Université de Montréal

Structure quaternaire des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 et interaction avec leurs effecteurs.

par
Sylvain Armando

Département de Biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur
en Biochimie

Décembre 2010

© Armando, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Structure quaternaire des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 et interaction avec leurs effecteurs

présentée par :
Sylvain Armando

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gérardo Ferbeyre, président-rapporteur
Richard Leduc, examinateur externe, rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Laurent Prézeau, directeur de recherche
Pascal Chartrand, membre du jury
Bernard Mouillac, représentant de l'université Montpellier 2
Graciela Pineyro, représentante du doyen de la FES

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une famille très diversifiée de protéines membranaires capables de répondre à un grand nombre de signaux chimiques tels que des photons, des molécules odorantes, ou des hormones. En plus de cette diversité, l'étude des RCPG montre que des associations protéiques spécifiques multiplient les possibilités de signalisation de chacun de ces récepteurs.

En permettant d'atténuer, de potentialiser, ou de générer une nouvelle voie de signalisation, l'association des RCPG en oligomères s'avère une importante source de diversité. L'utilisation du transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) qui permet de détecter les interactions protéiques a révélé de nombreuses associations de RCPG. Durant cette thèse, des outils ont été développés pour combiner efficacement le BRET à des essais de complémentation de protéines (PCA) dans le but de savoir si l'oligomérisation des RCPG pouvait impliquer plus de deux récepteurs. Les résultats présentés montrent que les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 forment des homo et hétéro tétramères, et que l'activation d'un dimère CCR2 peut moduler la conformation d'un dimère CXCR4 par un changement conformationnel trans-récepteur. La coopérativité négative de liaison de ligand qui a été démontrée auparavant entre CXCR4 et CCR2 dans des lymphocytes T CD4+ exprimant les récepteurs de manière endogène confirme la validité biologique de cette interaction. Les données présentées suggèrent également que ces complexes peuvent engager les effecteurs $G\alpha_i$ et β-arrestine2, indiquant qu'ils représentent la forme fonctionnelle de ces récepteurs. Enfin, nous avons pu confirmer que chaque récepteur de l'hétérodimère CXCR4-CCR2 est impliqué dans l'engagement des effecteurs lors de l'activation de CCR2.

Un autre niveau de complexité dans la signalisation des RCPG est atteint par leur capacité à coupler de multiples protéines G. La liaison du facteur dérivé des cellules stromales (SDF-1) au récepteur CXCR4 permet la migration des lymphocytes T par une voie de signalisation dépendante de la protéine $G\alpha_i$. Nous avons pu démontrer en revanche que la

migration des cellules de cancer du sein était initiée par un couplage de CXCR4 à la voie $G\alpha_{13}$-Rho pour former des métastases dans des organes distants.

Enfin, un dernier niveau de régulation des RCPG a été abordé par l'étude de la phosphorylation de CXCR4 suite à son activation, qui permet la désensibilisation du récepteur et l'engagement de voies de signalisation dépendantes de la β-arrestine. Il apparaît que la désensibilisation de la voie du calcium serait médiée par la phosphorylation de CXCR4 par les kinases des RCPG (GRK) GRK2 et GRK6 et le recrutement de β-arrestine2, alors GRK3, GRK6 et la β-arrestine1 potentialiseraient l'activation des kinases régulées par les signaux extracellulaires ($ERK_{1/2}$). Nous suggérons également que c'est la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de CXCR4 qui permettrait son association avec la β-arrestine.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), récepteur de chimiokine CXCR4, CCR2, transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), dimère, tétramère, oligomère, essai de complémentation de protéines (PCA), complémentation bimoléculaire de luminescence (BiLC), complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC), protéines G, β-arrestines, cancer, métastases, phosphorylation, kinases des RCPG (GRK).

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are a diverse family of membrane proteins capable of responding to a large number of extracellular stimuli including photons, odorant molecules and hormones. In addition to this diversity, it has been shown that GPCRs form specific protein:protein interactions, multiplying the signalling possibilities of each of these receptors. With the ability to diminish, to potentiate or even generate new signalling pathways, the oligomeric association of GPCRs plays an important role in generating this diversity. The use of bioluminescence resonance energy transfer (BRET), which allows the detection of interactions among proteins, has revealed numerous associations between GPCRs. During this thesis, tools have been developed that effectively combine BRET with protein complementation assays (PCA) with the goal of determining if interactions between GPCRs could involve more than two receptors. The results show that the chemokine receptors CXCR4 and CCR2 form both homo and hetero tetramers, and that the activation of a dimer of CCR2 can modulate the conformation of a CXCR4 dimer through a trans-receptor conformational change. Negative cooperativity of ligand binding has previously been demonstrated between CXCR4 and CCR2 in CD4+ T lymphocytes endogenously expressing the receptors, confirming the biological validity of this interaction. The data presented also suggests that these complexes can engage the effector proteins Gαi and β-arrestin 2, indicating that they represent a functional form of the receptors. Furthermore, we have confirmed that each receptor of the CXCR4-CCR2 heterodimer is implicated in the engagement of effectors during the activation of CCR2.

An additional level of complexity in GPCR-promoted signaling exists in their capacity to couple of multiple G proteins. Binding of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) to CXCR4 is known to promote T lymphocyte migration through a $G\alpha_i$-dependent signalling pathway. In addition to this mechanism, we have demonstrated that breast cancer cell migration can initiated by a coupling of CXCR4 to the $G\alpha_{13}$-Rho pathway, leading to the formation of metastases in distant organs.

Finally, a novel level of GPCR regulation was revealed through the study of CXCR4 phosphorylation following its activation, which leads to the desensitization of the receptor and the engagement of β-arrestin-dependent signalling pathways. It appears that the desensitization of calcium signalling is mediated through the phosphorylation of CXCR4 by the GPCR kinases (GRKs) GRK2 and GRK6 and the recruitment of β-arrestin 2, whereas GRK3, GRK6 and β-arrestin 1 potentiate the activation of extracellular regulated kinase (ERK1/2). We also propose that the phosphorylation of the far C-terminal tail of CXCR4 is required for the interaction between the receptor and β-arrestin.

Keywords : G protein coupled receptors (RCPG), chemokine receptor CXCR4, CCR2, bioluminescence resonance energy transfer (BRET), dimer, tetramer, oligomer, protein complémentation assay (PCA), bimolecular luminescence complementation (BiLC), bimolecular fluorescence complementation (BiFC), G proteins, β-arrestins, cancer, metastasis, phosphorylation, GPCR kinases (GRK).

Table des matières

Introduction **16**

Communication cellulaire. **16**

Les récepteurs couplés aux protéines G. **17**

Généralités sur les RCPG. 17

Les différentes classes de RCPG. 19

Structure et activation des RCPG 21

Structure 21

Activation des RCPG et couplage aux protéines G 23

Famille des protéines G hétérotrimériques. 24

Oligomérisation des RCPG **40**

Liaison de ligand radiomarqué, micro-agrégation et complémentation fonctionnelle 41

Co-immunoprécipitation 42

Cas particulier des récepteurs de classe C : 44

Méthodes de transfert d'énergie par résonance de Förster et par bioluminescence (FRET et BRET) 45

Utilisation du BRET dans la détection de dimères de RCPG 46

Utilisation du FRET dans la détection de dimères de RCPG 50

Méthodes structurales. 51

Interface de dimérisation 52

Dimérisation induite par le ligand. 53

Rôles de la dimérisation **55**

Adressage à la membrane plasmique 56

Pharmacologie d'un dimère 56

Couplage d'un dimère de RCPG aux protéines G 57

Bases moléculaires du couplage d'une protéine G à un dimère de récepteur 58

Activation d'une protéine G par un RCPG monomérique 62

Internalisation d'un dimère de RCPG 63

Réalité physiologique des dimères de RCPG 64

Organisation des RCPG en complexes d'ordre supérieurs **65**

Premières évidences. 66

Méthodes de transfert d'énergie : FRET séquentiel 67

Essais de complémentation de protéines (PCA) 68
Choix du modèle d'étude 74
Modèle d'étude: les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 74
Généralités 74
Familles de chimiokines et leurs récepteurs 75
Fonction 77
Le Récepteur CCR2. 77
Chimiokine MCP-1 78
Signalisation de CCR2 78
Rôle physiologique 79
Dimérisation 79
Le récepteur CXCR4. 80
Généralités 80
La chimiokine SDF-1 81
Liaison de la chimiokine SDF-1 par CXCR4. 82
Autres ligands de CXCR4. 82
Structure du récepteur CXCR4 83
Rôles physiologiques 85
Pathologies impliquant CXCR4. 87
Signalisation 89
Terminaison de la signalisation par les GRK et les arrestines 90
Dimérisation / oligomérisation 92
Homodimère CXCR4 93
Hétérodimérisation 95
Objectifs de la thèse 97
Article 1 98
The Quaternary Structure of CXCR4 and CCR2 homo and hetero-oligomers 98
Article 2 146
Site–spécific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling 146

Article 3 198

A Synthetic Biology Approach Reveals a Gα$_{13}$-Rho Signaling Axis Driving CXCR4-mediated Breast Cancer Metastasis 198

Discussion 246

Choix méthodologiques et contrôles. 247

Résumé 247

Rationnelle de l'étude d'un complexe entre CXCR4 et CCR2. 248

Localisation des dimères de récepteurs à la membrane de cellules vivantes. 249

Changement conformationnel trans-récepteur détecté en BRET. 251

Détection de complexes d'ordre supérieur de RCPG par BRET combiné à la méthode de PCA 252

Détection d'un trimère Stau1 en BRET-PCA 255

Détection d'homo et hétéro-tétramères CXCR4 en BRET-double PCA 255

Contrôle de la spécificité d'interaction en BRET et BRET-PCA. 256

Etude moléculaire du changement de BRET induit par le ligand 258

Formation de complexes d'ordre supérieur. 261

Hypothèse structurale. 262

Rôles potentiels. 263

Engagement d'une protéine G par un dimère de récepteur. 264

Recrutement de la β-arrestine par un dimère de récepteur. 268

Engagement de Gα$_i$ et de la β-arrestine2 par un hétéro-oligomère CXCR4-CCR2. 270

Régulation de la signalisation de CXCR4 par de multiples kinases. 271

CXCR4 est couplé à la voie Gα13-Rho dans les métastases de cancer du sein 276

Conclusion 280

Bibliographie I

Annexe XXXV

Article 4 XXXV

Multimerization of Staufen1 in live cells XXXV

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN RCPG ET DE SON FONCTIONNEMENT 18

FIGURE 2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES 3 FAMILLES DE RCPG ET DE LEURS SOUS-GROUPES 21

FIGURE 3 STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU RÉCEPTEUR β2-AR 22

FIGURE 4 CYCLE D'ACTIVATION ET D'INACTIVATION DES PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES. 25

FIGURE 5 REPRÉSENTATION TRIDIMENSIONNELLE DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE Gαi 26

FIGURE 6 REPRÉSENTATION TRIDIMENSIONNELLE DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES G 29

FIGURE 7 DÉSENSIBILISATION, INTERNALISATION, ET RECYCLAGE / DÉGRADATION DES RCPG 36

FIGURE 8 : REPRÉSENTATION DES SPECTRES DE TRANSFERT D'ÉNERGIE EN BRET1 ET BRET2 49

FIGURE 9 : COURBE DE TITRATION ENTRE DEUX PROTÉINES : SPÉCIFICITÉ 50

FIGURE 10 : COURBE DE TITRATION: AFFINITÉ RELATIVE 54

FIGURE 11 : MODÈLE D'INTERACTION D'UN DIMÈRE DE RÉCEPTEUR β2-AR AVEC UNE PROTÉINE G HÉTÉROTRIMÉRIQUE. 59

FIGURE 12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTOMÈRES DE RHODOPSINE ARRANGÉS EN COLONNES DE DIMÈRES.67

FIGURE 13 : FRET SÉQUENTIEL ENTRE 3 VARIANTS DE LA GFP 68

FIGURE 14 : SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT DES ESSAIS DE COMPLÉMENTATION DE PROTÉINE 69

FIGURE 15 : COMBINAISON DES MÉTHODES DE BRET ET BIFC 71

FIGURE 16 : REPRÉSENTATION TRIDIMENSIONNELLE DE LA STRUCTURE DU DIMÈRE CXCR4 85

FIGURE 17 : VOIES DE SIGNALISATION DE CXCR4 DÉPENDANTES DES PROTÉINES G. 90

FIGURE 18 : C-TERMINAL DE CXCR4 91

FIGURE 19 : VISUALISATION DU DIMÈRE CXCR4 EN MICROSCOPIE BRET 250

FIGURE 20 : LUMINESCENCE PCA *R*LUCII 254

FIGURE 21 : PROBABILITÉ DE RECONSTITUTION BILC-BIFC 257

FIGURE 22 : INFLUENCE DU LINKER SUR LE CHANGEMENT DE BRET . 259

FIGURE 23 : ABSENCE D'EFFET DU LINKER SUR D'AUTRES DIMÈRE DE RCPG 259

FIGURE 24 : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE POTENTIELLE D'UN TÉTRAMÈRE CXCR4 263

