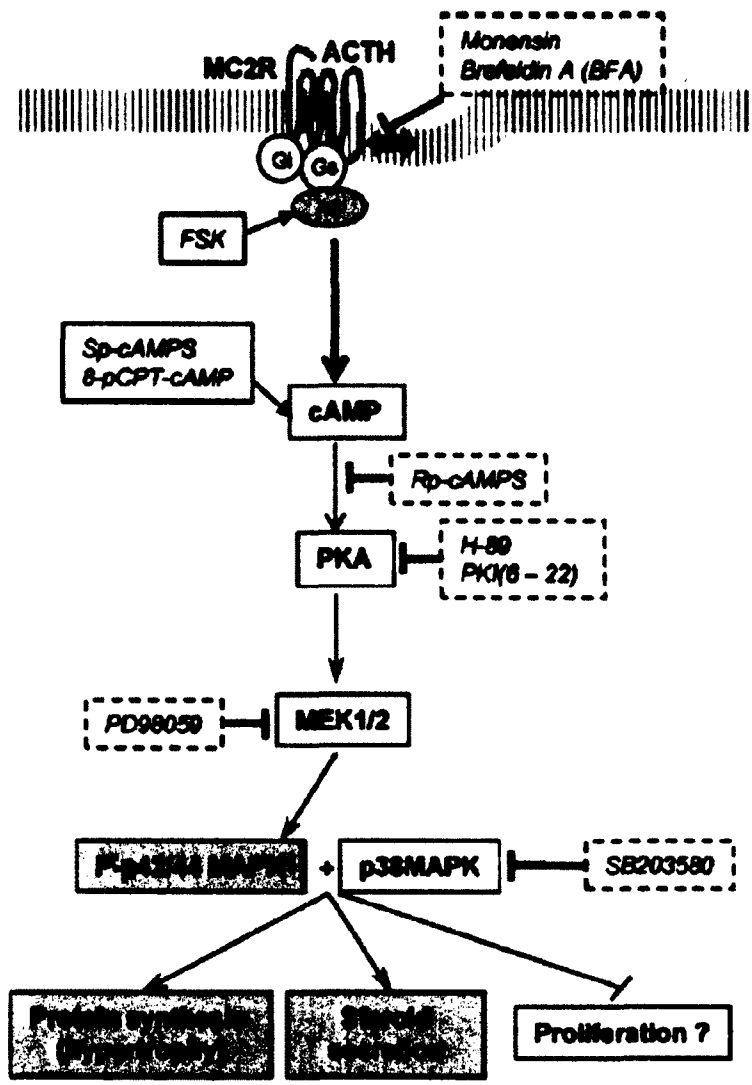


Figure 24. Représentation schématique de la voie potentiellement impliquée dans l'activation de p44/p42^{mapk} par l'ACTH et MC2R. Les outils utilisés pour étudier les différentes voies menant à la phosphorylation des MAPKs : 1) pour l'AMPC-PKA ou les voies AMPC-dépendantes de Epac: la forskoline (FSK), un activateur des ACs; H89, un inhibiteur de la PKA qui est en concurrence avec l'ATP pour le site de liaison situé sur les sous-unités catalytiques de PKA ; PKI (6-22), un inhibiteur spécifique PKA; Rp-cAMPS (adénosine-3 monophosphorothioate -5-cycliques, isomère Rp) qui inhibe de façon compétitive le désassemblage des sous-unités R et C de la PKA par l'AMPC; Sp-cAMPS, un activateur puissant et spécifique de PKA. 2) Pour la voie d'endocytose: monensine et bréfeldine A (BFA) sont des inhibiteurs de recyclage/resensibilisation de MC2R; 3) PD98059 est un inhibiteur de MEK1/2^{mapk}; SP600125 est un inhibiteur de JNK et SB203580 est un inhibiteur de la voie p38^{mapk}.

Enfin, nos résultats montrent que l'ACTH après liaison à son récepteur est plus efficace pour augmenter la phosphorylation de p44/p42^{mapk} et la production d'AMPc que la forskoline ou que les analogues de l'AMPc. Ces observations ne sont pas surprenantes, car il est bien connu que les actions de l'ACTH peuvent résulter d'une variété d'interactions, en particulier avec la matrice extracellulaire, les intégrines et le cytosquelette (Côté *et al.*, 1997; Otis *et al.*, 2007; Sewer and Li, 2008), qui peuvent toutes stimuler la phosphorylation et l'activation de p44/p42^{mapk}. Par ailleurs, la production d'AMPc médiée par l'ACTH se produit possiblement dans les microdomaines sous-membranaires spécifiques et spécialisés (Szaszak *et al.*, 2008) où les activités de l'AMPc, de la PKA et de p44/p42^{mapk} peuvent être augmentées grâce à leur proximité dans ces compartiments. Au contraire, la forskoline et les analogues de l'AMPc ont une action à large spectre sur toute la cellule et sans l'entremise de récepteurs contenus dans des microdomaines comme il pourrait être le cas avec MC2R. Indépendamment des mécanismes en jeu, et malgré le fait que l'ACTH soit connue pour inhiber la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN *in vitro* (Ramachandran and Suyama, 1975; Duperray and Chambaz, 1980), il est également bien établi que l'hypophysectomie diminue le volume de la zone fasciculée (Cater and Stack-Dunne, 1953), tandis que les traitements à l'ACTH augmentent le volume de la ZF du cortex surrénalien (Mazzocchi *et al.*, 1986). Les études sur les animaux indiquant un rôle trophique de l'ACTH ont été corroborées chez l'homme par l'observation que les patients présentant des défauts du récepteur de l'ACTH (MC2R) possèdent des zones fasciculée et réticulée très atrophiées (Clark and Weber, 1998).

Chapitre 5 - Conclusion

L'étude de la régulation fonctionnelle de MC2R avait pour but principal de comprendre l'adaptation de la signalisation de l'ACTH lors de la stimulation du récepteur MC2R. La régulation fonctionnelle de MC2R est importante pour les cellules du cortex surrénalien afin de s'adapter aux stimulations et stress quotidiens. Cet objectif a été atteint dans les articles contenus dans les sections 3.1, 3.2 et 3.3. En second lieu, mes études ont permis d'identifier certains facteurs moléculaires, comme la N-glycosylation de MC2R et certains acides aminés intracellulaires importants, qui expliquent ou pourraient être la cause de certains cas de FGD.

En utilisant le MC2R humain étiqueté en N-terminal avec l'épitope Myc, les constructions des isoformes MRAP1 humaines (MRAP α et MRAP β) étiquetées en N- ou C-terminal avec les épitopes Flag et/ou 6xHis, ainsi que la recombinaison homologue (Flp-In system) dans les cellules HEK293 (lignée cellulaire 293/FRT), nous avons été en mesure de générer des populations isogéniques de cellules exprimant à la fois Myc-MC2R et l'une ou l'autre des isoformes MRAP1 (ROY *et al.*, 2007). Ce modèle est à la base de toutes les études que nous avons effectuées, montrant ainsi son utilité scientifique.

En résumé de l'article de la section 3.1 (Roy *et al.*, 2007), bien que MC2R soit inséré à la membrane plasmique sans l'aide des isoformes MRAP1, les isoformes humaines MRAP α et MRAP β modulent différemment les propriétés fonctionnelles du récepteur de l'ACTH. De plus, une attention particulière doit être prise lors de l'utilisation de fusions C-terminales des MCR, tel le cas de MC2R-GFP. D'un point de vue physiologique, les différences légères mais significatives observées dans les valeurs de EC₅₀ avec MC2R/MRAP α ou MC2R/MRAP β pourraient refléter une régulation indirecte de la stéroïdogénèse dépendante de l'ACTH induite lors de l'adaptation des glandes surrénales à diverses situations ou stimulations hormonales. En effet, la sensibilité du système MC2R/MRAP/effecteurs d'élever les taux d'AMPc en réponse à l'ACTH est une étape critique dans l'initiation de la stéroïdogénèse par les cellules des glandes surrénales

(Gallo-Payet and Payet, 2003). Les combinaisons MC2R/MRAP α et MC2R/MRAP β pourraient réguler la stéroïdogénèse de façons différentes pour les concentrations physiologiques d'ACTH faibles (pM) et élevées (nM), tel que dans diverses situations de stress ou pathologiques (Dallman *et al.*, 2004).

La nécessité absolue de MRAP pour la liaison de l'ACTH aux cellules mérite, selon moi, une modification de la définition du terme «récepteur de l'ACTH», qui devrait alors comprendre MC2R et au moins une MRAP1 fonctionnelle. Par contre il n'est pas connu si les MRAP1s jouent un rôle de co-récepteur.

Une des principales conclusions de ma deuxième étude (Roy *et al.*, 2010a) est que la N-glycosylation de MC2R est essentielle pour l'expression de surface de MC2R en absence des isoformes MRAP1. Les résultats présentés indiquent que MC2R est N-glycosylé dans les cellules 293/FRT et ce, sans l'expression exogène des isoformes MRAP1. En présence de MRAP2 endogène, lorsque MC2R est N-glycosylé, il peut être exprimé à la membrane plasmique sans assistance exogène des isoformes MRAP1 dans les cellules 293/FRT. MC2R est N-glycosylé au niveau de ses deux sites putatifs par un processus impliquant une glycosylation de base (glycans immatures de 4 kDa sur chaque site de glycosylation) et une glycosylation terminale (addition de 25-40 kDa de sucres matures sur MC2R natif de 25 kDa). Une fois à la membrane plasmique, la N-glycosylation de MC2R, bien qu'elle ne soit pas une exigence absolue, augmente légèrement la puissance de l'ACTH à stimuler la production d'AMPc.

Les résultats de l'analyse de la N-glycosylation de MC2R (Roy *et al.*, 2010a) montrent que, dans les cellules 293/FRT, MC2R est N-glycosylé sur ses deux sites de N-glycosylation putatifs situés dans son domaine extracellulaire N-terminal. Bien que la N-glycosylation de MC2R ne soit pas indispensable pour la production d'AMPc, la forme non-glycosylée de MC2R présente une sensibilité réduite pour le couplage à la production d'AMPc. La N-glycosylation sur le site Asn17-Asn18-Ser19 semble être plus importante. Les résultats suggèrent également que seule une faible proportion des récepteurs est

nécessaire pour la transduction du signal ACTH. Notre étude est la première à examiner le rôle ainsi que de confirmer les sites de N-glycosylation de MC2R à l'aide d'un modèle entièrement humain (Roy *et al.*, 2007), offrant ainsi une connaissance approfondie de la structure et de la fonction de MC2R.

Les résultats de la section 3.2 apportent des données nouvelles sur les fonctions de MC2R et de MRAP en montrant que les différents domaines C-terminaux de MRAP1s ont des impacts sur la localisation subcellulaire des MRAP1s, leur topologie et la signalisation de l'ACTH. En contraste avec le domaine N-terminal, les domaines C-terminaux des MRAP1s sont espèce- et isoforme- spécifiques et totalement différents. Les MRAPs pourraient être impliqués dans des rôles différents de celui de la régulation de la signalisation de l'ACTH comme dans d'autres processus cellulaires, la sensibilité aux polluants (Hwang *et al.*, 2010), la formation osseuse (Isales *et al.*, 2010) et la signalisation de l'insuline au cours de la différenciation adipocytaire (Xu *et al.*, 2002).