FIGURE 25 : DIMÈRE DE RÉCEPTEURS À LA DOPAMINE D2 - D2/GQI5 266

FIGURE 26 : DIMÈRE ALXR-BLT1 267

FIGURE 27 : BRET AVEC LES ARRESTINES DOUBLE BRILLANCE 273

FIGURE 28 : AUGMENTATION DU SIGNAL DE BRET ENTRE CXCR4-*R*LUC ET GFP2-ARRESTINES PAR SUREXPRESSION DE GRK2 274

FIGURE 29 : AUGMENTATION DU SIGNAL DE BRET ENTRE CXCR4-*R*LUC ET GFP2-ARRESTINES PAR SUREXPRESSION DE GRK6. 275

FIGURE 30 : ABSENCE D'ENGAGEMENT DE LA PROTÉINE GαS PAR CXCR4 EN RÉPONSE AU SDF-1 279

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : EXEMPLES D'HOMO ET HÉTÉRO-DIMÈRES RÉVÉLÉS PAR CO-IMMUNOPRÉCIPITATION 43

TABLEAU II : PRINCIPAUX VARIANTS DE GFP UTILISÉS COMME ACCEPTEURS D'ÉNERGIE EN BRET 1 ET BRET2. 47

TABLEAU III : DÉSIGNATION DES MUTATIONS DES *R*LUC2 ET *R*LUC8. 48

TABLEAU IV : LES DIFFÉRENTS VARIANTS DE GFP QUI ONT ÉTÉ UTILISÉS EN ESSAIS BIFC POUR L'ÉTUDE D'INTERACTIONS PROTÉINE – PROTÉINE, ET LEUR SITE DE TRONCATION. 69

TABLEAU V : LES DIFFÉRENTES LUCIFÉRASES QUI ONT ÉTÉ TRONQUÉES ET LEUR SITE DE COUPURE. 72

TABLEAU VI : CHIMIOKINES ET RÉCEPTEURS AUX CHIMIOKINES CC ET LEUR EXPRESSION CELLULAIRE. 75

TABLEAU VII : CHIMIOKINES ET RÉCEPTEURS AUX CHIMIOKINES CXC, XC ET C3XC ET LEUR EXPRESSION CELLULAIRE. 76

TABLEAU VIII : PRINCIPAUX LIGANDS DE CXCR4 83

TABLEAU IX : HOMO ET HÉTÉRO-DIMÈRES DE RÉCEPTEURS AUX CHIMIOKINES, ET LES MÉTHODES AYANT PERMIS LEUR DÉTECTION. 92

Il faut bien supporter deux ou trois chenilles si l'on veut un jour connaître les papillons… (Antoine de Saint Exupéry)

Abréviations

Å : angström

AC : adénylate cyclase

AGS : activateurs de la signalisation des protéines G hétérotrimériques

AGT : O^6-alkylguanine-DNA alkyltransférase

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP2 : protéines adapteurs

AT1 : angiotensine 1

BiFc : complémentation bimoléculaire de fluorescence

BiLC : complémentation bimoléculaire de luminescence

BRET : transfert d'énergie de résonance de bioluminescence

C : cystéine

C-terminale : carboxy-terminale

CFP : protéine fluorescente cyan

CGRP : récepteur du peptide relié au gène de la calcitonine

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CTX : toxine cholérique

D : aspartate

D1, D2 : récepteur dopamine 1 ou 2

DAG : diacylglycérol

DH : domaine hepta-hélical

DOR : récepteur des opiacés Delta

DPDPE :D-Penicillamine(2,5)-enkephalin

E/DRY : glutamate/aspartate-arginine-tyrosine

ERK : kinases régulées par les signaux extracellulaires

FP : récepteur des prostaglandines F

FRET : transfert d'énergie de résonance de fluorescence

FSH : hormone de stimulation des follicules

GABAb : acide γ-amino butyrique

GAG : glycosaminoglycanes
GDP : guanosine di-phosphate
GEF : facteur d'échange des protéines G hétérotrimériques
GFP : protéine fluorescente verte
GMPc : guanosine mono phosphate cyclique
GnRH : hormone de libération de la gonadotropine (gonadolibérine)
GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP : guanosine tri-phosphate
HIF1 facteur induit par l'hypoxie
IL-1 : interleukine 1
IT1t : isothio-urée
JAK : kinase janus
JNK3 : c-Jun N-terminal kinase
KDa : kilo-Daltons
KO : Knock out
KOR : récepteur des opiacés Kappa
LH : hormone lutéinisante (lutropine)
M4 : muscarinique 4
MAPK : protéines kinases activées par les mitogénes
MCP : peptide chimiotactique des monocytes
MEF : fibroblastes d'embryons de souris
mGlu1 : récepteur métabotropes du glutamate 1
N-terminale : amino-terminale
PAF facteur d'agrégation plaquetaire
PAM : modulateur allostérique positif
PAR1 : récepteur activé par les protéases 1
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
PCA : essai de complémentation de protéines
PDE : phosphodiestérase
PI3K : phosphoinositide 3 kinase

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PLC-β : phospholipase C-β

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate

PTHR : récepteur de l'hormone parathyroïde

PTX : toxine pertussique

R7TM : Récepteurs à 7 domaines transmembranaires

RAMP : protéine modifiant l'activité des récepteurs

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RE : réticulum endoplasmique

RGS : régulateurs de la signalisation des protéines G

*R*Luc *: Renilla* luciférase

SDF : facteur dérivé des cellules stromales

SRET : transfert d'énergie de résonance séquentiel

SST_{2A} : récepteur à la somatostatine $_{2A}$

STAT : transducteurs de signaux et activateurs de la transcription

TIRFM : microscopie de fluorescence par réflexion totale interne

TM : domaines transmembranaires

TNF-α : facteur de nécrose tumorale α

TSH : hormone de stimulation de la tyroïde

V2 : récepteur de la vasopressine 2

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VFT : piège à mouche vénus (!)

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

YFP : protéines fluorescentes jaunes

α2/β1/β2-AR : récepteurs adrénergiques α2/β1/β2

βARK : kinases des récepteurs β-adrénergiques

μOR : récepteur des opiacés Mu (μ)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de recherche, Michel Bouvier et Laurent Prezeau, et Monique. Michel, Laurent, vous avez été une source d'inspiration incroyable tout au long de ma thèse et sachez qu'être à vos côtés est une chance que j'ai appréciée à sa juste valeur. Merci Michel de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et donné la chance de travailler avec toi et ton équipe. Merci pour ton enthousiasme, dans la science, et dans tout le reste. Laurent, tout ça, c'est parti de toi, à l'IGF… de ta confiance en moi, alors je ne t'en remercierai jamais assez. Monique!!! L'incontournable du labo… notre boss, notre amie, notre mère à tous! Merci infiniment pour ton dévouement. Tes compétences n'ont d'égales que ta gentillesse.

Je tiens particulièrement à remercier ma petite famille, Sandra et Paul. Merci Sandra d'avoir soutenu un étudiant au doctorat pendant 4 ans, et d'avoir pris mon tour de vaisselle pendant la rédaction. Merci d'être là tous les jours à côté de moi, c'est comme ça que j'aime vivre. Paul, merci pour tes sourires inconditionnels et ta bonne humeur contagieuse. Tu ne le savais pas, mais tu m'as énormément aidé.

Merci à ma famille; à mes parents, Patrick et Michèle, qui en plus d'être des parents aimants, sont des personnes extraordinaires. Merci de m'avoir soutenu à chaque instant de ce très long parcours. Un grand merci aussi à ma sœur sœur Sophie, à Olivier, Mathis et Martin, et tout le reste de ma fabuleuse famille.

Je remercie sincèrement nos familles d'accueil au Québec : Nico, Eva, Véro, Alex, Caro, Lila, Jeff, Julie; merci pour tous ces moments extraordinaires, de rire et d'écoute.

Merci à l'équipe du lab : Billy en premier lieu qui m'a tout appris, Martin, Nick, Alex, Titi, Wayne, Joris, et tous les autres, pour la science et pour le rire. Merci à l'équipe de l'IGF à Montpellier.

Et enfin, merci à vous, mes inséparables amis; Chris, Rémi, Tchi^2, Mimo, Laurent et Laurent, Vince, Dimis, Tina, Aurélie.

Introduction

Communication cellulaire.

Aucune cellule ne vit de manière isolée. Les levures, les moisissures, les protozoaires, coordonnent l'agrégation des cellules libres grâce à la sécrétion de phéromones pour permettre la reproduction sexuée ou leur différentiation. Chez les plantes et les animaux, des molécules de signalisation extracellulaires agissant au sein de l'organisme contrôlent le métabolisme intracellulaire, la croissance et la différenciation des tissus, la synthèse et la sécrétion de différentes protéines. Pour des cellules adjacentes, la communication peut se faire par contact direct grâce à des jonctions lacunaires entre les membranes plasmiques permettant l'échange de molécules et d'autres jonctions vont permettre de déterminer la forme et la rigidité d'un tissu et ainsi d'ériger un organisme entier. Pour transmettre une information à distance, la cellule va synthétiser et sécréter des molécules de signalisation qui seront reconnues spécifiquement par les cellules portant les récepteurs à ces médiateurs. Le rôle du récepteur est de transduire le message extracellulaire porté par la molécule messagère en un signal identifié par la cellule cible comme un ordre de croissance, différenciation, contraction, apoptose ou migration. La spécificité de la communication inter-cellulaire est permise par une grande diversité de molécules messagères mais aussi de leurs récepteurs; ceux-ci peuvent être nucléaires et répondre spécifiquement à des molécules hydrophobes comme les stéroïdes et les rétinoïdes, ou bien localisés sur la membrane plasmique. Plusieurs grandes familles de récepteurs appartiennent à cette dernière catégorie; parmi eux les canaux ioniques, qui autorisent le passage d'ions à travers la membrane plasmique, les récepteurs enzymes (tyrosine kinase, récepteur TGFβ, récepteurs des cytokines), et les récepteurs couplés aux protéines liant la guanosine phosphate (protéines G), les RCPG, aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires (R7TM).

Les récepteurs couplés aux protéines G.

Les RCPG ou R7TM sont décrits comme la plus grande famille de récepteurs membranaires permettant la communication inter-cellulaire. Leur nom dérive de leur caractéristique commune: une séquence en acides aminés comportant 7 domaines hydrophobes pouvant s'insérer dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires (Baldwin, 1994). Le succès évolutif des RCPG a été de se diversifier suffisamment pour pouvoir répondre à une multitude de signaux chimiques: de quelques gènes à plus de 1000 encodant ces récepteurs ont été trouvés dans plusieurs génomes dont *Caenorhabdtibis elegans*, les rongeurs, et les humains (Bjarnadottir et al., 2006; Bockaert and Pin, 1999).

Les multiples rôles des RCPG dans la physiologie humaine impliquent cependant qu'un grand nombre de pathologies résultent d'un dysfonctionnement de ces récepteurs; plusieurs maladies neuro-dégénératives, cardio-vasculaires, inflammatoires, infections virales, cancers, leur ont ainsi été imputés (Schoneberg et al., 2004). Selon les auteurs, entre 25% et 60% des médicaments actuels sur le marché cibleraient un RCPG, illustrant l'importance de la recherche sur ces récepteurs (Hopkins and Groom, 2002; Panetta and Greenwood, 2008; Schoneberg et al., 2004).

Généralités sur les RCPG.

Le récepteur de la lumière, la rhodopsine bovine, fut le premier RCPG à être cloné (Nathans and Hogness, 1983). La caractéristique commune des RCPG, les sept domaines hydrophobes transmembranaires séparées des boucles hydrophiles (Baldwin, 1994), permettra par la suite de classer des centaines d'autres membres dans cette même famille.

Les RCPG ont pour la plupart une masse moléculaire variant de 40 à 85 kilo-Daltons (KDa) et une organisation semblable; un domaine amino-terminal extracellulaire, sept segments transmembranaires (TMI à TMVII) reliés par des boucles extracellulaires (e1 à e3) et des boucles intracellulaires (i1 à i3) et se terminent par une extrémité carboxy-terminale située à la face cytoplasmique de la cellule (Figure 1).

Une description simple du mode de fonctionnement d'un RCPG est que la liaison de l'agoniste provoque un changement conformationnel du récepteur capable de promouvoir l'activation des protéines G hétérotrimériques; celles-ci activent à leur tour différents effecteurs qui génèrent des seconds messagers intracellulaires tels que le calcium ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (figure 1).

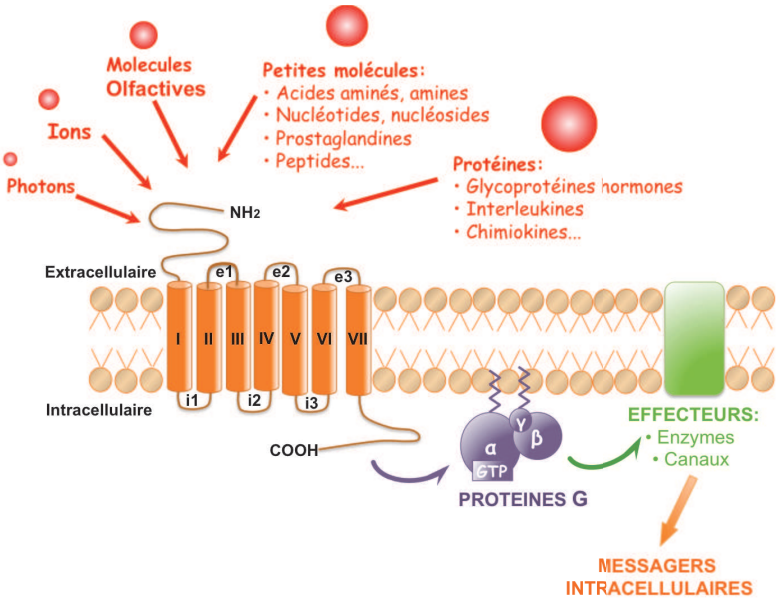


Figure 1 Représentation schématique d'un RCPG et de son fonctionnement

(Modifié d'après (Bockaert and Pin, 1999))

Les différentes classes de RCPG.

Les RCPG peuvent être divisés en 3 familles principales selon leurs critères structuraux et de liaison de ligand (Bockaert and Pin, 1999).

La classe 1 (A) est la plus représentée; elle comprend notamment le très étudié récepteur Rhodopsine, les récepteurs des amines biogènes, des prostaglandines, des molécules olfactives, des peptides dont les chimiokines, et des glycoprotéines. Une vingtaine d'acides aminés très conservés forment la signature de la classe A. Parmi les plus régulièrement décris, le motif E/DRY, qui est situé à l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) de la boucle i2, aurait pour rôle de stabiliser le récepteur dans sa conformation inactive et serait un élément capital permettant le couplage aux protéines G hétérotrimerique (Rosenbaum et al., 2009). Egalement, le motif NPXXY situé du côté cytoplasmique du TMVII participe à des changements conformationnels cruciaux associés à l'activation des RCPG (Barak et al., 1995; Yao et al., 2006). Deux cystéines sur les boucles extracellulaires e2 et e3 sont engagées dans un pont disulfure qui semble important pour le maintien de la conformation du récepteur. Un autre résidu à considérer est la cystéine (C) palmitoylée située sur l'hélice VIII (une hélice intracellulaire et parallèle à la membrane plasmique formée après le TMVII, (figure 3)) qui sert de point d'ancrage à la membrane plasmique et qui forme une quatrième boucle intracellulaire. Cette famille a elle-même été divisée en plusieurs sous groupes. *Le sous-groupe 1a* est formé par les récepteurs de petits ligands, ces derniers se fixant dans une cavité formée par les TMIII et TMIV. *Le sous-groupe 1b* comprend les récepteurs de peptides, dont la liaison nécessite l'extrémité N-terminale et les boucles extracellulaires du récepteur. Les récepteurs de chimiokines, qui sont le modèle utilisé dans les travaux présentés ici, font partie de ce sous-groupe. *Le sous-groupe 1c,* dont les membres possèdent une grande extrémité amino-terminale capable de lier les hormones glycoprotéiques telles que LH, TSH, FSH, qui contactent aussi les boucles e1 et e3 permettant l'activation du récepteur (Ji and Ji, 1995).

La classe 2 (B) est beaucoup plus restreinte en nombre. Elle se caractérise par un grand domaine N-terminal de 100 à 500 résidus pouvant lier de plus gros peptides comme le glucagon, le PACAP, le VIP ou la sécrétine. Des résidus cystéines de cette extrémité N-terminale sont engagés dans des ponts disulfures et sont hautement conservés dans cette famille. La topologie de ces récepteurs est semblable à celle de la famille 1c mais sans présenter d'homologie de séquence.

La classe 3 (C) est remarquable par son domaine extracellulaire très long (jusqu'à 800 résidus) servant à la liaison du ligand, appelé Venus Fly trap (VFT) (figure 2). Ce domaine dimérique qui a été cristallisé dans les années 2000 (Kunishima et al., 2000) présente une homologie de séquence et une structure similaire avec des protéines périplasmiques bactériennes (O'Hara et al., 1993). La classe C est représentée par les récepteurs métabotropes du glutamate et du GABA, qui sont respectivement les deux principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs du système nerveux central, ainsi que par les récepteurs du calcium, entre autres (Bockaert and Pin, 1999).

Classes supplémentaires.

Les récepteurs des phéromones de la levure constituent une quatrième classe de RCPG, et les récepteurs Frizzled et Smoothened qui sont impliqués dans le développement de la drosophile constituent la cinquième. Enfin, la famille 6 est composée des récepteurs de l'AMPc de l'amibe *Dictyostelium discoideum.*

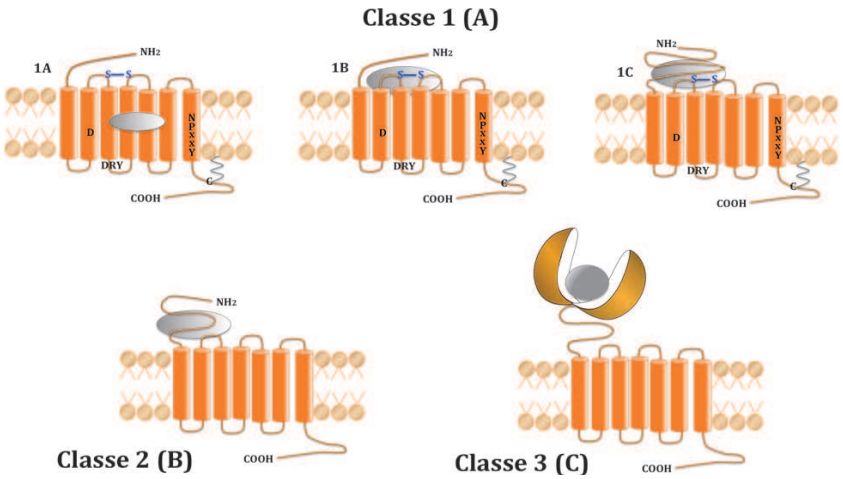


Figure 2 Représentation schématique des 3 familles de RCPG et de leurs sous-groupes (Modifié d'après (Bockaert and Pin, 1999)

Structure et activation des RCPG

Structure

La cristallographie a permis d'apporter une confirmation visuelle de la structure tridimensionnelle des RCPG qui avait été prédite majoritairement par des méthodes biochimiques; l'organisation spatiale des domaines transmembranaire, les résidus importants dans le maintien de la structure et pour l'activation du récepteur, ont ainsi pu être validés grâce aux progrès remarquables de la biologie structurale des RCPG durant les trois dernières années. La première structure cristallographique d'un RCPG activé par la liaison d'un ligand, le récepteur β2-adrénergique (β2-AR) (figure 3), à été résolue en 2007 par le groupe de Brian Kobilka (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007) suivie peu de temps plus tard par la résolution des structures de la rhodopsine de calmar (Murakami and Kouyama, 2008), l'opsine en absence de ligand (Park et al., 2008), l'opsine en interaction avec la protéine G (Scheerer et al., 2008), le récepteur à l'adénosine $A2_A$

(Jaakola et al., 2008) et enfin le récepteur β1-adrénergique (β1-AR) (Warne et al., 2008) et très récemment le récepteur CXCR4 (Wu et al., 2010). La révélation des structures de ces sept RCPG en un temps très limité est apparue 7 ans après la publication du tout premier cristal obtenu sur la rhodopsine bovine en 2000 par le groupe de Krzysztof Palczewski (Palczewski et al., 2000). Ce délai s'explique par le fait que les différents laboratoires ont dû trouver des conditions de stabilité thermodynamique des protéines et de minimiser la protéolyse qui atteint les boucles extracellulaires. Cela a été rendu possible entre autres par l'utilisation de ligands capables de stabiliser les structures des récepteurs β2-AR et $A2_A$, et de mutations stabilisatrices au sein du récepteur β1-AR. Egalement, en tronquant les régions désordonnées, en fusionnant une protéine correctement repliée et stables (lysozyme T4) ou encore en formant un complexe avec un fragment Fab d'un anticorps, les équipes sont parvenues à augmenter la stabilité du récepteur et diminuer la protéolyse.

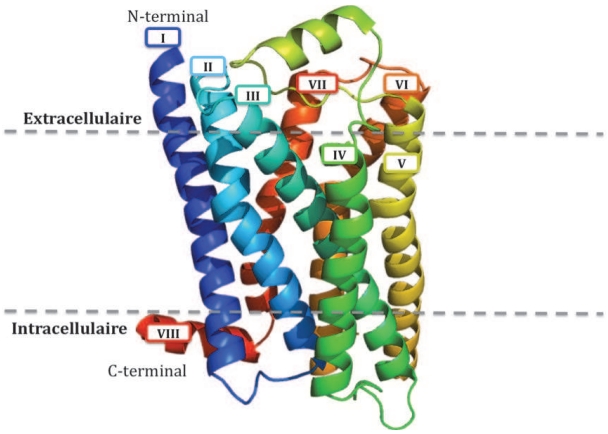


Figure 3 Structure tridimensionnelle du récepteur β2-AR

Les domaines transmembranaires (TM) sont numérotés de I à VII. Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMol avec le pdb 2RH1.

Les structures de cinq RCPG à l'état inactif car liés à des antagonistes / agonistes inverses permettent de confirmer une architecture globale similaire avec cependant quelques divergences; notamment, la deuxième boucle extracellulaire formerait un clapet protecteur sur la rhodopsine (dont le ligand est lié de façon covalente) alors que la poche de liaison sur les récepteurs à ligands diffusibles serait plus ouverte. Egalement, le « verrou ionique » (ionic lock) entre le motif E/DRY du TMIII et un résidu glutamate du TMVI est retrouvé dans toutes ces structures mais le réseau d'interactions polaires qui aurait pour rôle de stabiliser l'état inactif est retrouvé seulement dans la rhodopsine à l'état inactif et serait rompu dans les structures des récepteurs β1-AR, β2-AR, et $A2_A$. Le mécanisme d'activation des récepteurs par les ligands est une des questions fondamentales auxquelles la résolution des structures cristallographiques tente de répondre. En ce sens l'obtention de la structure de l'opsine liée au peptide C-terminal de la protéine G transducine (Gαt) est une avancée notable. Cependant, la co-cristallisation d'un récepteur avec une protéine G complète pourra donner une meilleure image d'un RCPG à l'état actif, et suggérer comment la liaison de l'agoniste est couplée à l'échange de nucléotides au niveau de l'interface récepteur – protéine G.