L'étude présentée en section 3.3 apporte la preuve que, après sa liaison avec l'ACTH, MC2R est soumis à un processus d'internalisation et de recyclage. Le recyclage et la resensibilisation de MC2R révèle un mode de régulation de MC2R qui est rapide et efficace, qui se produit sans l'intervention de récepteurs ou de protéines accessoires nouvellement synthétisés. Cette propriété est possiblement importante afin d'assurer des niveaux adéquats en glucocorticoïdes dans le sang, car ceux-ci sont nécessaires au maintien de l'homéostasie métabolique (Roberge *et al.*, 2007) ou essentielles pour faire face à certaines affections dans lesquelles les glucocorticoïdes jouent un rôle important (Gallo-Payet *et al.*, 2008). De plus, les analyses d'expression de surface de MC2R, la production d'AMPC et l'internalisation des mutants S/T intracellulaire mutés en A/D ont permis d'identifier des acides aminés importants pour l'expression et la régulation fonctionnelle de MC2R. En particulier, T143 est un facteur déterminant de la fonction du récepteur. Ainsi, la phosphorylation de MC2R sur certains de ses résidus S/T intracellulaires peut promouvoir son trafic vers la membrane plasmique et sa fonction en plus d'être impliqués dans sa désensibilisation et dans son internalisation.

Nos résultats sur l'activation de MAPKs par l'ACTH (Roy *et al.*, 2010b) (Figure 24) indiquent que dans les cellules 293/FRT/Myc-MC2R/MRAP β -Flag, ainsi que dans les cellules fasciculées humaines, l'ACTH stimule la phosphorylation de p44/p42^{mapk} et que les effecteurs en aval de l'AMPc, la PKA et possiblement Epac1/2 sont impliqués dans cette activation. En outre, les drogues qui inhibent le trafic endosomal et le recyclage/resensibilisation de MC2R atténuent la production d'AMPc et la phosphorylation de p44/p42^{mapk}, ce qui suggère une corrélation entre ces deux phénomènes : la phosphorylation de p44/p42^{mapk} semble proportionnelle à la production d'AMPc mais pas à sa concentration/accumulation intracellulaire. Ainsi, tous les mécanismes susceptibles de moduler les taux d'AMPc sont également susceptibles de moduler l'activation et la fonction de p44/p42^{mapk}. C'est peut-être pourquoi l'absence de MC2R, les mutations dans MC2R (Clark and Weber, 1998) ou l'absence des marqueurs clés de la zone glomérulée (Lee *et al.*, 2005) ou de la zone fasciculée (Mullins *et al.*, 2009) affecte non seulement la stéroïdogénèse, mais aussi l'organisation structurale de la glande.

Pour conclure, les différences légères mais significatives observées dans les valeurs de EC₅₀ pour la production d'AMPs avec MC2R/MRAP α ou MC2R/MRAP β pourraient refléter une régulation indirecte de la stéroïdogénèse dépendante de l'ACTH induite lors de l'adaptation des glandes surrénales à diverses situations ou stimulations hormonales. Aussi, la N-glycosylation n'est pas essentielle à la fonction de MC2R. Finalement, la succession des événements de régulation de MC2R comme son internalisation, son recyclage et sa resensibilisation révèle un mode de régulation positive de MC2R qui est rapide et efficace qui permet l'accumulation accrue d'AMPc dans les cellules et probablement une stéroïdogénèse soutenue dans le cortex surrénalien.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Nicole Gallo-Payet, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et sans qui ce projet n'aurait pas été possible. Grâce à vous, j'ai cheminé à travers le projet et je suis sur le point de réussir ce long parcours qu'est le doctorat. Votre tolérance et votre soutien dans mes choix m'ont souvent été d'un grand secours. Merci de m'avoir aidé à centraliser mes idées et à éviter mes dispersions, conséquences directes de mon engouement et de ma motivation envers ce projet. Merci aux membres du jury de bien vouloir évaluer ma thèse et sa soutenance. Je remercie spécialement Dr Zuzana Kilianova et Dr Mohamed Rached pour les discussions enrichissantes, pour m'avoir appris certaines des techniques usuelles du laboratoire en plus de m'initier à la biologie moléculaire. Personnellement, je crois aussi mériter une certaine forme de reconnaissance pour avoir fourni les efforts essentiels à la réalisation de ce projet et pour avoir pris plusieurs initiatives originales et souvent nécessaires. À l'instar des intérêts de ma directrice de recherche, l'initiative de cloner les MRAPs était la plus impérative (sans lesquelles le projet original dans les cellules M3 n'allait nulle part). J'ai aussi instauré des nouvelles techniques au laboratoire et ai recruté moi-même trois stagiaires, montrant ainsi ma vision, ma motivation et mon désir de transférer mes connaissances. Ces étudiants (maintenant gradués) ont obtenu une formation hors pair et chacun est maintenant associé à au moins une publication et ont un emploi à temps plein aujourd'hui. Je remercie beaucoup l'équipe du laboratoire qui m'a apporté un soutien technique et moral tout au long de ces dernières années. Merci aux Drs Marcel Daniel Payet, Marie-Odile Guimond et Marie-Claude Battista, à Lucie Chouinard, Claude Roberge, Michaël Shum, Mélissa Otis, et mes stagiaires, Louis-Daniel Taillefer, Benoît Perron et Sandra Pinard. Merci à nos collaborateurs externes et internes (Drs Alex N. Eberle, Viktor Steimle, Jose Miguel Cerdà-Reverter, Jose Carlos Garcia-Borron, Jean-Luc Parent, Michel Grandbois et Richard Leduc). Merci aussi aux Drs Patricia Hinkle, Adrian J. Clark et particulièrement au Dr Julien Sebag pour les discussions intéressantes partagées en congrès.

Références

1. Abdel-Malek, Z. A. (2001). Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 3. 58. 434-441
2. Aguilera, G. (1993). Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1-3. 45. 147-151
3. Aguilera, G. and K. Catt (1983). Regulation of aldosterone secretion during altered sodium intake. *J Steroid Biochem.* 1B. 19. 525-530.
4. Aguilera, G., S. L. Lightman and A. Kiss (1993). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during water deprivation. *Endocrinology.* 1. 132. 241-248
5. Agulleiro, M. J., S. Roy, E. Sanchez, S. Puchol, N. Gallo-Payet and J. M. Cerda-Reverter (2010). Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol.* 1-2. 320. 145-152
6. Alangari, A. A. (2010). Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med.* 3. 5. 133-139
7. Arora, K. K., Z. Cheng and K. J. Catt (1997). Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. *Mol Endocrinol.* 9. 11. 1203-1212
8. Attramadal, H., J. L. Arriza, C. Aoki, T. M. Dawson, J. Codina, M. M. Kwatra, S. H. Snyder, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem.* 25. 267. 17882-17890
9. Aumo, L., M. Rusten, G. Mellgren, M. Bakke and A. E. Lewis (2010). Functional roles of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) 2 (EPAC2) in cAMP-mediated actions in adrenocortical cells. *Endocrinology.* 5. 151. 2151-2161
10. Baig, A. H., F. M. Swords, L. A. Noon, P. J. King, L. Hunyady and A. J. Clark (2001). Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. *J Biol Chem.* 48. 276. 44792-44797
11. Baig, A. H., F. M. Swords, M. Szaszak, P. J. King, L. Hunyady and A. J. Clark (2002). Agonist activated adrenocorticotropin receptor internalizes via a clathrin-mediated G protein receptor kinase dependent mechanism. *Endocr Res.* 4. 28. 281-289

12. Barnes, W. G., E. Reiter, J. D. Violin, X. R. Ren, G. Milligan and R. J. Lefkowitz (2005). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem.* 9. 280. 8041-8050
13. Beetz, C., R. Schule, T. Deconinck, K. N. Tran-Viet, H. Zhu, B. P. Kremer, S. G. Frints, W. A. van Zelst-Stams, P. Byrne, S. Otto, A. O. Nygren, J. Baets, K. Smets, B. Ceulemans, B. Dan, N. Nagan, J. Kassubek, S. Klimpe, T. Klopstock, H. Stolze, H. J. Smeets, C. T. Schrandt-Stumpel, M. Hutchinson, B. P. van de Warrenburg, C. Braastad, T. Deufel, M. Pericak-Vance, L. Schols, P. de Jonghe and S. Zuchner (2008). REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain. Pt 4.* 131. 1078-1086
14. Bégeot, M. and J. Saez. in *The melanocortin receptors* (ed. R. Cone) 75-109 (Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 2000).
15. Behrens, M., J. Bartelt, C. Reichling, M. Winnig, C. Kuhn and W. Meyerhof (2006). Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem.* 29. 281. 20650-20659
16. Beuschlein, F., M. Fassnacht, A. Klink, B. Allolio and M. Reincke (2001). ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol.* 3. 144. 199-206
17. Blondet, A., M. Doghman, M. Rached, P. Durand, M. Begeot and D. Naville (2004). Characterization of cell lines stably expressing human normal or mutated EGFP-tagged MC4R. *J Biochem (Tokyo).* 4. 135. 541-546
18. Bomberger, J. M., N. Parameswaran, C. S. Hall, N. Aiyar and W. S. Spielman (2005a). Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem.* 10. 280. 9297-9307
19. Bomberger, J. M., W. S. Spielman, C. S. Hall, E. J. Weinman and N. Parameswaran (2005b). Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J Biol Chem.* 25. 280. 23926-23935
20. Bornstein, S. R. and M. Ehrhart-Bornstein (1992). Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. *Endocrinology.* 6. 131. 3126-3128
21. Bornstein, S. R. and M. Ehrhart-Bornstein (2000). Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol.* 59 Suppl 2. II/12-17
22. Bornstein, S. R., M. Ehrhart-Bornstein and W. A. Scherbaum (1996). The adrenal gland and ACTH. *Eur J Endocrinol.* 6. 135. 739