Certains cristaux ont également révélé la structure quaternaire des RCPG; par exemple la résolution de la structure d'un dimère de VFT d'un récepteur métabotrope du glutamate (Kunishima et al., 2000) et la très récente résolution de la structure du récepteur chimiokine CXCR4 en dimère (Wu et al., 2010) sont venues appuyer l'hypothèse de l'assemblage oligomérique des RCPG. Cette dernière structure sera abordée en détail par la suite.

Activation des RCPG et couplage aux protéines G

La stimulation des RCPG par liaison de leur agoniste à la surface extracellulaire induit un changement conformationnel qui permet l'activation des protéines G hétérotrimériques qui, à leur tour, activent des effecteurs (Bourne, 1997; Hamm, 1998). Des études sur la rhodopsine bovine montrent que l'activation du récepteur résulte en un large

mouvement vers l'extérieur de l'hélice VI, ouvrant ainsi une cavité à la surface intracellulaire, et que ce mouvement serait nécessaire à l'activation de la protéine Gαt *via* l'insertion de son extrémité C-terminale dans la structure de la rhodopsine. (Farrens et al., 1996) Cette observation, également faite sur le récepteur β2-adrenergique (Yao et al., 2006), a pu être confirmée par la structure cristallographique de l'opsine en interaction avec les 5 résidus de l'extrémité C-terminale de la protéine Gαt (α5) (Scheerer et al., 2008). Un modèle moléculaire s'appuyant sur cette dernière structure a permis de déterminer deux états d'interaction du fragment α5 avec les motifs E/DRY et NPxxY du RCPG qui sont appelés « stable » et « intermédiaire », et qui correspondent au passage de l'état lié du récepteur avant libération du GDP par la protéines G à l'état lié et sans nucléotide. La transition entre les deux états engendre une inclinaison à 42 degrés et une rotation à 90 degrés de l'α5 qu'ils nomment « transfert d'hélice » et qui illustrerait comment α5 servirait de levier de transmission pour propager le changement conformationnel du récepteur au site de liaison du nucléotide de Gαt (Scheerer et al., 2009). Les RCPG sont donc des GEF (G protein exchange factors) permettant l'échange du GDP en GTP sur les protéines G pour initier une réponse cellulaire.

Famille des protéines G hétérotrimériques.

Les protéines G sont composées de 3 sous-unités: α, β, et γ. Chez l'humain, on compte 21 sous-unités Gα codées par 16 gènes, 6 sous-unités Gβ codées par 5 gènes et 12 sous-unités Gγ (Downes and Gautam, 1999). Selon le modèle classique, les protéines G sont inactives dans l'état hétérotrimérique avec la sous-unité Gα liée au GDP (Etat 1). Lorsque le récepteur est stimulé, il change de conformation permettant la liaison de la protéine G et la libération du GDP par Gα. Lorsque le GDP est libéré, un complexe stable de haute affinité est formé entre le récepteur activé et la protéine G (Etat 2). La liaison du GTP à Gα déstabilise ce complexe et résulte en une dissociation permettant à Gα-GTP d'une part et Gβγ d'autre part d'activer leurs effecteurs (Etat 3) (Neer, 1995). L'état activé

persiste jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP par l'activité GTPasique intrinsèque de Gα, puis Gα et Gγβ se réassocient. Le cycle des protéines G peut être modulé par d'autres interacteurs tels que les activateurs de la signalisation des protéines G (AGS) (Blumer et al., 2007) ou les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) qui favorisent le retour à l'état inactif en facilitant l'hydrolyse du GTP (Koelle, 1997). Les protéines G hétérotrimériques sont donc considérées comme des interrupteurs moléculaires, allumés et éteints selon le cycle GTPasique (figure 4).

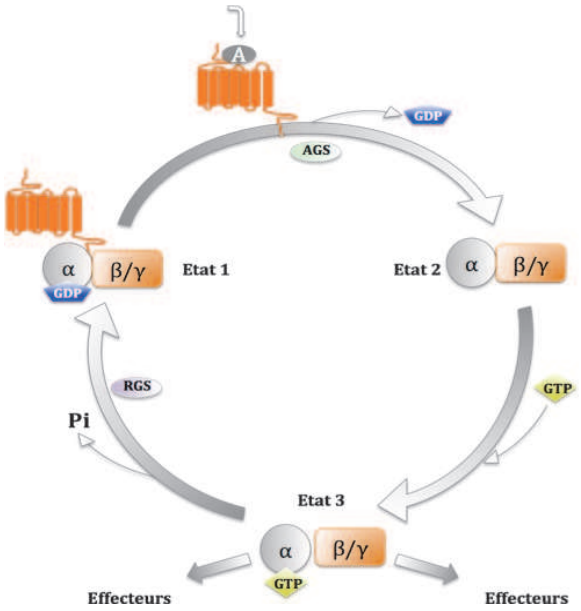


Figure 4 Cycle d'activation et d'inactivation des protéines G hétérotrimériques.

Les sous-unités Gα sont une famille protéique de 39 à 52 kDa (Gilman, 1987) qui ont été divisés en 4 classes principales en fonction de la similarité de leur séquence : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$, et qui donnent la classification générale des protéines G (détaillé plus loin). En prenant comme modèle la résolution des structures cristallographiques de la

transducine $G\alpha_t$ (Lambright et al., 1994; Noel et al., 1993; Sondek et al., 1994) et de la protéine $G\alpha_i$ (Coleman et al., 1994; Mixon et al., 1995) liées au GTPγs, GDP, et AIF4-, on observe qu'elles révèlent une structure commune faite d'un domaine GTPasique et d'un domaine hélical conservés. Le domaine GTPasique contient cinq hélices α entourant 6 feuillets β ainsi que des domaines de liaison pour le dimère Gβγ, les RCPG, et les effecteurs lorsque le GTP est lié (Mixon et al., 1995). Trois boucles flexibles importantes dans ce domaine sont nommées commutateurs (switches) I, II, et III et subissent des changement structuraux en fonction de la liaison du GDP ou du GTP (Lambright et al., 1994). Le domaine hélical de Gα est composé de 6 hélices α formant un couvercle protecteur sur la poche de liaison du nucléotide (Figure 5).

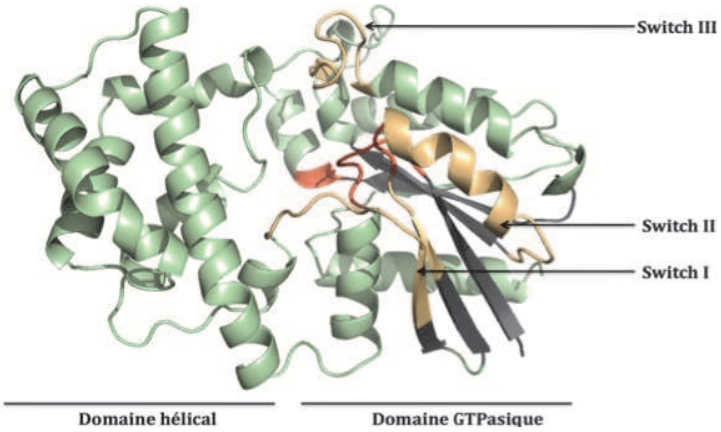


Figure 5 Représentation tridimensionnelle de la structure de la protéine Gαi

Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMol avec le pdb 1C1P. En vert : hélices α. Gris: feuillets β. Rouge : site de liaison du GTP. Orange : switches I, II, et III

Sous-familles des protéines Gα : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$

La voie de signalisation cellulaire **G_s** a été la première décrite et plusieurs concepts clé tels que la production de seconds messagers (Sutherland and Wosilait, 1955) ont été étroitement liés à sa caractérisation. Cette sous-famille englobe $G\alpha_s$ qui est exprimée de

manière ubiquitaire et $G\alpha_{olf}$ qui est localisée principalement dans le neuroépithelium olfactif et à un faible taux dans le cerveau. Les Gαs sont capables d'activer l'adénylate cyclase (AC), un effecteur important de la signalisation qui convertit l'ATP en AMPc, permettant notamment l'activation de la protéine kinase A (PKA). L'ADP ribosylation par la toxine du cholera (CTX, produite par la bactérie *Vibrio Cholerae*) de résidus situés dans le site catalytique bloque l'activité GTPasique des $G\alpha_s$ provoquant une stimulation permanente de l'AC et par conséquent une accumulation d'AMPc dans la cellule (Gill and Meren, 1978; Robishaw et al., 1986).

La sous-famille **G_i** comprend $G\alpha_{i1,2,3}$, les sous unité $\alpha_{o1,2}$, ainsi que les transducines de la rétine, avec dans les cellules en cônes α_{t1} et dans les cellules en bâtonnet α_{t2}, la gustducine α_{gust} dans les cellules gustatives, et α_z majoritairement dans les plaquettes sanguines. La voie de signalisation de cette famille de protéine G a été initialement identifiée par sa capacité à inhiber l'activité de l'AC (Hazeki and Ui, 1981) et donc à réduire la concentration en AMPc intracellulaire. La toxine pertussique PTX produite par *Bordetella pertussis* est capable d'ADP ribosyler un résidu cystéyl de l'extrémité C-terminale de α_i, α_o, α_t, et α_{gust}, ce qui empêche l'interaction récepteur - protéine G et inhibe l'effet des agonistes (Katada and Ui, 1982). La signalisation des récepteurs couplés à Gi s'effectue par la sous-unité Gα mais aussi par Gβγ qui activent indirectement les petites GTPases Ras et directement au moins 4 effecteurs : la phospholipase C-β (PLC-β), les canaux K+, l'AC, et la phosphoinositide 3 kinase (PI3K). La sous famille des protéines $G\alpha_t$ activent quant à elles une phosphodiesterase (PDE) spécifique de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans les cellules en bâtonnet de la rétine (Miki et al., 1973).

La famille **Gq** comprend les sous-unités α_q et α_{11} qui sont largement réparties, α_{14} et α_{15} qui sont exprimées surtout dans les cellules hématopoïétiques, et α_{16}. Les membres de cette famille ne sont pas sensibles à l'ADP ribosylation par les deux toxines décrites précédemment. La mobilisation de cette voie stimule la PLC-β qui clive le

phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2) pour générer les seconds messagers inositol triphosphate (IP3) (Rhee, 2001) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 déclenche une libération de calcium des stocks intracellulaires et le DAG recrute à la membrane et active certaines protéines kinases C (PKC).

La famille **G_{12}** regroupe α_{12} et α_{13}. Il est désormais bien établi que $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ régulent l'activité des petites GTPases Rho *via* le facteur d'échange du nucléotide guanine Rho-GEF et modulent diverses réponses cellulaires telles que la croissance cellulaire, la polarité cellulaire et la migration (Offermanns et al., 1997; Xu et al., 2003b). P115-Rho-GEF a été le premier effecteur direct des G_{12} identifié (Hart et al., 1998; Kozasa et al., 1998); depuis, des études en double hybride sur la levure ont identifié plus de 20 protéines interagissant directement avec la famille G_{12} (Kelly et al., 2007). Un effecteur important de la signalisation de G_{12} est la GTPase monomérique RhoA, qui est un régulateur de la formation des fibres de stress d'actine et d'assemblage des adhésions focales, ainsi que de la croissance cellulaire (Hall, 1998; van der Linden et al., 2003). De plus, on impute désormais à la mauvaise régulation de cette voie de signalisation l'apparition de plusieurs pathologies : leucémie, hypertension, invasion cellulaire et métastases cancéreuses (Kelly et al., 2006; Kourlas et al., 2000; Tan et al., 2006; Wirth et al., 2008).

Le dimère Gβγ

Le modèle historique d'activation des protéines G propose que le récepteur stimulé par un agoniste catalyse l'échange de GDP en GTP sur la sous-unité Gα, induisant un changement conformationnel qui diminue fortement l'affinité de Gα pour le dimère Gβγ. Cette diminution d'affinité permettrait à Gβγ de se dissocier de Gα et du récepteur, pour activer subséquemment ses effecteurs jusqu'à ce que l'hydrolyse du GTP par Gα permette aux sous-unités de se réassocier, désactivant les protéines G jusqu'à une prochaine interaction avec le récepteur (Neer, 1995). Les sous-unités β et γ forment une unité fonctionnelle qui ne peut être dissociée que dans des conditions dénaturantes (Schmidt et al., 1992). Cette interaction forte mais non covalente se produit dans le cytosol avant

l'attachement à la membrane et avant les modifications protéolytiques de Gγ qui seront décrites plus loin.

Les sous-unités β qui ont un poids moléculaire d'environ 36 kDa sont très conservées, partageant entre elles une identité en acides aminés de 50 à 83%. Elles sont composées de deux domaines: une région N-terminale en hélice α amphipatique formant une superhélice (coiled coil) avec le N-terminal de la sous-unité γ, suivie d'une hélice de feuillets β (β propeller) à 7 pales composée d'une répétition de 7 séquences WD40. Les pales 5 et 6 interagissent avec le C-terminal de Gγ (figure 6). Les séquences WD40 sont des motifs d'environ 40 acides aminés se terminant par un tryptophane et un aspartate, que l'on retrouve sous forme d'unités répétées, formant une hélice de feuillets β et servant aux interactions protéine - protéine.

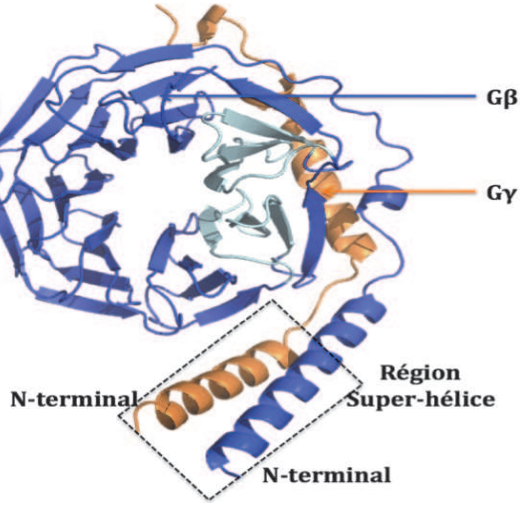


Figure 6 Représentation tridimensionnelle de la structure des protéines G

Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMol à partir du pdb 1GG2. En bleu : $G\beta_1$. Orange : Gγ. Cyan : pales 5 et 6 de Gβ qui interagissent avec Gγ.

Les sous-unités γ, d'un poids moléculaire de 6 à 9 kDa, sont quant à elles plus divergentes avec une homologie de séquence en acides aminés variant de 27 à 75%, raison

pour laquelle il est suggéré que c'est cette sous-unité qui définirait la spécificité du complexe Gβγ. Tel que mentionné plus haut et illustré par la figure 6, l'interaction entre Gβ et Gγ se fait grâce à la structure en superhélice des deux extrémités N-terminales et par les hélices 5 et 6 de la structure toroïdale; il a cependant aussi été décrit que l'extrémité C-terminale de Gβ pouvait interagir avec Gγ (Katz and Simon, 1995). De plus, une étude utilisant des chimères $\gamma_1\gamma_2$ à pu montrer qu'une région de 14 acides aminés de Gγ (acides aminés 33 à 46) était suffisante pour conférer la spécificité d'interaction à Gβ (Spring and Neer, 1994).

L'hétérotrimère Gαβγ

Les 2 structures cristallographiques des trimères $G\alpha_i\beta_1\gamma_1$ (Lambright et al., 1994) et $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ (Wall et al., 1995) seront pris en exemple : elles ont largement aidé à confirmer les interfaces d'interaction entre les 3 sous-unités, souvent en validant les données biochimiques obtenues auparavant. Elles révèlent que les commutateurs I et II (Switch I et II) ainsi que les brins β numéro 2 et 3 de la sous-unité α(GDP) formeraient une poche hydrophobe d'interaction avec les feuillets β5, 6, et 7 de la sous-unité Gβ. L'hélice N-terminale de Gα formerait également une interaction avec Gβ mais dans une moindre mesure. Aucune de ces structures ne prouve cependant l'existence d'un contact entre Gα et Gγ, même si l'acétylation de l'extrémité N-terminale Gα et C-terminale de Gγ sont extrêmement proches et pourraient s'insérer dans la membrane plasmique de manière coopérative (Seitz et al., 1999).

Interaction de l'hétérotrimère avec le récepteur.

La combinaison des 21 protéines Gα avec les 12 sous-unités γ et les 5 sous-unités β pourrait former des centaines de complexes différents pouvant se lier à la grande diversité de RCPG existants. Cependant il a été démontré qu'un nombre restreint d'associations avait effectivement lieu en raison notamment de limitations structurales (Lee et al., 1995a; Pronin and Gautam, 1992); il en résulte que certains complexes hétérotrimériques semblables peuvent s'associer à des récepteurs différents. De plus, un nombre croissant

d'études montre désormais que les RCPG peuvent s'associer et signaliser *via* différentes protéines G. Il existe donc des éléments qui déterminent la spécificité d'interaction entre les récepteurs et les protéines G et qui permettraient une régulation appropriée de la transduction du signal; au delà des éléments structuraux, la prédominance de l'expression tissulaire des différents partenaires semble évidemment cruciale.

Des sites d'interactions des trois sous-unités α, β, et γ avec le récepteur ont été rapportés, chacun apportant une spécificité au couplage. Comme mentionné plus haut, le principal motif d'interaction de la protéine **Gα** avec le récepteur est représenté par les 5 derniers acides aminés de son extrémité C-terminale (Scheerer et al., 2009; Scheerer et al., 2008). L'importance de ce site peut être mise en évidence par le découplage complet d'une protéine Gi suite à l'ADP ribosylation d'une cystéine C-terminale par la PTX. Cette portion C-terminale, aussi appelée α5, est également déterminante dans la spécificité de couplage du RCPG à la protéine G, tel que démontré dans des études utilisant des chimères de protéines G; par exemple, le remplacement du C-terminal de la protéine G_q par celui de la protéine Gi pour former la chimère G_{qi5}, qui est capable de coupler des récepteurs G_i mais de stimuler les effecteurs de G_q, notamment la PLC-β, et de générer une réponse calcique (Conklin et al., 1993). L'extrémité N-terminale des Gα serait elle aussi importante dans la spécificité de couplage au récepteur; des mutants de $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ amputés de leurs 6 premiers acides aminés sont capables de générer des inositol phosphate en réponse à la stimulation de récepteurs couplés G_i ou G_s, alors que les G_q sauvages n'en sont pas capables (Kostenis et al., 1997). Enfin, les boucles αN-β1, α2-β4 et α3-β5 ont également été impliquées dans la spécificité de couplage de $G\alpha_{16}$ à mGlu2, au récepteur du complément C5a, et au couplage de G_s au récepteur β2-adrénergique respectivement (Blahos et al., 2001; Grishina and Berlot, 2000; Lee et al., 1995b).

Les portions C-terminales des sous-unités Gβ et Gγ pourraient elles aussi contacter le récepteur; les 60 derniers acides aminés du C-terminal de la sous-unité β_1 seraient ainsi impliqués dans l'interaction avec le récepteur α2-adrenergique, impliquant les séquences

répétées du 7ème WD40 (Taylor et al., 1996). Également, une étude menée par mutation de résidus en alanine a pu déterminer l'importance de la partie C-terminale de $G\gamma_t$ dans la liaison et l'activation de la rhodopsine (Kisselev and Downs, 2006).

Selon ces données, les trois sous-unités du trimère $G\alpha\beta\gamma$ seraient capables de lier le récepteur, chacune ayant un rôle dans son activation. Cependant, même si aucun co-cristal de RCPG avec l'hétérotrimère n'a encore été obtenu, la mise en parallèle des données semble indiquer que la surface de contact de l'hétérotrimère serait trop étendue pour accueillir un seul RCPG, donnant alors une argument structural à la dimérisation de ces récepteurs; cette notion sera abordée par la suite en détail.

Au niveau des récepteurs, la faible homologie de séquence des boucles intracellulaires impliquées dans le couplage aux protéines G complique la compréhension de la spécificité de couplage (Wess, 1998), surtout si l'on considère que plusieurs protéines G peuvent coupler un même RCPG. De nombreuses études par délétion ou mutation montrent cependant une implication majeure des boucles intracellulaires i_2 et i_3 (Wess, 1997); mais l'intégralité des conformations du récepteur étant importante dans l'activation des protéines G, de nombreux résidus distants des sites d'interactions directs peuvent s'avérer également cruciaux. Le concept de « texture » du ligand selon lequel la nature de l'agoniste engendre différents états conformationnels du récepteur qui favorisent le couplage à une protéine G plutôt qu'à une autre, appuie cette notion de spécificité de couplage liée à l'état du récepteur (Kenakin, 2003).

Controverse de la dissociation Gα-Gβγ

Les fondements moléculaires supportant l'idée que l'activation de la protéine $G\alpha$ et du dimère $\beta\gamma$ dépendrait de la dissociation de la sous-unité α et que leur réassociation inhiberait la signalisation viennent d'études sur des mutants qui concluent que les régions impliquées dans l'activation des effecteurs par $\beta\gamma$ sont les mêmes que celles permettant la liaison à la sous-unité α (Ford et al., 1998; Li et al., 1998). $\beta\gamma$ serait donc inactif dans sa forme hétérotrimérique. Cette hypothèse est appuyée entre autres par la résolution de la

structure cristallographique de $G\alpha_q$ en complexe avec $G\beta\gamma$ qui rapporte un état activé dans lequel G_q est totalement dissociée et désaxée de $G\beta\gamma$ par rapport à l'état de l'hétérotrimère inactif (Tesmer et al., 2005). Cependant, de nombreuses données biochimiques et cinétiques appuient un modèle dans lequel la dissociation des sous-unités ne serait pas nécessaire à l'activation des protéines G. Par exemple, l'expression d'une protéine de fusion $G\alpha$-$G\beta$ chez la levure est capable d'induire la signalisation aussi efficacement que les protéines $G\alpha$ et $G\beta$ exprimées individuellement (Klein et al., 2000). Comme la fusion ne permettait pas une dissociation physique complète des sous-unités, il a été proposé que l'activation de l'hétérotrimère se fasse par un changement conformationnel. La plupart des arguments récents qui alimentent l'hypothèse du changement conformationnel viennent d'études menées par les techniques de transfert d'énergie de résonance de Förster ou de bioluminescence, le FRET et le BRET. Dans le laboratoire du Dr. Bouvier, Gales et *al*. montrent que suite à la stimulation du récepteur α2-adrénergique, le signal de BRET entre $G\gamma_2$ fusionnée à la protéine accepteur d'énergie GFP2 (pour green fluorescent protein) et $G\alpha_i$ fusionnée à la protéine donneur d'énergie *Rénilla* luciférase (*R*Luc)ne varie pas dans la même direction si la luciférase est insérée en 3 positions différentes de $G\alpha$ (Gales et al., 2006). Si une diminution de signal est observée dans deux positions et une augmentation dans la troisième, alors l'activation de l'hétérotrimère procède vraisemblablement d'un changement conformationnel entre les sous-unités plutôt que d'une dissociation de celles-ci.

Controverse du précouplage entre le récepteur et les protéines G.