23. Bornstein, S. R. and H. Rutkowski (2002). The adrenal hormone metabolism in the immune/inflammatory reaction. *Endocr Res.* 4. 28. 719-728
24. Boston, B. A. (1999). The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci.* 885. 75-84
25. Bouvier, M., W. P. Hausdorff, A. De Blasi, B. F. O'Dowd, B. K. Kobilka, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature.* 6171. 333. 370-373
26. Bresson, J. L., M. C. Clavequin, D. Fellmann and C. Bugnon (1985). Anatomical and ontogenetic studies of the human paraventriculo-infundibular corticoliberin system. *Neuroscience.* 4. 14. 1077-1090
27. Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler and D. E. Wakeham (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17. 517-568
28. Buck, T. M. and W. R. Skach (2005). Differential stability of biogenesis intermediates reveals a common pathway for aquaporin-1 topological maturation. *J Biol Chem.* 1. 280. 261-269
29. Buckley, D. I., J. Hagman and J. Ramachandran (1981). A sensitive radioimmunoassay for corticotropin using a fully biologically active ¹²⁵I-labeled ligand. *Endocrinology.* 1. 109. 10-16
30. Butler, A. A. (2006). The melanocortin system and energy balance. *Peptides.* 2. 27. 281-290
31. Butler, A. A. and R. D. Cone (2002). The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides.* 2-3. 36. 77-84
32. Cai, M., E. V. Varga, M. Stankova, A. Mayorov, J. W. Perry, H. I. Yamamura, D. Trivedi and V. J. Hruby (2006). Cell signaling and trafficking of human melanocortin receptors in real time using two-photon fluorescence and confocal laser microscopy: differentiation of agonists and antagonists. *Chem Biol Drug Des.* 4. 68. 183-193
33. Cammas, F. M., S. Kapas, S. Barker and A. J. Clark (1995). Cloning, characterization and expression of a functional mouse ACTH receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 3. 212. 912-918
34. Castermans, D., J. R. Vermeesch, J. P. Fryns, J. G. Steyaert, W. J. Van de Ven, J. W. Creemers and K. Devriendt (2007). Identification and characterization of the TRIP8 and REEP3 genes on chromosome 10q21.3 as novel candidate genes for autism. *Eur J Hum Genet.* 4. 15. 422-431

35. Cater, D. B. and J. D. Lever (1954). The zona intermedia of the adrenal cortex; a correlation of possible functional significance with development, morphology and histochemistry. *J Anat.* 4. 88. 437-454
36. Cater, D. B. and M. P. Stack-Dunne (1953). The histological changes in the adrenal of the hypophysectomised rat after treatment with pituitary preparations. *J Pathol Bacteriol.* 1. 66. 119-133
37. Celio, M. R., A. Pasi, E. Burgisser, G. Buetti, V. Holtt and C. Gramsch (1980). 'Proopiomelanocortin fragments' in normal human adult pituitary. Distribution and ultrastructural characterization of immunoreactive cells. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1. 95. 27-40
38. Chai, B. X., R. R. Neubig, G. L. Millhauser, D. A. Thompson, P. J. Jackson, G. S. Barsh, C. J. Dickinson, J. Y. Li, Y. M. Lai and I. Gantz (2003). Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides.* 4. 24. 603-609
39. Chaki, S. and S. Okuyama (2005). Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides.* 10. 26. 1952-1964
40. Chan, L. F., A. J. Clark and L. A. Metherell (2008). Familial glucocorticoid deficiency: advances in the molecular understanding of ACTH action. *Horm Res.* 2. 69. 75-82
41. Chan, L. F., T. R. Webb, T. T. Chung, E. Meimaridou, S. N. Cooray, L. Guasti, J. P. Chapple, M. Egertova, M. R. Elphick, M. E. Cheetham, L. A. Metherell and A. J. Clark (2009). MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. 106. 6146-6151
42. Cheitlin, R., D. I. Buckley and J. Ramachandran (1985). The role of extracellular calcium in corticotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem.* 9. 260. 5323-5327
43. Cherradi, N., M. F. Rossier, M. B. Vallotton, R. Timberg, I. Friedberg, J. Orly, X. J. Wang, D. M. Stocco and A. M. Capponi (1997). Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem.* 12. 272. 7899-7907
44. Chhajlani, V. and J. E. Wikberg (1992). Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 3. 309. 417-420.
45. Chida, D., S. Nakagawa, S. Nagai, H. Sagara, H. Katsumata, T. Imaki, H. Suzuki, F. Mitani, T. Ogishima, C. Shimizu, H. Kotaki, S. Kakuta, K. Sudo, T. Koike, M. Kubo and Y. Iwakura (2007). Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 46. 104. 18205-18210

46. Chini, B. and M. Parenti (2004). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol.* 2. 32. 325-338
47. Chorvátová, A., L. Gendron, L. Bilodeau, N. Gallo-Payet and M. Payet (2000). A Ras-dependent chloride current activated by adrenocorticotropin (ACTH) in rat adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology.* 141. 684-692
48. Christopoulos, A., G. Christopoulos, M. Morfis, M. Udawela, M. Laburthe, A. Couvineau, K. Kuwasako, N. Tilakaratne and P. M. Sexton (2003). Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem.* 5. 278. 3293-3297
49. Christopoulos, G., K. J. Perry, M. Morfis, N. Tilakaratne, Y. Gao, N. J. Fraser, M. J. Main, S. M. Foord and P. M. Sexton (1999). Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol.* 1. 56. 235-242
50. Chrousos, G. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci.* 851. 311-335
51. Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama.* 9. 267. 1244-1252
52. Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1998). A healthy body in a healthy mind--and vice versa--the damaging power of "uncontrollable" stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 6. 83. 1842-1845
53. Chrousos, G. P., D. J. Torpy and P. W. Gold (1998). Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 3. 129. 229-240
54. Chung, T. T., T. R. Webb, L. F. Chan, S. N. Cooray, L. A. Metherell, P. J. King, J. P. Chapple and A. J. Clark (2008). The majority of adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) mutations found in familial glucocorticoid deficiency type 1 lead to defective trafficking of the receptor to the cell surface. *J Clin Endocrinol Metab.* 12. 93. 4948-4954
55. Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 2. 66. 61-79
56. Clark, A. in *The melanocortin receptors* (ed. R. Cone) 361-385 (Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 2000a).
57. Clark, A. in *The melanocortin receptors* (ed. R. Cone) 361-385 (Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 2000b).

58. Clark, A. J., A. H. Baig, L. Noon, F. M. Swords, L. Hunyady and P. J. King (2003). Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). *Ann N Y Acad Sci.* 994. 111-117
59. Clark, A. J. and F. M. Cammas (1996). The ACTH receptor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1. 10. 29-47
60. Clark, A. J., L. F. Chan, T. T. Chung and L. A. Metherell (2009). The genetics of familial glucocorticoid deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2. 23. 159-165
61. Clark, A. J., L. A. Metherell, M. E. Cheetham and A. Huebner (2005). Inherited ACTH insensitivity illuminates the mechanisms of ACTH action. *Trends Endocrinol Metab.*
62. Clark, A. J. and A. Weber (1998). Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr Rev.* 6. 19. 828-843
63. Clark, B. J., J. Wells, S. R. King and D. M. Stocco (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem.* 45. 269. 28314-28322
64. Coghlan, V. M., B. A. Perrino, M. Howard, L. K. Langeberg, J. B. Hicks, W. M. Gallatin and J. D. Scott (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science.* 5194. 267. 108-111
65. Cone, R. D. (1999). The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 6. 10. 211-216
66. Cone, R. D. *The melanocortin receptors* (Humana Press Inc., Totowa, 2000)
67. Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D. I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton and R. A. Kesterson (1996). The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res.* 51. 287-317; discussion 318
68. Cong, M., S. J. Perry, F. T. Lin, I. D. Fraser, L. A. Hu, W. Chen, J. A. Pitcher, J. D. Scott and R. J. Lefkowitz (2001). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem.* 18. 276. 15192-15199
69. Conner, A. C., J. Simms, S. G. Howitt, M. Wheatley and D. R. Poyner (2006). The second intracellular loop of the calcitonin gene-related peptide receptor provides molecular determinants for signal transduction and cell surface expression. *J Biol Chem.* 3. 281. 1644-1651

70. Conrad, C. D. and H. A. Bimonte-Nelson (2010). Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes on trajectory of age-related cognitive decline. *Prog Brain Res.* 182. 31-76
71. Cooray, S. N., I. Almiro Do Vale, K. Y. Leung, T. R. Webb, J. P. Chapple, M. Egertova, M. E. Cheetham, M. R. Elphick and A. J. Clark (2008). The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse y1 cell line. *Endocrinology.* 4. 149. 1935-1941
72. Cooray, S. N. and A. J. Clark (2010). Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol.* in press
73. Côté, M., G. Guillon, M. Payet and N. Gallo-Payet (2001). Expression and regulation of adenylyl cyclase isoforms in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 9. 86. 4495-4503
74. Côté, M., M.-D. Payet and N. Gallo-Payet (1997). Association of alpha S-subunit of the GS protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 138. 69-78
75. Côte, M., M. Payet, E. Rousseau, G. Guillon and N. Gallo-Payet (1999). Comparative involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclase on adrenocorticotropin-induced increase of cyclic adenosine monophosphate in rat and human glomerulosa cells. *Endocrinology.* 140. 3594-3601
76. Cozza, E. N., M. C. Vila, M. Acevedo-Duncan, R. V. Farese and C. E. Gomez-Sanchez (1990). Treatment of primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells with adrenocorticotropin (ACTH) and phorbol esters: a comparative study of the effects on aldosterone production and ACTH signaling system. *Endocrinology.* 4. 126. 2169-2176
77. Craft, C. M. and D. H. Whitmore (1995). The arrestin superfamily: cone arrestins are a fourth family. *FEBS Lett.* 2. 362. 247-255
78. Craft, C. M., D. H. Whitmore and A. F. Wiechmann (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem.* 6. 269. 4613-4619
79. Dale, L. B., J. L. Seachrist, A. V. Babwah and S. S. Ferguson (2004). Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *J Biol Chem.* 13. 279. 13110-13118
80. Dallman, M. F., S. F. Akana, L. Jacobson, N. Levin, C. S. Cascio and J. Shinsako (1987). Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 512. 402-414

81. Dallman, M. F., S. E. la Fleur, N. C. Pecoraro, F. Gomez, H. Houshyar and S. F. Akana (2004). Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*. 6. 145. 2633-2638
82. Dallman, M. F., N. Pecoraro, S. F. Akana, S. E. La Fleur, F. Gomez, H. Houshyar, M. E. Bell, S. Bhatnagar, K. D. Laugero and S. Manalo (2003). Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. 100. 11696-11701
83. Dallman, M. F., N. C. Pecoraro and S. E. la Fleur (2005). Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun*. 4. 19. 275-280
84. Dawson, D. V. (2010). Variants in the melanocortin-1 receptor (MC1R) gene appear to be associated with increased dental care-related anxiety, increased fear of dental pain, and greater likelihood of dental care avoidance. *J Evid Based Dent Pract*. 3. 10. 169-171
85. DeBold, C. R., W. R. Sheldon, G. S. DeCherney, R. V. Jackson, A. N. Alexander, W. Vale, J. Rivier and D. N. Orth (1984). Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor. *J Clin Invest*. 2. 73. 533-538
86. Decaillot, F. M., R. Rozenfeld, A. Gupta and L. A. Devi (2008). Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 41. 105. 16045-16050
87. Delaney, A., M. Keighren, S. M. Fleetwood-Walker and I. J. Jackson (2010). Involvement of the melanocortin-1 receptor in acute pain and pain of inflammatory but not neuropathic origin. *PLoS One*. 9. 5. e12498
88. Ding, Y. X., L. P. Zou, B. He, W. H. Yue, Z. L. Liu and D. Zhang (2010). ACTH receptor (MC2R) promoter variants associated with infantile spasms modulate MC2R expression and responsiveness to ACTH. *Pharmacogenet Genomics*. 2. 20. 71-76
89. Dluhy, R. G., M. Greenfield and G. H. Williams (1977). Effect of simultaneous potassium and saline loading on plasma aldosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1. 45. 141-146
90. Dohke, Y. and R. J. Turner (2002). Evidence that the transmembrane biogenesis of aquaporin 1 is cotranslational in intact mammalian cells. *J Biol Chem*. 17. 277. 15215-15219
91. Does, R. M. (2009). Adrenocorticotropic hormone, melanocyte-stimulating hormone, and the melanocortin receptors: revisiting the work of Robert Schwyzer: a thirty-year retrospective. *Ann N Y Acad Sci*. 1163. 93-100