A l'origine, il a été proposé que le couplage des récepteurs aux protéines G se fassent par un mécanisme de collision (Orly and Schramm, 1976; Tolkovsky and Levitzki, 1978). Dans ce modèle les récepteurs et protéines G diffusent librement dans le plan de la membrane, et une interaction fonctionnelle n'a lieu que lorsque le récepteur est activé. Des études récentes menées en FRET supportent l'hypothèse de la collision en démontrant d'une part l'absence d'interaction entre le récepteur et les protéines G lorsque le récepteur

n'est pas stimulé, et d'autre part que la cinétique de formation des complexes dépendait de la concentration de Gα (Hein et al., 2005). Cependant, considérant qu'une centaine de RCPG différents sont exprimés dans une cellule avec également un nombre important de protéines G, et que la signalisation cellulaire doit être ciblée et rapide, ce modèle a été remis en cause au début des années 90 (Neubig, 1994) et d'autres modèles sont alors apparus. L'un d'eux propose que les protéines G et les récepteurs diffusent librement mais soient compartimentalisés dans des microdomaines et se couplent lors de la stimulation par l'agoniste (Neer, 1995; Neubig, 1994). Dans ce cas, la spécificité viendrait du nombre restreint d'interactions entre les éléments au sein de ce compartiment, et une concentration locale élevée expliquerait que la signalisation par le RCPG se fasse dans l'ordre de la milliseconde (Gross and Lohse, 1991). Enfin, un modèle encore dominant aujourd'hui postule que le récepteur et les protéines G soient précouplés même en absence d'agoniste (Neubig et al., 1988); ce modèle est particulièrement pertinent pour expliquer la spécificité de signalisation. Les travaux de Gales et *al*. précédemment cités appuient ce modèle à travers l'observation d'un transfert d'énergie basal de BRET (en absence d'agoniste) entre le récepteur α2-adrénergique et la protéine $G\alpha i_1$ (Gales et al., 2006). Également, une étude en FRET démontrait d'une part des dimères de récepteurs α2-adrénergiques et muscariniques M4 à la membrane, et d'autre part que ces récepteurs sont précouplés de manière spécifique à l'hétérotrimère $\alpha_o\beta_1\gamma_2$ (Nobles et al., 2005). Enfin très récemment, une étude menée dans le laboratoire du Dr. Pin à démontré que plusieurs de ces solutions pouvaient coexister; en effet les auteurs constatent que le récepteur PAR-1 est préassemblé à la protéine $G\alpha_{i1}$ qu'il peut activer rapidement (t1/2 = 4.13s), mais qu'il est capable également de recruter $G\alpha_{12}$ avec une cinétique très différente (t1/2 = 8.8min). Les données obtenues suggèrent que les deux modes d'interactions observés sont en fait dus à l'activation de deux populations différentes de récepteurs PAR-1, apportant une autre explication à la diversité de couplage des RCPG où un seul récepteur peut activer de multiples voies de signalisation dépendantes ou non des protéines G (Ayoub et al., 2010).

La complexité de la réponse cellulaire suite à l'activation par un seul ligand est la conséquence de la diversité des effecteurs engagés comme le montre l'exemple précédent.

Le couplage multiple aux protéines G a pu être démontré entres autres dans des études indiquant que des récepteurs couplés à $G\alpha_{i/o}$ qui inhibent l'adénylate cyclase pouvaient aussi hydrolyser les phosphoinositides de manière insensible à la PTX (Crawford et al., 1992). La stimulation et l'inhibition concommitantes de l'adénylate cyclase par un même RCPG a également été rapportée dans le cas du récepteur adrénergique α2-AR (Fraser et al., 1989). Enfin une preuve fonctionnelle a été obtenue par la mesure quantitative de l'échange GDP-GTP par les sous-unités $G\alpha_s$ et $G\alpha_{q/11}$ avec les récepteurs de la tyrotropine et de la dopamine D1 (Allgeier et al., 1997; Jin et al., 2001), mais aussi les sous-unités $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_{q/11}$ du récepteur adénosine A3(Palmer et al., 1995). Certains récepteurs sont même décrits comme couplant à trois ou quatre classes de protéines G (Laugwitz et al., 1996). Ainsi, en contraste avec le paradigme énonçant qu'un récepteur interagit avec une protéine G en particulier, plusieurs exemples ont prouvé que le couplage fonctionnel avec des protéines G distinctes est possible.

Arrêt de la signalisation

La stimulation des RCPG et de leurs effecteurs par des agonistes conduit à une série d'évènements coordonnés qui aboutissent à la désensibilisation de la signalisation cellulaire en découplant le récepteur des protéines G d'une part et en l'internalisant d'autre part, pour le rendre inaccessible aux agonistes. Quatre processus peuvent être distingués: la désensibilisation, l'internalisation, et le recyclage des récepteurs à la surface cellulaire ou leur dégradation. Les quatre évènements sont classiquement décrits selon la séquence suivante; la liaison de l'agoniste entraîne la phosphorylation du récepteur par les kinases spécifiques des RCPG (GRK) qui permet le recrutement des β-arrestines. Ces dernières découplent physiquement le récepteur des protéines G et recrutent la clathrine ainsi que le complexe AP2, permettant l'endocytose par les puits de clathrine (figure 7). Les récepteurs sont ensuite adressés aux lysosomes pour dégradation ou recyclés à la membrane plasmique.

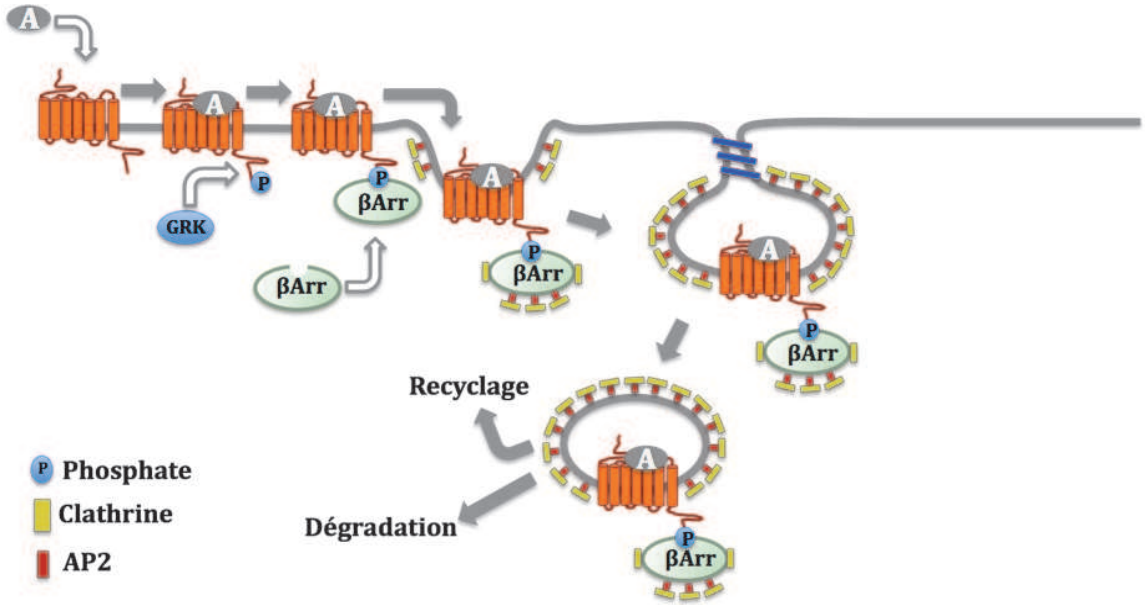


Figure 7 Désensibilisation, internalisation, et recyclage / dégradation des RCPG

La désensibilisation est initiée par la phosphorylation du récepteur suivant la liaison de l'agoniste; elle peut être effectuée par deux types de kinases menant à une désensibilisation dite hétérologue ou homologue du récepteur.

Désensibilisation hétérologue

Elle résulte de l'action de kinases dépendantes des seconds messagers telles que la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) ou la PKC, qui phosphorylent des sérines et thréonines dans les boucles cytoplasmiques et la queue C-terminale du récepteur. La phosphorylation par ce type de kinases serait suffisante pour diminuer l'affinité du récepteur à la protéine G (Benovic et al., 1985). Le récepteur ciblé par ces kinases n'a pas besoin d'être lié par son agoniste et peut donc être désensibilisé par d'autres récepteurs, d'où son nom de désensibilisation hétérologue (Lefkowitz, 1993).

Désensibilisation homologue et GRK

Ce type de désensibilisation est effectué par les GRK et suivi par la liaison de la β-arrestine (figure 7). Il existe 7 GRK différentes décrites à ce jour partageant des similarités structurales : un corps catalytique central, une partie N-terminale de taille semblable responsable de la reconnaissance du récepteur, et une partie C-terminale plus variable impliquée dans la localisation cellulaire de la kinase (Willets et al., 2003). GRK1 et GRK7 sont des kinases rétiniennes qui sont exprimées presque exclusivement dans les yeux; GRK1 est responsable de la phosphorylation de la rhodopsine (Lorenz et al., 1991) et GRK7 régulerait spécifiquement l'opsine des cellules en cônes (Weiss et al., 1998). GRK2 et GRK3 sont les premières a avoir été identifiées à la fin des années 80 sous le nom de βARK1 et βARK2 pour β-adrenergic receptor kinases 1 et 2; elles sont très représentées dans les tissus et sont capables de phosphoryler un grand nombre de RCPG. Leur partie C-terminale est constitué d'un domaine de liaison aux protéines Gβγ de 125 acides aminés contenant une séquence « homologue aux plekstrines » (Koch et al., 1993). De manière importante, ce domaine d'interaction avec Gβγ servirait à la translocation de GRK2 et GRK3 à la membrane plasmique (Pitcher et al., 1992). Cette caractéristique les différencie de GRK4 et GRK6 qui se situent constitutivement à la membrane en raison de la palmitoylation de leur domaine C-terminal (Willets et al., 2003). D'un point de vue tissulaire, GRK4 se situerait majoritairement dans les testicules alors que GRK6 est exprimée dans un grand nombre de tissus (Premont et al., 1999). Enfin, GRK5, largement représentée dans les tissus également, est localisée aussi à la membrane grâce à une interaction entre les résidus basiques de son C-terminal et les phospholipides membranaires (Willets et al., 2003). On peut ainsi conclure de la localisation tissulaire de ces kinases que la plupart des RCPG dans l'organisme sont potentiellement phosphorylables par les GRK 2, 3, 5, et 6. Tout comme les kinases dépendantes des seconds messagers, les GRK phosphorylent les serines et thréonines de la troisième boucle intra cellulaire et du C-terminal des récepteurs; par contre leurs cibles seront préférentiellement les RCPG activés par leur ligand. Il est important de noter que la simple phosphorylation des RCPG n'est pas suffisante pour découpler les RCPG des protéines G; c'est l'augmentation d'affinité et le recrutement des β-arrestines au récepteur résultants de la phosphorylation qui permettent la désensibilisation homologue (Lohse et al., 1992). Les multiples sites de phosphorylation présents sur un récepteur et la récurrence de

plusieurs types de GRK dans les cellules conduisent à de nombreuses possibilités de régulation du récepteur par ces kinases (Ren et al., 2005).

β-arrestines

Les arrestines sont des protéines solubles majoritairement cytoplasmiques dont la première fonction décrite était la désensibilisation des RCPG. Leur capacité à lier ces récepteurs à la machinerie d'internalisation (AP2 et clathrine) a été interprétée comme une extension naturelle de cette première fonction. Par la suite, la découverte que les β-arrestines pouvaient interagir directement avec les tyrosines kinases de la famille src (Luttrell et al., 1999) ont suggéré qu'elles pouvaient avoir un rôle plus large d'adaptateur permettant le recrutement de protéines de signalisation au RCPG activé. Il est aujourd'hui reconnu que les arrestines ont un rôle majeur dans l'activation de certaines voies de signalisation, notamment les voies des MAPK ERK1/2 (DeFea et al., 2000; Luttrell et al., 1999) et JNK3 (McDonald et al., 2000).

La famille des arrestines se divise en deux groupes : les arrestines visuelles ou sensorielles (arrestines 1 et 4) et les arrestines non visuelles (arrestines 2 et 3 ou β-arrestines 1 et 2). Les arrestines 2 et 3 dont il sera question dans cet exposé ont été découvertes dans les années 90 par l'équipe du Dr. Lefkowitz (Attramadal et al., 1992; Lohse et al., 1990). Elles sont exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus et partagent un haut degré d'homologie entre elles. La résolution cristallographique de 3 arrestines chez les vertébrés révèle une molécule allongée avec deux domaines N et C-terminaux se faisant face, séparés par un cœur polaire (polar core) servant de senseur pour le phosphate du récepteur activé (Gurevich and Gurevich, 2006). L'orientation relative des deux domaines dans la conformation basale est maintenue par deux structures formant des fermoirs qui se détacheraient lors de la liaison du phosphate du récepteur, entraînant un changement conformationnel global de l'arrestine (Gurevich and Gurevich, 2004) .