92. Doufexis, M., H. L. Storr, P. J. King and A. J. Clark (2007). Interaction of the melanocortin 2 receptor with nucleoporin 50: evidence for a novel pathway between a G-protein-coupled receptor and the nucleus. *FASEB J.* 14. 21. 4095-40100
93. DuBois, R. N., E. R. Simpson, R. E. Kramer and M. R. Waterman (1981). Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 by adrenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 13. 256. 7000-7005
94. Duperray, A. and E. M. Chambaz (1980). Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture. *J Steroid Biochem.* 11. 13. 1359-1364
95. Durroux, T., N. Gallo-Payet and M. Payet (1991). Effects of adrenocorticotropin on action potential and calcium currents in cultured rat and bovine glomerulosa cells. *Endocrinology.* 129. 2139-2147
96. Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum and G. P. Vinson (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev.* 2. 19. 101-143
97. Elias, L. L., A. Huebner, G. D. Pullinger, A. Mirtella and A. J. Clark (1999). Functional characterization of naturally occurring mutations of the human adrenocorticotropin receptor: poor correlation of phenotype and genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 8. 84. 2766-2770
98. Fakunding, J. L., R. Chow and K. J. Catt (1979). The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotropin, angiotensin II, and potassium in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology.* 2. 105. 327-333
99. Farese, R. V., N. Rosic, J. Babischkin, M. G. Farese, R. Foster and J. S. Davis (1986). Dual activation of the inositol-triphosphate-calcium and cyclic nucleotide intracellular signaling systems by adrenocorticotropin in rat adrenal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 3. 135. 742-748
100. Feng, Y., P. G. Rhodes, H. Liu and A. J. Bhatt (2009). Dexamethasone induces neurodegeneration but also up-regulates vascular endothelial growth factor A in neonatal rat brains. *Neuroscience.* 2. 158. 823-832
101. Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 1. 53. 1-24
102. Ferguson, S. S., J. Zhang, L. S. Barak and M. G. Caron (1998a). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.* 17-18. 62. 1561-1565

103. Ferguson, S. S., J. Zhang, L. S. Barak and M. G. Caron (1998b). Role of beta-arrestins in the intracellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Adv Pharmacol.* 42. 420-424
104. Ferraz-de-Souza, B. and J. C. Achermann (2008). Disorders of adrenal development. *Endocr Dev.* 13. 19-32
105. Fridmanis, D., R. Petrovska, I. Kalnina, M. Slaidina, R. Peculis, H. B. Schioth and J. Klovins (2010). Identification of domains responsible for specific membrane transport and ligand specificity of the ACTH receptor (MC2R). *Mol Cell Endocrinol.* 2. 321. 175-183
106. Fukushima, Y., Y. Oka, T. Saitoh, H. Katagiri, T. Asano, N. Matsushashi, K. Takata, E. van Breda, Y. Yazaki and K. Sugano (1995). Structural and functional analysis of the canine histamine H2 receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. *Biochem J.* 310 (Pt 2). 553-558
107. Funkenstein, B., J. L. McCarthy, K. M. Dus, E. R. Simpson and M. R. Waterman (1983). Effect of adrenocorticotropin on steroid 21-hydroxylase synthesis and activity in cultured bovine adrenocortical cells. Increased synthesis in the absence of increased activity. *J Biol Chem.* 15. 258. 9398-9405
108. Gaborik, Z. and L. Hunyady (2004). Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 6. 15. 286-293
109. Gaillard, I., M. Keramidas, P. Liakos, I. Vilgrain, A. I. Kahri and D. Vittet (2000). ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature. *J Cell Physiol.* 2. 185. 226-234
110. Galandrin, S. and M. Bouvier (2006). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol.* 5. 70. 1575-1584
111. Galandrin, S., G. Oligny-Longpre, H. Bonin, K. Ogawa, C. Gales and M. Bouvier (2008). Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* 1. 74. 162-172
112. Gallo-Payet, N., M. Cote, A. Chorvatova, G. Guillon and M. D. Payet (1999). Cyclic AMP-independent effects of ACTH on glomerulosa cells of the rat adrenal cortex. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1-6. 69. 335-342
113. Gallo-Payet, N. and E. Escher (1985). Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 1. 117. 38-46

114. Gallo-Payet, N., E. Grazzini, M. Cote, L. Chouinard, A. Chorvatova, L. Bilodeau, M. D. Payet and G. Guillon (1996). Role of Ca²⁺ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Invest.* 2. 98. 460-466
115. Gallo-Payet, N. and M. D. Payet (1989). Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J Endocrinol.* 120. 409-421
116. Gallo-Payet, N. and M. D. Payet (2003). Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech.* 3. 61. 275-287
117. Gallo-Payet, N., P. Pothier and H. Isler (1987). On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol.* 6. 65. 588-592
118. Gallo-Payet, N., J.-F. Roussy, F. Chagnon, C. Roberge and O. Lesur (2008). Hypothalamic/ pituitary axis and MODS in critical illness: a special focus on Arginine-Vasopressin (AVP) and Apelin (APL). *J. Organ Disfunction.* 4. 216-229
119. Gantz, I. and T. M. Fong (2003). The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 3. 284. E468-474
120. Gantz, I., T. Tashiro, C. Barcroft, Y. Konda, Y. Shimoto, H. Miwa, T. Glover, G. Munzert and T. Yamada (1993). Localization of the genes encoding the melanocortin-2 (adrenocorticotropin hormone) and melanocortin-3 receptors to chromosomes 18p11.2 and 20q13.2-q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1. 18. 166-167
121. Gao, T., A. Yatani, M. L. Dell'Acqua, H. Sako, S. A. Green, N. Dascal, J. D. Scott and M. M. Hosey (1997). cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron.* 1. 19. 185-196
122. Garcia-Borron, J. C., B. L. Sanchez-Laorden and C. Jimenez-Cervantes (2005). Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 6. 18. 393-410
123. Gifford, C. A., A. M. Assiri, M. C. Satterfield, T. E. Spencer and T. L. Ott (2008). Receptor Transporter Protein 4 (RTP4) in Endometrium, Ovary, and Peripheral Blood Leukocytes of Pregnant and Cyclic Ewes. *Biol Reprod.* 3. 79. 518-524
124. Goder, V. and M. Spiess (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 3. 504. 87-93
125. Goder, V. and M. Spiess (2003). Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *Embo J.* 14. 22. 3645-3653

126. Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*. 6599. 383. 447-450
127. Grazzini, E., G. Boccara, D. Joubert, M. Trueba, T. Durroux, G. Guillon, N. Gallo-Payet, L. Chouinard, M. D. Payet and C. Serradeil Le Gal (1998). Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol*. 449. 325-334
128. Grose, R., S. Werner, D. Kessler, J. Tuckermann, K. Huggel, S. Durka and H. M. Reichardt (2002). A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. *EMBO Rep*. 6. 3. 575-582
129. Groussin, L., L. S. Kirschner, C. Vincent-Dejean, K. Perlemoine, E. Jullian, B. Delemer, S. Zacharieva, D. Pignatelli, J. A. Carney, J. P. Luton, X. Bertagna, C. A. Stratakis and J. Bertherat (2002). Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet*. 6. 71. 1433-1442
130. Guillon, G., M. Trueba, D. Joubert, E. Grazzini, L. Chouinard, M. Cote, M. D. Payet, O. Manzoni, C. Barberis, M. Robert and et al. (1995). Vasopressin stimulates steroid secretion in human adrenal glands: comparison with angiotensin-II effect. *Endocrinology*. 3. 136. 1285-1295
131. Gullner, H. G. and J. R. Gill, Jr. (1983). Beta endorphin selectively stimulates aldosterone secretion in hypophysectomized, nephrectomized dogs. *J Clin Invest*. 1. 71. 124-128
132. Hanoune, J. and N. Defer (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41. 145-174
133. Hansen, S. H., K. Sandvig and B. van Deurs (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol*. 1. 121. 61-72
134. Harmer, S. C. and A. B. Bicknell (2004). The role of the melanocortin 3 receptor in mediating the effects of gamma-MSH peptides on the adrenal. *Endocr Res*. 4. 30. 629-635
135. Hauet, T., J. Liu, H. Li, M. Gazouli, M. Culty and V. Papadopoulos (2002). PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr Res*. 4. 28. 395-401

136. Hay, D. L., G. Christopoulos, A. Christopoulos, D. R. Poyner and P. M. Sexton (2005). Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol.* 5. 67. 1655-1665
137. Haynes, R. C., Jr. (1958). The activation of adrenal phosphorylase by the adrenocorticotrophic hormone. *J Biol Chem.* 5. 233. 1220-1222
138. Hegde, R. S. and V. R. Lingappa (1997). Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell.* 5. 91. 575-582
139. Heroux, M., B. Breton, M. Hogue and M. Bouvier (2007a). Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. *Biochemistry.* 23. 46. 7022-7033
140. Heroux, M., M. Hogue, S. Lemieux and M. Bouvier (2007b). Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J Biol Chem.* 43. 282. 31610-31620
141. Hinkle, P. M. and J. A. Sebag (2009). Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP). *Mol Cell Endocrinol.* 300. 25-31
142. Horvath, A., S. Boikos, C. Giatzakis, A. Robinson-White, L. Groussin, K. J. Griffin, E. Stein, E. Levine, G. Delimpasi, H. P. Hsiao, M. Keil, S. Heyerdahl, L. Matyakhina, R. Libe, A. Fratticci, L. S. Kirschner, K. Cramer, R. C. Gaillard, X. Bertagna, J. A. Carney, J. Bertherat, I. Bossis and C. A. Stratakis (2006a). A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet.* 7. 38. 794-800
143. Horvath, A., C. Giatzakis, A. Robinson-White, S. Boikos, E. Levine, K. Griffin, E. Stein, V. Kamvissi, P. Soni, I. Bossis, W. de Herder, J. A. Carney, J. Bertherat, P. K. Gregersen, E. F. Remmers and C. A. Stratakis (2006b). Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res.* 24. 66. 11571-11575
144. Horvath, A., C. Giatzakis, K. Tsang, E. Greene, P. Osorio, S. Boikos, R. Libe, Y. Patronas, A. Robinson-White, E. Remmers, J. Bertherat, M. Nesterova and C. A. Stratakis (2008a). A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur J Hum Genet.*
145. Horvath, A., V. Mericq and C. A. Stratakis (2008b). Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 7. 358. 750-752
146. Houslay, M. D. and W. Kolch (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol.* 4. 58. 659-668

147. Huber, P., C. Mallet, E. Faure, C. Rampon, M. H. Prandini, O. Feraud, S. Bouillot and I. Vilgrain (2005). ACTH depletion represses vascular endothelial-cadherin transcription in mouse adrenal endothelium in vivo. *J Mol Endocrinol.* 1. 34. 127-137
148. Husmann, K., P. M. Sexton, J. A. Fischer and W. Born (2000). Mouse receptor-activity-modifying proteins 1, -2 and -3: amino acid sequence, expression and function. *Mol Cell Endocrinol.* 1-2. 162. 35-43
149. Hwang, G. W., S. E. Oh, T. Takahashi, J. Y. Lee and A. Naganuma (2010). siRNA-mediated knockdown of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) gene confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J Toxicol Sci.* 6. 35. 947-950
150. Hynes, T., S. Mervine, E. Yost, J. Sabo and C. Berlot (2004). Live cell imaging of Gs and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 42. 279. 44101-44112
151. Isales, C. M., M. Zaidi and H. C. Blair (2010). ACTH is a novel regulator of bone mass. *Ann N Y Acad Sci.* 1192. 110-116
152. Janes, M. E., K. M. Chu, A. J. Clark and P. J. King (2008). Mechanisms of adrenocorticotropin-induced activation of extracellularly regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in the human H295R adrenal cell line. *Endocrinology.* 4. 149. 1898-1905
153. Jaroenporn, S., K. Nagaoka, R. Ohta, M. Shirota, G. Watanabe and K. Taya (2008). Differences in adrenocortical secretory and gene expression responses to stimulation in vitro by ACTH or prolactin between high- and low-avoidance Hatano rats. *Stress.* 1
154. Jauregui-Huerta, F., Y. Ruvalcaba-Delgadillo, R. Gonzalez-Castaneda, J. Garcia-Estrada, O. Gonzalez-Perez and S. Luquin (2010). Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Curr Immunol Rev.* 3. 6. 195-204
155. Jayadev, S., R. D. Smith, G. Jagadeesh, A. J. Baukal, L. Hunyady and K. J. Catt (1999). N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells. *Endocrinology.* 5. 140. 2010-2017
156. Jin, J., F. D. Smith, C. Stark, C. D. Wells, J. P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J. R. Woodgett, L. K. Langeberg, J. D. Scott and T. Pawson (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol.* 16. 14. 1436-1450

157. Jones, B. W. and P. M. Hinkle (2009). Subcellular trafficking of the TRH receptor: effect of phosphorylation. *Mol Endocrinol.* 9. 23. 1466-1478
158. Kahnt, F. W., A. Milani, H. Steffen and R. Nehler (1974). The rate-limiting step of adrenal steroidogenesis and adenosine 3':5'-monophosphate. *Eur J Biochem.* 1. 44. 243-250
159. Kapas, S., F. M. Cammas, J. P. Hinson and A. J. Clark (1996). Agonist and receptor binding properties of adrenocorticotropin peptides using the cloned mouse adrenocorticotropin receptor expressed in a stably transfected HeLa cell line. *Endocrinology.* 8. 137. 3291-3294
160. Kempna, P. and C. E. Fluck (2008). Adrenal gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1. 22. 77-93
161. Kennelly, P. J. and E. G. Krebs (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 24. 266. 15555-15558
162. Kilianova, Z., N. Basora, P. Kilian, M. D. Payet and N. Gallo-Payet (2006). Human melanocortin receptor 2 expression and functionality: effects of protein kinase A and protein kinase C on desensitization and internalization. *Endocrinology.* 5. 147. 2325-2337
163. Kim, A. C. and G. D. Hammer (2007). Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266. 10-16
164. Kirschner, L. S., F. Sandrini, J. Monbo, J. P. Lin, J. A. Carney and C. A. Stratakis (2000). Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet.* 20. 9. 3037-3046
165. Kohno, T. and Y. Igarashi (2004). Roles for N-glycosylation in the dynamics of Edg-1/S1P1 in sphingosine 1-phosphate-stimulated cells. *Glycoconj J.* 8-9. 21. 497-501
166. Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol.* 1. 63. 9-18
167. Kojima, I., K. Kojima and H. Rasmussen (1985). Role of calcium and cAMP in the action of adrenocorticotropin on aldosterone secretion. *J Biol Chem.* 7. 260. 4248-4256
168. Koritz, S. B., G. Bhargava and E. Schwartz (1977). ACTH action on adrenal steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 297. 329-335
169. Kramer, R. E., J. L. McCarthy, E. R. Simpson and M. R. Waterman (1983). Effects of ACTH on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in primary culture--

increased secretion of 17 alpha-hydroxylated steroids associated with a refractoriness in total steroid output. *J Steroid Biochem.* 6. 18. 715-723

170. Krieger, D. T., W. Allen, F. Rizzo and H. P. Krieger (1971). Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2. 32. 266-284

171. Krueger, K. M., Y. Daaka, J. A. Pitcher and R. J. Lefkowitz (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem.* 1. 272. 5-8

172. Kuhn, H., S. W. Hall and U. Wilden (1984). Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 2. 176. 473-478

173. Kushwaha, N., S. C. Harwood, A. M. Wilson, M. Berger, L. H. Tecott, B. L. Roth and P. R. Albert (2006). Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G-protein coupling. *Mol Pharmacol.* 5. 69. 1518-1526

174. Lacroix, A., E. Bolte, J. Tremblay, J. Dupre, P. Poitras, H. Fournier, J. Garon, D. Garrel, F. Bayard, R. Taillefer and et al. (1992). Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 14. 327. 974-980

175. Lacroix, A., I. Bourdeau, A. Lampron, T. L. Mazzuco, J. Tremblay and P. Hamet (2009). Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clin Endocrinol (Oxf).*

176. Lacroix, A., N. Ndiaye, J. Tremblay and P. Hamet (2001). Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev.* 1. 22. 75-110

177. Lanctot, P. M., P. C. Leclerc, M. Clement, M. Auger-Messier, E. Escher, R. Leduc and G. Guillemette (2005). Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem J. Pt 1.* 390. 367-376

178. Lanctot, P. M., P. C. Leclerc, E. Escher, R. Leduc and G. Guillemette (1999). Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry.* 27. 38. 8621-8627

179. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron and L. S. Barak (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7. 96. 3712-3717.

180. Lappalainen, S., P. Utriainen, T. Kuulasmaa, R. Voutilainen and J. Jaaskelainen (2008). ACTH receptor promoter polymorphism associates with severity of premature

adrenarche and modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis in children. *Pediatr Res.* 4. 63. 410-414

181. Latronico, A. C., M. Reincke, B. B. Mendonca, K. Arai, P. Mora, B. Allolio, B. L. Wajchenberg, G. P. Chrousos and C. Tsigos (1995). No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 3. 80. 875-877

182. Le Roy, C. and J. L. Wrana (2005). Signaling and endocytosis: a team effort for cell migration. *Dev Cell.* 2. 9. 167-168

183. Le, T. and B. P. Schimmer (2001). The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology.* 10. 142. 4282-4287

184. Lebrethon, M. C., O. Avallet, Y. Reznik, F. Archambeaud, J. Combes, T. B. Usdin, G. Narboni, J. Mahoudeau and J. M. Saez (1998). Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 12. 83. 4514-4519

185. Lebrethon, M. C., D. Naville, M. Begeot and J. M. Saez (1994). Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest.* 4. 93. 1828-1833

186. Lee, G., N. Makhanova, K. Caron, M. L. Lopez, R. A. Gomez, O. Smithies and H. S. Kim (2005). Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology.* 6. 146. 2650-2656

187. Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 30. 273. 18677-18680

188. Lefkowitz, R. J., J. Roth, W. Pricer and I. Pastan (1970). ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3. 65. 745-752.

189. Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* 5721. 308. 512-517

190. Lembo, P. M., M. H. Ghahremani, S. J. Morris and P. R. Albert (1997). A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor directs signaling specificity. *Mol Pharmacol.* 1. 52. 164-171

191. Li, C., Y. Hu, G. Sturm, G. Wick and Q. Xu (2000). Ras/Rac-Dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells stimulated by cyclic strain stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 3. 20. E1-9

192. Liakos, P., E. Chambaz, J. Feige and G. Defaye (1998). Expression of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticularis zones of bovine adrenal cortex. *Endocr Res.* 24. 427-432
193. Libe, R., A. Fratticci, J. Coste, F. Tissier, A. Horvath, B. Ragazzon, F. Rene-Corail, L. Groussin, X. Bertagna, M. L. Raffin-Sanson, C. A. Stratakis and J. Bertherat (2008). Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res.* 12. 14. 4016-4024
194. Light, K., P. J. Jenkins, A. Weber, C. Perrett, A. Grossman, M. Pistorello, S. L. Asa, R. N. Clayton and A. J. Clark (1995). Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? *Life Sci.* 18. 56. 1523-1527
195. Lin, F., H. Wang and C. C. Malbon (2000). Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J Biol Chem.* 25. 275. 19025-19034
196. Lin, L., B. Ferraz-de-Souza and J. C. Achermann (2007). Genetic disorders involving adrenal development. *Endocr Dev.* 11. 36-46
197. Linseman, D. A., C. W. Benjamin and D. A. Jones (1995). Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 21. 270. 12563-12568
198. Lippincott-Schwartz, J. (1993a). Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 3. 3. 81-88
199. Lippincott-Schwartz, J. (1993b). Membrane cycling between the ER and Golgi apparatus and its role in biosynthetic transport. *Subcell Biochem.* 21. 95-119
200. Lis, M., P. Hamet, J. Gutkowska, G. Maurice, N. G. Seidah, N. Lariviere, M. Chretien and J. Genest (1981). Effect of N-terminal portion of pro-opiomelanocortin on aldosterone release by human adrenal adenoma in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 6. 52. 1053-1056
201. Liu, J., M. B. Rone and V. Papadopoulos (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem.* 50. 281. 38879-38893
202. Lohse, M. J., J. L. Benovic, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem.* 6. 265. 3202-3211
203. Lotfi, C. F. and H. A. Armelin (2001). cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol.* 3. 168. 381-389

204. Lowry, P. J., C. McMartin and J. Peters (1973). Properties of a simplified bioassay for adrenocorticotrophic activity using the steroidogenic response of isolated adrenal cells. *J Endocrinol.* 1. 59. 43-55
205. Lui, J. C. and J. Baron (2010). Effects of glucocorticoids on the growth plate. *Endocr Dev.* 20. 187-193
206. Lunghi, L., B. Pavan, C. Biondi, R. Paolillo, A. Valerio, F. Vesce and A. Patella (2010). Use of glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Des.* 32. 16. 3616-3637
207. Luttrell, L. M., Y. Daaka and R. J. Lefkowitz (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 2. 11. 177-183
208. Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce and R. J. Lefkowitz (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5. 98. 2449-2454
209. Lymeropoulos, A., G. Rengo, C. Zincarelli, J. Kim, S. Soltys and W. J. Koch (2009). An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14. 106. 5825-5830
210. Mains, R. E. and B. A. Eipper (1980). Biosynthetic studies on ACTH, beta-endorphin, and alpha-melanotropin in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 343. 94-110
211. Malbon, C. C., J. Tao and H. Y. Wang (2004). AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem J. Pt 1.* 379. 1-9
212. Markkanen, P. M. and U. E. Petaja-Repo (2008). N-glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded delta-opioid receptors at the cell surface. *J Biol Chem.* 43. 283. 29086-29098
213. Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 2. 80. 179-185
214. Matsuoka, H., P. J. Mulrow, R. Franco-Saenz and C. H. Li (1981). Effects of beta-lipotropin and beta-lipotropin-derived peptides on aldosterone production in the rat adrenal gland. *J Clin Invest.* 3. 68. 752-759
215. May, L. T., K. Leach, P. M. Sexton and A. Christopoulos (2007). Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47. 1-51
216. Mazzocchi, G., L. K. Malendowicz, P. Rebuffat, C. Robba, G. Gottardo and G. G. Nussdorfer (1986). Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona

glomerulosa of the rat. A coupled stereological and enzymological study. *Cell Tissue Res.* 2. 243. 303-310