La désensibilisation serait la conséquence d'un découplage entre le récepteur et la protéine G provoqué par le recrutement de l'arrestine au récepteur; la découverte que l'arrestine pouvait occuper la cavité créée par le réarrangement des hélices α de la

rhodopsine (Gurevich and Gurevich, 2006) qui est également le site de liaison de la transducine (Janz and Farrens, 2004) était donc attendue. Aussi, il a été démontré que le motif DRY du récepteur CCR5 devait être intact pour une interaction correcte entre la boucle i2 du récepteur et l'arrestine, révélant le chevauchement des surfaces de liaison des protéines G et arrestines (Huttenrauch et al., 2002).

L'internalisation médiée par les β-arrestines à lieu quelques minutes après la stimulation du récepteur par l'agoniste. Les β-arrestines contiennent deux motifs qui leur permettent de fonctionner comme des protéines adaptatrices entre le récepteur et la machinerie d'endocytose. Elles sont capables de lier la clathrine avec une forte affinité (Goodman et al., 1996) par une région de leur extrémité C-terminale, entre les résidus 374 et 377 (Krupnick et al., 1997) ainsi que la sous-unité β2 adaptine du complexe hétérotétramérique AP-2 grâce à une séquence RxR située entre les résidus 394 et 396 (Laporte et al., 1999). Le complexe AP2 qui est impliqué dans l'initiation de la formation des puits de clathrine connecte le récepteur à la machinerie d'endocytose par sa liaison avec la clathrine, la dynamine, et EPS15 (Kirchhausen, 1999). Une fois la vésicule formée, la GTPase dynamine permet l'étranglement de la membrane et l'internalisation du complexe β-arrestine – récepteur (Zhang et al., 1996). Les récepteurs peuvent alors prendre deux voies : 1- les RCPG lient de manière transitoire la β-arrestine2 (Oakley et al., 2000), se dissocient rapidement et la β-arrestine est recyclée vers la membrane plasmique alors que le récepteur est adressé aux endosomes; on parle alors de récepteur de classe A (Zhang et al., 1999). C'est le cas par exemple des récepteurs β2-AR et α_{1b}-AR, opïoides μOR, et D_{1A} de la dopamine. Les récepteurs dits de classe B tel que vasopressine V_2 ou angiotensine AT_{1a}, ont la même affinité pour les β-arrestines 1 et 2 avec qui elles forment un complexe stable qui est adressé aux endosomes (Oakley et al., 2000). La formation de complexes récepteur - β-arrestine transitoires favoriseraient une déphosphorylation rapide et le retour à la membrane plasmique alors que les complexes stables retardent la resensibilisation et pourraient favoriser l'adressage des récepteurs vers la machinerie de dégradation. Les caractéristiques structurales déterminant la stabilité du complexe ont été identifiées dans

des groupements de serines/thréonines sur l'extrémité C-terminale du récepteur et celle de la β-arrestine (Oakley et al., 2001).

La distinction des fonctions des deux arrestines vient d'une étude utilisant des fibroblastes issus d'embryons de souris (MEFs) n'exprimant plus la β-arrestine 1 (knockout ou KO β-arrestine 1), la β-arrestine 2, ou les deux β-arrestines (Kohout et al., 2001). Dans les cellules n'exprimant ni l'une ni l'autre des arrestines, l'accumulation d'AMPc est augmentée par l'activation du récepteur β2-adrénergique, et l'est d'avantage dans les cellules n'exprimant aucune arrestine. Les deux protéines ont donc une fonction similaire dans la désensibilisation. En revanche, l'internalisation du récepteur β2-adrenergique n'est pas affectée dans les MEFs KO pour la β-arrestine 1 alors qu'elle est diminuée dans les cellules KO pour la β-arrestine 2 et totalement inhibée dans les cellules double KO. Concernant leur rôle dans la signalisation, il a été montré que la β-arrestine 2, mais pas la β-arrestine 1, servait d'adaptateur pour les kinases de la cascade JNK3 menant à l'activation et la rétention cytosolique de JNK3 (McDonald et al., 2000). Il ne fait aucun doute que de nombreuses fonctions distinguent ces deux variants; entres autres, il est actuellement suggéré qu'un RCPG phosphorylé par des GRK différentes donnerait des fonctionnalités distinctes à la β-arrestine (Ren et al., 2005) mais pourrait aussi mobiliser l'une ou l'autre des arrestines pour désensibiliser préférentiellement certaines voies de signalisation ou en activer d'autres; c'est le cas du récepteur de chimiokine CXCR4 qui sera abordé dans la section résultats (Busillo et al., 2010) .

Oligomérisation des RCPG

La formation d'un complexe fonctionnel par oligomérisation de plusieurs polypeptides est un concept très courant en signalisation cellulaire. Les RCPG ont pourtant longtemps été considérés comme des monomères obéissant au paradigme selon lequel un ligand activait un seul RCPG, pouvant lui même activer une seule protéine G (Bourne et al., 1990) même s'il ne permettait pas d'expliquer les phénomènes de coopérativité observés

sur le récepteur β2-adrénergique dès les années 1975. Depuis, plusieurs dizaines d'études utilisant des techniques biochimiques et biophysiques ont pu démontrer l'existence d'oligomères composés d'au moins deux protomères identiques (homodimères) ou de deux protomères différents (hétérodimères); pour une revue exhaustive, voir (Khelashvili et al., 2010). Cependant, si la formation de dimères obligatoires par les RCPG de classe C, notamment le récepteur GABAb (Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998) n'est plus contestée, l'existence des dimères de classe A reste un sujet de controverse (Chabre et al., 2003). Les preuves accumulées en faveur de la dimérisation des RCPG et les techniques qui ont permis d'y accéder seront présentées dans cette section.

Liaison de ligand radiomarqué, micro-agrégation et complémentation fonctionnelle

La conséquence fonctionnelle de la formation de dimères de RCPG commence à être suggérée dès les années 1975 dans une étude de liaison de ligand radiomarqué du récepteur β2-adrénergique montrant un phénomène de coopérativité négative. Dans ces travaux les auteurs utilisent une dilution d'alprénolol tritié qui l'empêche de se lier à nouveau au récepteur après dissociation et laisse des sites de liaison libres. Dans cette condition de dilution, ils constatent que le taux de dissociation du ligand marqué est augmenté en présence d'alprénolol froid, ce qui ne serait pas le cas si les sites de liaison étaient indépendants; il y a donc une coopérativité négative au sein des sites de liaison du β2-AR (Limbird and Lefkowitz, 1976; Limbird et al., 1975). Des études ultérieures ont pu montrer ce même phénomène avec d'autres RCPG, notamment avec les récepteurs chimiokines. (El-Asmar et al., 2005; Sohy et al., 2007). Une preuve plus concrète de dimérisation est donnée en 1982 par une expérience montrant que la conjugaison de peptides antagonistes du récepteur à la gonadolibérine (GnRH) à un anticorps permettait de les transformer en agoniste et de déclencher la libération d'hormone lutéinisante (LH) dans des cultures hypophysaires. Ces résultats suggéraient que l'agrégation des récepteurs était suffisante pour induire l'activation (Blum and Conn, 1982; Conn et al., 1982). Suite à ces premières évidences de dimérisation, plusieurs équipes ont cherché à déterminer le poids

moléculaire des RCPG en utilisant l'inactivation par radiation; ils proposent au milieu des années 80 que les récepteurs α2-AR (Venter et al., 1983), dopamine D_2 (Lilly et al., 1983), et GnRH (Conn and Venter, 1985) forment des complexes de poids moléculaires supérieurs à des monomères. Plus récemment enfin, une méthode élégante pour prouver l'existence de dimères de RCPG a été l'utilisation de la complémentation fonctionnelle de deux récepteurs mutants. Le mutant α2-AR ne comprenant que ses cinq premiers domaines TM, les deux autres provenant du récepteur M3. Le mutant muscarinique M3 est composé seulement de ses 5 premiers TM, les deux derniers domaines TM appartenant à α2-AR. Ces deux chimères ne sont capables ni de lier leur ligand, ni d'engendrer une signalisation s'ils sont exprimés individuellement. Cependant leur coexpression restore leur capacité à lier chacun des deux ligands et à engendrer l'activation de la PLC (Maggio et al., 1993).

Co-immunoprécipitation

La présence de bandes immunoréactives de poids moléculaire correspondant à des complexes de RCPG de 2 protomères et plus était couramment observée en immunobuvardage de type western mais soulevaient deux problèmes majeurs : l'utilisation de solutions dénaturantes comme le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) pouvait provoquer l'agrégation des récepteurs d'une part, et d'autre part on ne pouvait pas exclure que les hauts poids moléculaires observés n'étaient pas dus à la présence d'autres protéines associées telle que les protéines G par exemple. La co-immunoprécipitation a permis d'apporter plus de spécificité dans les méthodes biochimiques pour déterminer la présence de dimères de récepteurs. La technique consiste à marquer les deux RCPG étudiés avec des épitopes différents (HA, Myc ou Flag habituellement); suite à l'immunoprécipitation de l'un des deux récepteurs, on regarde si l'autre épitope est détectables en western blot, prouvant l'association des deux récepteurs. La première étude utilisant cette approche sur des RCPG a été faite par l'équipe du Dr. Bouvier. Des récepteurs β-adrénergiques portant les épitopes Myc et HA sont coexprimés dans des cellules Sf9 et une immunoréactivité HA est détectée en western blot après immunoprécipitation avec un anticorps anti-Myc, mettant en évidence l'interaction entre deux récepteurs β2-adrénergiques. La spécificité de cette

approche a pu être vérifiée par l'absence de co-immunoprécipitation du récepteur mucarinique M2 portant l'epitope Myc avec HA-B2-AR. De plus, la possibilité d'agrégation des récepteurs due à une mauvaise solubilisation a été exclue en soumettant les cellules à un traitement de pontage chimique hydrophile avant leur lyse; les dimères se sont trouvés stabilisés, prouvant qu'ils étaient à l'état de complexes pré formés à la surface cellulaire. Deux autres observations très intéressantes dans cette même étude corroborent cette hypothèse : d'abord, un peptide issu du domaine TMVI est capable d'inhiber la dimérisation mais aussi l'activation de l'AC, ce qui démontrait la fonctionnalité de la dimérisation. Ensuite, les résultats prouvent que l'agoniste stabilisait l'état dimérique alors que l'agoniste inverse semblait favoriser l'état de monomère (Hebert et al., 1996). L'immunoprécipitation devient alors largement utilisée et permet la mise en évidence de nombreux homodimères mais aussi hétérodimères de RCPG (tableau I).

Tableau I : Exemples d'homo et hétéro-dimères révélés par co-immunoprécipitation

Récepteurs	**État oligomérique**	**Référence**
Dopamine D2	homodimère	(Ng et al., 1996)
Glutamate mGluR5	homodimère	(Romano et al., 1996)
Opïoide δOR	homodimère	(Cvejic and Devi, 1997)
Calcium CaR	homodimère	(Bai et al., 1998)
Muscarinique M3	homodimère	(Zeng and Wess, 1999)
GABAbR1 / GABAbR2	hétérodimère	(White et al., 1998)
Opïoides δOR / μOR	hétérodimère	(Jordan and Devi, 1999)

Somatostatin SST3 / SST2a	hétérodimère	(Pfeiffer et al., 2001)
Adénosine A1 / Dopamine D1	hétérodimère	(Gines et al., 2000)
Angiotensine AT1 / Bradykinine B2	hétérodimère	(AbdAlla et al., 2000)
Opïoide δOR / Adrénergique β2AR	hétérodimère	(Jordan et al., 2001)

Cas particulier des récepteurs de classe C :

Les travaux publiés à la fin des années 90 sur les récepteurs $GABA_{b1}$ / $GABA_{b2}$ sont des éléments déterminants en faveur de la dimérisation des RCPG dans la mesure où ils démontrent que ce récepteur forme un hétérodimère constitutif, obligatoire. La sous-unité $GABA_{b1}$ qui est un GPCR capable de lier le GABA contient à son extrémité C-terminale un motif RXR(R) de rétention dans le réticulum endoplasmique l'empêchant d'atteindre la surface cellulaire (Margeta-Mitrovic et al., 2000). La fonctionnalité du récepteur n'est retrouvée que par la coexpression de la sous-unité $GABA_{b2}$ qui masque le site de rétention de $GABA_{b1}$ et permet l'adressage de l'hétérodimère à la membrane. La sous-unité $GABA_{b2}$ qui est la seule à pouvoir activer la protéine G n'est en revanche pas capable de lier le GABA; une réponse fonctionnelle au ligand signifie donc la présence obligatoire de l'hétérodimère à la membrane.