217. Mazzuco, T. L., O. Chabre, J. J. Feige and M. Thomas (2007). Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266. 23-28

218. McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee and S. M. Foord (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 6683. 393. 333-339

219. McLean, A. J. and G. Milligan (2000). Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. *Br J Pharmacol.* 8. 130. 1825-1832

220. Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12. 575-625

221. Metherell, L. A., L. F. Chan and A. J. Clark (2006). The genetics of ACTH resistance syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 4. 20. 547-560

222. Metherell, L. A., J. P. Chapple, S. Cooray, A. David, C. Becker, F. Ruschendorf, D. Naville, M. Begeot, B. Khoo, P. Nurnberg, A. Huebner, M. E. Cheetham and A. J. Clark (2005). Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet.* 2. 37. 166-170

223. Mialet-Perez, J., S. A. Green, W. E. Miller and S. B. Liggett (2004). A primate-dominant third glycosylation site of the beta2-adrenergic receptor routes receptors to degradation during agonist regulation. *J Biol Chem.* 37. 279. 38603-38607

224. Michineau, S., L. Muller, A. Pizard, F. Alhenc-Gelas and R. M. Rajerison (2004). N-linked glycosylation of the human bradykinin B2 receptor is required for optimal cell-surface expression and coupling. *Biol Chem.* 1. 385. 49-57

225. Mitani, F., H. Miyamoto, K. Mukai and Y. Ishimura (1996). Effects of long term stimulation of ACTH and angiotensin II-secretions on the rat adrenal cortex. *Endocr Res.* 4. 22. 421-431

226. Mitani, F., K. Mukai, H. Miyamoto, M. Suematsu and Y. Ishimura (2003). The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta.* 3. 1619. 317-324

227. Mitani, F., H. Suzuki, J. Hata, T. Ogishima, H. Shimada and Y. Ishimura (1994). A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology.* 1. 135. 431-438

228. Mizrachi, D. and D. L. Segaloff (2004). Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol Endocrinol.* 7. 18. 1768-1777
229. Moore, C. A., S. K. Milano and J. L. Benovic (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69. 451-482
230. Moore, S. A., A. S. Patel, N. Huang, B. C. Lavin, T. N. Grammatopoulos, R. D. Andres and J. A. Weyhenmeyer (2002). Effects of mutations in the highly conserved DRY motif on binding affinity, expression, and G-protein recruitment of the human angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 1-2. 109. 161-167
231. Mountjoy, K. G., I. M. Bird, W. E. Rainey and R. D. Cone (1994). ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 1. 99. R17-20
232. Mountjoy, K. G., L. S. Robbins, M. T. Mortrud and R. D. Cone (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science.* 5074. 257. 1248-1251
233. Mouri, T., T. Suda, N. Sasano, N. Andoh, Y. Takei, M. Takase, A. Sasaki, O. Murakami and K. Yoshinaga (1984). Immunocytochemical identification of CRF in the human hypothalamus. *Tohoku J Exp Med.* 4. 142. 423-426
234. Mullins, L. J., A. Peter, N. Wrobel, J. R. McNeilly, A. S. McNeilly, E. A. Al-Dujaili, D. G. Brownstein, J. J. Mullins and C. J. Kenyon (2009). *Cyp11b1* null mouse, a model of congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem.* 6. 284. 3925-3934
235. Mulrow, P. J. (1999). Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regul Pept.* 1-2. 80. 27-32
236. Mulrow, P. J. and R. Franco-Saenz (1996). The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. *J Hypertens.* 2. 14. 173-176
237. Mune, T., H. Murase, N. Yamakita, T. Fukuda, M. Murayama, A. Miura, T. Suwa, J. Hanafusa, H. Daido, H. Morita and K. Yasuda (2002). Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 12. 87. 5706-5713
238. Murakami, A., T. Yajima, H. Sakuma, M. J. McLaren and G. Inana (1993). X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* 2. 334. 203-209
239. Murray, S. A., K. Davis and V. Gay (2003). ACTH and adrenocortical gap junctions. *Microsc Res Tech.* 3. 61. 240-246

240. N'Diaye, N., J. Tremblay, P. Hamet, W. W. De Herder and A. Lacroix (1998). Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 8. 83. 2781-2785
241. Naville, D., L. Barjhoux, C. Jaillard, D. Faury, F. Despert, B. Esteva, P. Durand, J. M. Saez and M. Begeot (1996). Demonstration by transfection studies that mutations in the adrenocorticotropin receptor gene are one cause of the hereditary syndrome of glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 4. 81. 1442-1448
242. Naville, D., L. Barjhoux, C. Jaillard, M. C. Lebrethon, J. M. Saez and M. Begeot (1994). Characterization of the transcription start site of the ACTH receptor gene: presence of an intronic sequence in the 5'-flanking region. *Mol Cell Endocrinol.* 1-2. 106. 131-135
243. Naville, D., L. Barjhoux, C. Jaillard, J. M. Saez, P. Durand and M. Begeot (1997). Stable expression of normal and mutant human ACTH receptor: study of ACTH binding and coupling to adenylate cyclase. *Mol Cell Endocrinol.* 1. 129. 83-90
244. Naville, D., W. E. Rainey, L. Milewich and J. I. Mason (1991). Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase expression by adrenocorticotropin in bovine adrenocortical cells. *Endocrinology.* 1. 128. 139-145
245. Nebesio, T. D. and E. A. Eugster (2010). Growth and reproductive outcomes in congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2010. 298937
246. Neher, R. and A. Milani (1978). Steroidogenesis in isolated adrenal cells: excitation by calcium. *Mol Cell Endocrinol.* 3. 9. 243-253
247. Nesterova, M., I. Bossis, F. Wen, A. Horvath, L. Matyakhina and C. A. Stratakis (2008). An immortalized human cell line bearing a PRKAR1A-inactivating mutation: effects of overexpression of the wild-type Allele and other protein kinase A subunits. *J Clin Endocrinol Metab.* 2. 93. 565-571
248. New, M. I. (2010). Ancient history of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev.* 20. 202-211
249. Nicholls, M. G., E. A. Espiner and R. A. Donald (1975). Plasma aldosterone response to low dose ACTH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. 41. 186-188
250. Noon, L. A., J. M. Franklin, P. J. King, N. J. Goulding, L. Hunyady and A. J. Clark (2002). Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol.* 1. 174. 17-25
251. Nussdorfer, G. G. (1986). Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol.* 98. 1-405

252. Nussinovitch, U., J. F. de Carvalho, R. M. Pereira and Y. Shoenfeld (2010). Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art. *Curr Pharm Des.* 32. 16. 3574-3585
253. Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak and M. G. Caron (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 45. 274. 32248-32257
254. Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak and M. G. Caron (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem.* 22. 276. 19452-19460
255. Ohashi, M., E. R. Simpson, R. E. Kramer and B. R. Carr (1982). Regulation of low-density lipoprotein receptors in cultured bovine adrenocortical cells. *Arch Biochem Biophys.* 1. 215. 199-205
256. Ostrom, R. S., R. A. Bunday and P. A. Insel (2004). Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. *J Biol Chem.* 19. 279. 19846-19853
257. Otis, M., S. Campbell, M. D. Payet and N. Gallo-Payet (2005). Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 2. 146. 633-642
258. Otis, M., S. Campbell, M. D. Payet and N. Gallo-Payet (2007). Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol.* 3. 193. 331-347
259. Pan, C. S., Y. F. Qi, S. Y. Wu, W. Jiang, G. Z. Li and C. S. Tang (2004). The role of adrenomedullin and its receptor system in cardiovascular calcification of rat induced by Vitamin D(3) plus nicotine. *Peptides.* 4. 25. 601-608
260. Parameswaran, N. and W. S. Spielman (2006). RAMPs: The past, present and future. *Trends Biochem Sci.* 11. 31. 631-638
261. Parent, A., E. Hamelin, P. Germain and J. L. Parent (2009). Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem J.* 1. 418. 163-172
262. Payet, M.-D., M. Benabderrazik and N. Gallo-Payet (1987). Excitation-secretion coupling : Ionic currents in glomerulosa cells: Effects of adrenocorticotropin and K⁺ channel blockers. *Endocrinology.* 121. 875-882

263. Penhoat, A., C. Jaillard and J. Saez (1993). Identification and characterization of corticotropin receptors in bovine and human adrenals. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1. 44. 21-27
264. Penhoat, A., C. Jaillard and J. M. Saez (1989). Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13. 86. 4978-4981
265. Penhoat, A., D. Naville and M. Begeot (2001). The adrenocorticotrophic hormone receptor. *Current Opinion Endocrinol Diabetes.* 8. 112-117
266. Petaja-Repo, U. E., M. Hogue, A. Laperriere, P. Walker and M. Bouvier (2000). Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem.* 18. 275. 13727-13736
267. Pfaus, J. G., A. Shadiack, T. Van Soest, M. Tse and P. Molinoff (2004). Selective facilitation of sexual solicitation in the female rat by a melanocortin receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27. 101. 10201-10204
268. Phillips, L. J., P. D. McGorry, B. Garner, K. N. Thompson, C. Pantelis, S. J. Wood and G. Berger (2006). Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry.* 9. 40. 725-741
269. Pierce, K. L. and R. J. Lefkowitz (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 10. 2. 727-733
270. Pignatelli, D., J. Ferreira, P. Vendeira, M. C. Magalhaes and G. P. Vinson (2002). Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. *Endocr Res.* 4. 28. 683-691
271. Pippig, S., S. Andexinger and M. J. Lohse (1995). Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol.* 4. 47. 666-676
272. Poderoso, C., D. P. Converso, P. Maloberti, A. Duarte, I. Neuman, S. Galli, F. C. Maciel, C. Paz, M. C. Carreras, J. J. Poderoso and E. J. Podesta (2008). A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS One.* 1. 3. e1443
273. Pouyssegur, J., V. Volmat and P. Lenormand (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 5-6. 64. 755-763
274. Prado, G. N., D. F. Mierke, M. Pellegrini, L. Taylor and P. Polgar (1998). Motif mutation of bradykinin B2 receptor second intracellular loop and proximal C terminus is

critical for signal transduction, internalization, and resensitization. *J Biol Chem.* 50. 273. 33548-33555

275. Proudnikov, D., S. Hamon, J. Ott and M. J. Kreek (2008). Association of polymorphisms in the melanocortin receptor type 2 (MC2R, ACTH receptor) gene with heroin addiction. *Neurosci Lett.* 3. 435. 234-239

276. Rached, M., A. Buronfosse, P. Durand, M. Begeot and A. Penhoat (2003). Stable expression of human melanocortin 3 receptor fused to EGFP in the HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1. 306. 208-212

277. Rached, M., H. El Mourabit, A. Buronfosse, A. Blondet, D. Naville, M. Begeot and A. Penhoat (2005). Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides.* 10. 26. 1842-1847

278. Rae, P. A. and B. P. Schimmer (1974). Iodinated derivatives of adrenocorticotrop hormone. Preparation of iodinated alpha 1-24-ACTH with full hormonal activity. *J Biol Chem.* 17. 249. 5649-5653

279. Raffin-Sanson, M. L., Y. de Keyzer and X. Bertagna (2003). Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol.* 2. 149. 79-90

280. Rainey, W. E. (1999). Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. *Mol Cell Endocrinol.* 1-2. 151. 151-160

281. Rainey, W. E., B. R. Carr, Z. N. Wang and C. R. Parker, Jr. (2001). Gene profiling of human fetal and adult adrenals. *J Endocrinol.* 2. 171. 209-215

282. Rainey, W. E., J. W. Shay and J. I. Mason (1986). ACTH induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol biosynthesis, and steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 16. 261. 7322-7326

283. Ramachandran, J. and A. T. Suyama (1975). Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. 72. 113-117

284. Rands, E., M. R. Candelore, A. H. Cheung, W. S. Hill, C. D. Strader and R. A. Dixon (1990). Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem.* 18. 265. 10759-10764

285. Rapoport, I., M. Miyazaki, W. Boll, B. Duckworth, L. C. Cantley, S. Shoelson and T. Kirchhausen (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *Embo J.* 9. 16. 2240-2250

286. Reichling, C., W. Meyerhof and M. Behrens (2008). Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation. *J Neurochem.* 3. 106. 1138-1148

287. Ren, X. R., E. Reiter, S. Ahn, J. Kim, W. Chen and R. J. Lefkowitz (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5. 102. 1448-1453
288. Ricks, T. K. and J. Trejo (2009). Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J Biol Chem*. 49. 284. 34444-34457
289. Roberge, C., A. C. Carpentier, M. F. Langlois, J. P. Baillargeon, J. L. Ardilouze, P. Maheux and N. Gallo-Payet (2007). Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 6. 293. E1465-E1478
290. Roger, P. P., S. Reuse, C. Maenhaut and J. E. Dumont (1995). Multiple facets of the modulation of growth by cAMP. *Vitam Horm*. 51. 59-191
291. Rosenberg, D., L. Groussin, X. Bertagna and J. Bertherat (2002). cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocr Res*. 4. 28. 765-775
292. Ressler, A. S., J. G. Pfaus, H. K. Kia, J. Bernabe, L. Alexandre and F. Giuliano (2006). The melanocortin agonist, melanotan II, enhances proceptive sexual behaviors in the female rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 3. 85. 514-521
293. Roy, S., B. Perron and N. Gallo-Payet (2010a). Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology*. 2. 151. 660-670
294. Roy, S., S. Pinard, L. Chouinard and N. Gallo-Payet (2010b). Adrenocorticotropin hormone (ACTH) effects on MAPK phosphorylation in human fasciculata cells and in embryonic kidney 293 cells expressing human melanocortin 2 receptor (MC2R) and MC2R accessory protein (MRAP)beta. *Mol Cell Endocrinol*.
295. Roy, S., M. Rached and N. Gallo-Payet (2007). Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol*. 7. 21. 1656-1669
296. Roy, S. J., A. Parent, M. A. Gallant, A. J. de Brum-Fernandes, J. Stankova and J. L. Parent (2010c). Characterization of C-terminal tail determinants involved in CRTH2 receptor trafficking: identification of a recycling motif. *Eur J Pharmacol*. 1-3. 630. 10-18
297. Rui, X., A. Al-Hakim, J. Tsao, P. R. Albert and B. P. Schimmer (2004). Expression of adenylyl cyclase-4 (AC-4) in Y1 and forskolin-resistant adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1-2. 215. 101-108

298. Russo, A. F. (2007). Ramping it up: RAMP1 and the implications for migraine. *Pharmacogenomics*. 7. 8. 687-690
299. Saez, J. M., P. Durand and A. M. Cathiard (1984). Ontogeny of the ACTH receptor, adenylate cyclase and steroidogenesis in adrenal. *Mol Cell Endocrinol*. 2-3. 38. 93-102
300. Saito, H., M. Kubota, R. W. Roberts, Q. Chi and H. Matsunami (2004). RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*. 5. 119. 679-691
301. Sanchez-Laorden, B. L., C. Herraiz, J. C. Valencia, V. J. Hearing, C. Jimenez-Cervantes and J. C. Garcia-Borrón (2009). Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. *J Cell Physiol*. 3. 220. 640-654
302. Sanchez-Laorden, B. L., C. Jimenez-Cervantes and J. C. Garcia-Borrón (2007). Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J Biol Chem*. 5. 282. 3241-3251
303. Sanchez-Laorden, B. L., J. Sanchez-Mas, E. Martinez-Alonso, J. A. Martinez-Menarguez, J. C. Garcia-Borrón and C. Jimenez-Cervantes (2006). Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J Invest Dermatol*. 1. 126. 172-181
304. Sanchez-Mas, J., L. A. Guillo, P. Zanna, C. Jimenez-Cervantes and J. C. Garcia-Borrón (2005a). Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. *Mol Endocrinol*. 4. 19. 1035-1048
305. Sanchez-Mas, J., B. L. Sanchez-Laorden, L. A. Guillo, C. Jimenez-Cervantes and J. C. Garcia-Borrón (2005b). The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides*. 10. 26. 1848-1857
306. Sawutz, D. G., S. M. Lanier, C. D. Warren and R. M. Graham (1987). Glycosylation of the mammalian alpha 1-adrenergic receptor by complex type N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol*. 5. 32. 565-571
307. Schiebinger, R. J., L. M. Braley, A. Menachery and G. H. Williams (1985). Calcium, a "third messenger" of cAMP-stimulated adrenal steroid secretion. *Am J Physiol*. 1 Pt 1. 248. E89-94
308. Schiöth, H. B. (2001). The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam Horm*. 63. 195-232

309. Schioth, H. B., V. Chhajlani, R. Muceniece, V. Klusa and J. E. Wikberg (1996). Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci.* 10. 59. 797-801
310. Schioth, H. B., S. Petersson, R. Muceniece, M. Szardenings and J. E. Wikberg (1997). Deletions of the N-terminal regions of the human melanocortin receptors. *FEBS Lett.* 2-3. 410. 223-228
311. Schioth, H. B., T. Raudsepp, A. Ringholm, R. Fredriksson, S. Takeuchi, D. Larhammar and B. P. Chowdhary (2003). Remarkable synteny conservation of melanocortin receptors in chicken, human, and other vertebrates. *Genomics.* 5. 81. 504-509
312. Schlang, K. J., L. Arning, J. T. Epplen and S. Stemmler (2008). Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: novel mutations in the REEP1 gene (SPG31). *BMC Med Genet.* 1. 9. 71
313. Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature.* 6778. 404. 661-671
314. Schwartz, S. L., C. Cao, O. Pylypenko, A. Rak and A. Wandinger-Ness (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci.* Pt 22. 120. 3905-3910
315. Seachrist, J. L., P. H. Anborgh and S. S. Ferguson (2000). beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem.* 35. 275. 27221-27228
316. Seachrist, J. L. and S. S. Ferguson (2003). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci.* 2-3. 74. 225-235
317. Sebag, J. A. and P. M. Hinkle (2007). Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51. 104. 20244-20249
318. Sebag, J. A. and P. M. Hinkle (2009). Regions of Melanocortin 2 (MC2) Receptor Accessory Protein Necessary for Dual Topology and MC2 Receptor Trafficking and Signaling. *J Biol Chem.* 1. 284. 610-618
319. Sebag, J. A. and P. M. Hinkle (2010). Regulation of G protein-coupled receptor signaling: specific dominant-negative effects of melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Sci Signal.* 116. 3. ra28
320. Sever, S., H. Damke and S. L. Schmid (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 5. 150. 1137-1148
321. Sewer, M. B. and D. Li (2008). Regulation of steroid hormone biosynthesis by the cytoskeleton. *Lipids.* 12. 43. 1109-1115

322. Sewer, M. B. and M. R. Waterman (2003). ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech.* 3. 61. 300-307
323. Sexton, P. M., A. Albiston, M. Morfis and N. Tilakaratne (2001). Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal.* 2. 13. 73-83
324. Shah, B. H., A. Yesilkaya, J. A. Olivares-Reyes, H. D. Chen, L. Hunyady and K. J. Catt (2004). Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Endocrinol.* 8. 18. 2035-2048
325. Shah, U. S. and S. A. Murray (2001). Bimodal inhibition of connexin 43 gap junctions decreases ACTH-induced steroidogenesis and increases bovine adrenal cell population growth. *J Endocrinol.* 1. 171. 199-208
326. Shen, T., Y. Suzuki, M. Poyard, M. Best-Belpomme, N. Defer and J. Hanoune (1997). Localization and differential expression of adenylyl cyclase messenger ribonucleic acids in rat adrenal gland determined by in situ hybridization. *Endocrinology.* 11. 138. 4591-4598
327. Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005a). Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin. *Sci STKE.* 311. 2005. cm14
328. Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005b). Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch. *Nat Cell Biol.* 12. 7. 1059-1061
329. Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005c). Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci STKE.* 308. 2005. cm10
330. Simpson, E. R. and M. R. Waterman (1988). Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol.* 50. 427-440
331. Simpson, E. R. and M. R. Waterman (1989). Steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex and its regulation by adrenocorticotropin. *Endocrinology.* 2. 1543-1556
332. Skach, W. R. and V. R. Lingappa (1994). Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1). *Cancer Res.* 12. 54. 3202-3209
333. Slavotinek, A. M., J. A. Hurst, D. Dunger and A. O. Wilkie (1998). ACTH receptor mutation in a girl with familial glucocorticoid deficiency. *Clin Genet.* 1. 53. 57-62

334. Smith, R. D., A. J. Baukal, P. Dent and K. J. Catt (1999). Raf-1 kinase activation by angiotensin II in adrenal glomerulosa cells: roles of Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, and Ca²⁺ influx. *Endocrinology*. 3. 140. 1385-1391
335. Solca, F. F., J. Chluba-de Tapia, K. Iwata and A. N. Eberle (1993). B16-G4F mouse melanoma cells: an MSH receptor-deficient cell clone. *FEBS Lett*. 2. 322. 177-180
336. Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci*. 113 Pt 2. 183-192
337. Song, B. D. and S. L. Schmid (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry*. 6. 42. 1369-1376
338. Sonnenburg, W. K., P. J. Mullaney and J. A. Beavo (1991). Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J Biol Chem*. 26. 266. 17655-17661
339. Spat, A. (1988). Stimulus-secretion coupling in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J Steroid Biochem*. 4. 29. 443-453
340. Spat, A., P. Enyedi, G. Hajnoczky and L. Hunyady (1991). Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells. *Exp Physiol*. 6. 76. 859-885
341. Spat, A. and L. Hunyady (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev*. 2. 84. 489-539
342. Speiser, P. W. (2010). Growth and development: congenital adrenal hyperplasia-glucocorticoids and height. *Nat Rev Endocrinol*. 1. 6. 14-15
343. Stocco, D. M. (1997). A StAR search: implications in controlling steroidgenesis. *Biol Reprod*. 2. 56. 328-336
344. Stork, P. J. and J. M. Schmitt (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*. 6. 12. 258-266
345. Stratakis, C. A. (2009). New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 1-2. 300. 152-157
346. Suda, T., N. Tomori, F. Tozawa, H. Demura, K. Shizume, T. Mouri, Y. Miura and N. Sasano (1984). Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 5. 58. 919-924
347. Swanson, L. W., P. E. Sawchenko, J. Rivier and W. W. Vale (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 3. 36. 165-186

348. Swords, F. M., A. Baig, D. M. Malchoff, C. D. Malchoff, M. O. Thorner, P. J. King, L. Hunyady and A. J. Clark (2002). Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Mol Endocrinol.* 12. 16. 2746-2753
349. Swords, F. M., L. A. Noon, P. J. King and A. J. Clark (2004). Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2. 213. 149-154
350. Szaszak, M., F. Christian, W. Rosenthal and E. Klussmann (2008). Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cell Signal.* 4. 20. 590-601
351. Tanaka, K., W. E. Nicholson and D. N. Orth (1978). Diurnal rhythm and disappearance half-time of endogenous plasma immunoreactive beta-MSH (LPH) and ACTH in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 6. 46. 883-890
352. Tao, Y. X. and D. L. Segaloff (2005). Functional analyses of melanocortin-4 receptor mutations identified from patients with binge eating disorder and nonobese or obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 10. 90. 5632-5638
353. Taylor, A. W., N. Kitaichi and D. Biro (2006). Melanocortin 5 receptor and ocular immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2. 52. 53-59
354. Taylor, V. A., M. A. Ellenbogen, D. Washburn and R. Joober (2010). The effects of glucocorticoids on the inhibition of emotional information: A dose-response study. *Biol Psychol.* 1. 86. 17-25
355. Thomas, M., M. Keramidas, E. Monchaux and J. J. Feige (2003). Role of adrenocorticotropin hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech.* 3. 61. 247-251
356. Thomas, M., M. Keramidas, E. Monchaux and J. J. Feige (2004). Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology.* 9. 145. 4320-4309
357. Tian, Y., R. D. Smith, T. Balla and K. J. Catt (1998). Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 4. 139. 1801-1809
358. Tremblay, E., M. D. Payet and N. Gallo-Payet (1991). Effects of ACTH and angiotensin II on cytosolic calcium in cultured adrenal glomerulosa cells. Role of cAMP production in the ACTH effect. *Cell Calcium.* 10. 12. 655-673

359. Udawela, M., G. Christopoulos, M. Morfis, N. Tilakaratne, A. Christopoulos and P. M. Sexton (2008). The effects of C-terminal truncation of receptor activity modifying proteins on the induction of amylin receptor phenotype from human CTb receptors. *Regul Pept.* 1-3. 145. 65-71
360. Udawela, M., G. Christopoulos, N. Tilakaratne, A. Christopoulos, A. Albiston and P. M. Sexton (2006). Distinct receptor activity-modifying protein domains differentially modulate interaction with calcitonin receptors. *Mol Pharmacol.* 6. 69. 1984-1989
361. Udawela, M., D. L. Hay and P. M. Sexton (2004). The receptor activity modifying protein family of G protein coupled receptor accessory proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 3. 15. 299-308
362. Van der Ploeg, L. H., W. J. Martin, A. D. Howard, R. P. Nargund, C. P. Austin, X. Guan, J. Drisko, D. Cashen, I. Sebhat, A. A. Patchett, D. J. Figueroa, A. G. DiLella, B. M. Connolly, D. H. Weinberg, C. P. Tan, O. C. Palyha, S. S. Pong, T. MacNeil, C. Rosenblum, A. Vongs, R. Tang, H. Yu, A. W. Sailer, T. M. Fong, C. Huang, M. R. Tota, R. S. Chang, R. Stearns, C. Tamvakopoulos, G. Christ, D. L. Drazen, B. D. Spar, R. J. Nelson and D. E. MacIntyre (2002). A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17. 99. 11381-11386
363. van Koppen, C. J. and N. M. Nathanson (1990). Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem.* 34. 265. 20887-20892
364. VanLeeuwen, D., M. E. Steffey, C. Donahue, G. Ho and R. G. MacKenzie (2003). Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal di-isoleucine sequence at codons 316/317. *J Biol Chem.* 18. 278. 15935-15940
365. Veo, K., C. Reinick, L. Liang, E. Moser, J. K. Angleson and R. M. Dores (2011). Observations on the ligand selectivity of the melanocortin 2 receptor. *Gen Comp Endocrinol.* 1. 172. 3-9
366. Vezzosi, D., D. Cartier, C. Regnier, P. Otal, A. Bennet, F. Parmentier, M. Plantavid, A. Lacroix, H. Lefebvre and P. Caron (2007). Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *Eur J Endocrinol.* 1. 156. 21-31
367. Vinson, G. P. (2003). Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech.* 3. 61. 227-239
368. Vinson, G. P. and M. M. Ho (1998). Origins of zonation: the adrenocortical model of tissue development and differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 25. S91-S96.

369. Vinson, G. P., J. A. Pudney and B. J. Whitehouse (1985). The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *J Endocrinol.* 2. 105. 285-294
370. von Zastrow, M. and B. K. Kobilka (1994). Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem.* 28. 269. 18448-18452
371. Walker, J. J., J. R. Terry and S. L. Lightman (2010). Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proc Biol Sci.* 1688. 277. 1627-1633
372. Wang, H. B., J. S. Guan, L. Bao and X. Zhang (2008). Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells. *Neurochem Res.* 10. 33. 2028-2034
373. Wang, Y. F., J. Zhang, J. Li, L. Q. Lan, Z. M. Yang and S. R. Wang (2004). [Increased atria expression of receptor activity-modifying proteins in heart failure patients]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 4. 21. 351-354
374. Waterman, M. R. and L. J. Bischof (1997). Cytochromes P450 12: diversity of ACTH (cAMP)-dependent transcription of bovine steroid hydroxylase genes. *Faseb J.* 6. 11. 419-427
375. Webb, T. R., L. Chan, S. N. Cooray, M. E. Cheetham, J. P. Chapple and A. J. Clark (2009). Distinct melanocortin 2 receptor accessory protein domains are required for melanocortin 2 receptor interaction and promotion of receptor trafficking. *Endocrinology.* 2. 150. 720-726
376. Weber, A., S. Kapas, J. Hinson, D. B. Grant, A. Grossman and A. J. Clark (1993). Functional characterization of the cloned human ACTH receptor: impaired responsiveness of a mutant receptor in familial glucocorticoid deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1. 197. 172-178
377. Wei, H., S. Ahn, S. K. Shenoy, S. S. Karnik, L. Hunyady, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (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.* 19. 100. 10782-10787
378. Weinstein, L. S., A. Shenker, P. V. Gejman, M. J. Merino, E. Friedman and A. M. Spiegel (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med.* 24. 325. 1688-1695
379. Weitzman, E. D., D. Fukushima, C. Nogueire, H. Roffwarg, T. F. Gallagher and L. Hellman (1971). Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. 33. 14-22

380. Welply, J. K., P. Shenbagamurthi, W. J. Lennarz and F. Naider (1983). Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides. *J Biol Chem.* 19. 258. 11856-11863
381. Wikberg, J. E., R. Muceniece, I. Mandrika, P. Prusis, J. Lindblom, C. Post and A. Skottner (2000). New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res.* 5. 42. 393-420.
382. Wikberg, J. E. and F. Mutulis (2008). Targeting melanocortin receptors: an approach to treat weight disorders and sexual dysfunction. *Nat Rev Drug Discov.* 4. 7. 307-323
383. Willenberg, H. S., C. A. Stratakis, C. Marx, M. Ehrhart-Bornstein, G. P. Chrousos and S. R. Bornstein (1998). Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 1. 339. 27-31
384. Wong, W. and J. D. Scott (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12. 5. 959-970
385. Xing, Y., C. R. Parker, M. Edwards and W. E. Rainey (2010). ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol.* 1. 45. 59-68
386. Xu, A., K. L. Choi, Y. Wang, P. A. Permana, L. Y. Xu, C. Bogardus and G. J. Cooper (2002). Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 4. 293. 1161-1167
387. Yamano, Y., R. Kamon, T. Yoshimizu, Y. Toda, Y. Oshida, S. Chaki, M. Yoshioka and I. Morishima (2004). The role of the DRY motif of human MC4R for receptor activation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 6. 68. 1369-1371
388. Yamaoka, T., T. Kudo, Y. Takuwa, Y. Kawakami, M. Itakura and K. Yamashita (1992). Hereditary adrenocortical unresponsiveness to adrenocorticotropin with a postreceptor defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. 75. 270-274
389. Yirmiya, R. and I. Goshen (2010). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2. 25. 181-213
390. Yu, S. S., R. J. Lefkowitz and W. P. Hausdorff (1993). Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1. 268. 337-341
391. Zerial, M. and H. McBride (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2. 2. 107-117
392. Zhang, J., L. S. Barak, K. E. Winkler, M. G. Caron and S. S. Ferguson (1997). A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-

adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem.* 43. 272. 27005-27014

393. Zhang, J., S. S. Ferguson, L. S. Barak, L. Menard and M. G. Caron (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem.* 31. 271. 18302-18305.

394. Zhang, L., W. H. Li, M. Anthonavage and M. Eisinger (2006). Melanocortin-5 receptor: a marker of human sebocyte differentiation. *Peptides.* 2. 27. 413-420

395. Zhang, R., R. Jankord, J. N. Flak, M. B. Solomon, D. A. D'Alessio and J. P. Herman (2010). Role of glucocorticoids in tuning hindbrain stress integration. *J Neurosci.* 44. 30. 14907-14914

396. Zhang, Z., C. S. Winborn, B. Marquez de Prado and A. F. Russo (2007). Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *J Neurosci.* 10. 27. 2693-2703

397. Zimmermann, A., P. Grigorescu-Sido, C. AlKhzouz, K. Patberg, S. Bucerzan, E. Schulze, T. Zimmermann, H. Rossmann, H. C. Geiss, K. J. Lackner and M. M. Weber (2010). Alterations in lipid and carbohydrate metabolism in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr.* 1. 74. 41-49

398. Zuber, M. X., E. R. Simpson, P. F. Hall and M. R. Waterman (1985). Effects of adrenocorticotropin on 17 alpha-hydroxylase activity and cytochrome P-450(17 alpha) synthesis in bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 3. 260. 1842-1848

399. Zuchner, S., G. Wang, K. N. Tran-Viet, M. A. Nance, P. C. Gaskell, J. M. Vance, A. E. Ashley-Koch and M. A. Pericak-Vance (2006). Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet.* 2. 79. 365-369