Un autre argument fort appuyant l'hypothèse de la dimérisation a été la résolution cristallographique des domaines extracellulaires du récepteur du glutamate mGlu1 dans une conformation liée au ligand et deux conformations non liées; les trois structures montrent des homodimères de VFT liés par un pont disulfure (Kunishima et al., 2000).

Malgré ces évidences incontestables de dimérisation chez les récepteurs de classe C, les preuves de dimérisation des récepteurs de classe A dans des cellules vivantes par une méthode directe étaient toujours attendues; cette démonstration a été rendue possible grâce aux techniques biophysiques de transfert d'énergie, le FRET et le BRET.

Méthodes de transfert d'énergie par résonance de Förster et par bioluminescence (FRET et BRET).

L'énergie transférée d'une molécule donneur à une molécule accepteur d'énergie de manière non radiative selon un couplage dipôle-dipôle est appelée transfert d'énergie par résonance. L'avènement de ces technologies a été rendu possible par la découverte (Shimomura et al., 1962), le clonage (Prasher et al., 1992), et l'expression hétérologue de la protéine fluorescente verte (GFP) de la méduse *Aequoria Victoria*. La propriété d'auto-fluorescence de cette protéine a apporté une révolution dans la biologie en permettant d'abord de localiser les protéines en microscopie puis en permettant de révéler des interactions protéiques avec les méthodes de transfert d'énergie.

Lorsque le donneur d'énergie est une molécule fluorescente, l'exposition à une lumière d'une longueur d'onde donnée provoque son excitation; le transfert d'énergie à l'accepteur fluorescent qui en résulte est appelé FRET. Le donneur peut aussi être une enzyme, la luciférase, qui libère son énergie par oxydation de son substrat, la coelenterazine. Le transfert d'énergie au fluorophore accepteur est alors appelé BRET. L'efficacité du transfert d'énergie dépend essentiellement de 3 facteurs; d'abord, le chevauchement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'excitation de l'accepteur doit être maximal pour permettre un transfert d'énergie efficace. En revanche, plus les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur sont éloignés, meilleure sera la résolution (figure 8). Enfin, le transfert d'énergie est hautement dépendant de l'orientation des dipôles donneur-accepteur d'une part et d'autre part de la distance entre eux, qui doit être inférieure à 100Å (Angstroms) (Wu and Brand, 1994). L'efficacité du transfert qui est inversement proportionnelle à la puissance 6 de la distance (Förster, 1948) rend le système très sensible à d'infimes variations de distance et a permis de suivre les changements conformationnels intramoléculaires d'un protomère de récepteur de la parathormone

(PTHR) en FRET (Vilardaga et al., 2003) et de la β-arrestine2 en BRET (Charest et al., 2005).

Utilisation du BRET dans la détection de dimères de RCPG

Le transfert d'énergie par bioluminescence est un phénomène naturel observé chez les organismes marins « pensée de mer » *Renilla Reniformis* et la méduse *Aequorea victoria*. La bioluminescence qu'ils produisent a pour origine la dégradation oxydative de la coelentérazine en coelentéramide par l'enzyme luciférase qui libère de l'énergie et excite la protéine GFP de manière non-radiative, qui à son tour émet de la fluorescence à une longueur d'onde caractéristique (Xu et al., 1999) . Deux générations de BRET, BRET1 et BRET2, ont été largement utilisées pour étudier les interactions protéine – protéine (Pfleger and Eidne, 2005). La différence entre ces deux formes réside dans le substrat utilisé qui est la coelentérazine h (benzyl-coelentérazine) dans le cas du BRET1 et la bisdéoxycoelentérazine (deep blue C, coelentérazine 400a) dans le cas du BRET2. Il en résulte un spectre du donneur différent; l'émission de la *Rénilla* luciférase (*R*Luc) se situe autour 485nm en BRET1 et à 395nm environ pour le BRET2, ce qui influencera le choix de la protéine accepteur (tableau II).

Tableau II : principaux variants de GFP utilisés comme accepteurs d'énergie en BRET 1 et BRET2.

Variant de GFP	Pic d'excitation	Pic d'émission	BRET
Wt GFP	395nm	510nm	BRET2
EGFP	390nm	510nm	BRET2
GFP2 / GFP10	395nm	510nm	BRET2
YFP	485nm	530nm	BRET1
Venus	485nm	530nm	BRET1

La YFP (Yellow Fluorescent Protein) dont le pic d'excitation se situe à 485nm et le pic d'émission à 530nm est l'accepteur le plus couramment utilisé en BRET1. Le chevauchement des spectres d'émission de la *R*Luc et de la YFP est assez important, ce qui génère un ratio bruit de fond / signal non négligeable qu'il est important de contrôler. (figure 8). Cet inconvénient peut être évité en utilisant les protéines fluorescentes modifiées GFP2 ou GFP10 en BRET2; le spectre d'émission de la luciférase qui est décalé vers le bleu par oxydation de la coelenterazine 400_A est capable d'exciter ces fluorophores qui émettent à 510nm, offrant une excellente résolution spectrale (Ramsay et al., 2002). Cependant, la coelenterazine 400_A à un rendement quantique environ 100 fois inférieur à la coelenterazine h et décroît très rapidement (Hamdan et al., 2005). L'introduction de mutations dans la luciférase pour la rendre plus lumineuse a cependant permis de résoudre ce problème (Loening et al., 2006). Les *R*Luc2 et *R*Luc8, comportant respectivement 2 et 8 mutations (tableau III), potentialisent la détection du signal en BRET2 et permettent de suivre les cinétiques d'interactions protéiques sur des périodes de temps équivalentes au BRET1 (Kocan et al., 2008).

Tableau III : Désignation des mutations des *R*Luc2 et *R*Luc8.

Nom	Mutations
***R*Luc2**	C124A/M185V
***R*Luc8**	A55T/C124A/S130A/K136R/A143M/M185V/M253L/S287L

L'application du BRET nécessite de fusionner génétiquement le donneur et l'accepteur d'énergie aux protéines d'intérêt et de les exprimer dans un modèle cellulaire. L'ajout d'une courte séquence peptidique nommée « linker » permet de faire le lien entre la protéine d'intérêt et le rapporteur; l'importance de la longueur et composition en acides aminés de cette séquence sera discutée plus loin. En absence d'interaction des récepteurs, seul le pic d'émission du donneur (figure 8) sera détecté. La dimérisation des protéines pourra entraîner en revanche un rapprochement suffisant des partenaires de BRET pour permettre un transfert d'énergie entre eux, caractérisé par la détection du spectre d'émission de l'accepteur (ligne pleine orange en BRET1 et verte en BRET2) (figure 8). Le signal de BRET est calculé en faisant le ratio de l'émission de l'accepteur sur celle du donneur, ce qui permet de s'affranchir de nombreux problèmes de fluctuation dans le système tels que le nombre de cellules.

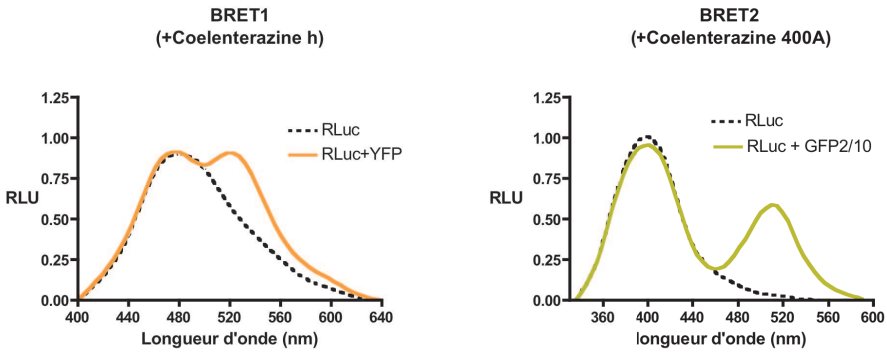


Figure 8 : Représentation des spectres de transfert d'énergie en BRET1 et BRET2

La courbe en pointillé représente le spectre d'émission de la *R*Luc par oxydation de la coelentérazine h (gauche) et de la coelentérazine 400_A (droite) et l'épaulement des courbes orange et verte correspond au transfert d'énergie en BRET1 et BRET2 respectivement. (RLU : unités relatives de luminescence)

La technique de BRET est utilisée pour la première fois en 1999 chez la cyanobactérie *Synechococcus* pour démontrer la dimérisation des protéines KaiB impliquées dans le rythme circadien (Xu et al., 1999). La première étude de dimérisation de RCPG en cellules vivantes est effectuée dans le même temps au laboratoire du Dr. Bouvier; la coexpression de récepteurs β2-adrénergiques fusionnés à la *R*luc d'une part et à la GFP d'autre part démontrent un signal de BRET basal ainsi qu'une augmentation de ce signal lors de la stimulation par l'agoniste isoprotérénol. Le BRET basal est interprété comme une preuve de présence de dimères constitutifs du récepteur β2-AR, et l'augmentation de signal comme un accroissement du nombre de dimère ou un changement conformationnel au sein du dimère (Angers et al., 2000). Depuis, plusieurs dizaines d'études en BRET 1 et BRET2 ont pu démontrer la présence d'homodimères, mais aussi d'hétérodimères de RCPG; pour revue, voir (Pfleger and Eidne, 2005). Les courbes de titration du donneur d'énergie sur l'accepteur sont fréquemment utilisées dans ces études pour discriminer une interaction spécifique entre deux protéines d'une interaction aléatoire (Mercier et al., 2002). La mesure

du transfert d'énergie entre un protomère A-*R*Luc et une quantité croissante de protomère B-GFP résulte en une saturation du signal de BRET (BRET max) si A et B forment un dimère puisque tous les protomères A sont couplés avec un protomère B. Dans le cas contraire, les collisions aléatoires entre A et B donnent lieu à une droite non saturable (figure 9).

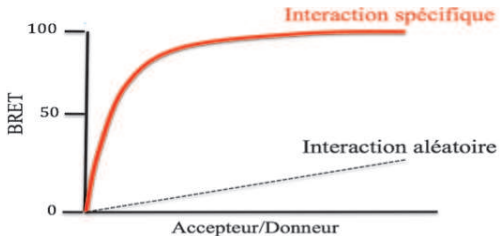


Figure 9 : Courbe de titration entre deux protéines : spécificité

L'interaction spécifique entre deux protéines fusionnées à la *R*Luc et à la GFP résulte en une saturation (courbe rouge) alors qu'une interaction aléatoire donne lieu à une droite non saturable (pointillés noirs).

Utilisation du FRET dans la détection de dimères de RCPG

La GFP d'*Aequoria Victoria* a été mutée de nombreuses fois pour générer des variants aux propriétés spectrales différentes. Les plus utilisés pour réaliser des études de FRET sont la CFP (cyan fluorescent protein) comme donneur et la YFP comme accepteur. La première utilisation de cette technique pour démontrer l'homodimérisation de RCPG, le facteur α Ste2 de la levure, est réalisée en même temps que pour le BRET (Overton and Blumer, 2000). Comme pour le BRET, de nombreuses études en FRET rapportent par la suite des évidences d'homo et hétérodimères de RCPG; pour revue, voir (Pfleger and Eidne, 2005). Un des avantages de l'application du FRET est qu'elle n'est pas limitée à l'usage de protéines de fusion; les fluorophores peuvent être conjugués à des anticorps pour reconnaître des récepteurs marqués avec un épitope (Myc, Flag, HA) et assurer que le

signal de FRET détecté provient de récepteurs situés à la surface cellulaire (Canals et al., 2004; Rocheville et al., 2000b). De plus, des anticorps polyclonaux spécifiques de certains RCPG sont disponibles et permettent la détection des récepteurs exprimés de manière endogène en combinaison avec des anticorps secondaires couplés aux fluorophores (Maurel et al., 2004). Dans le cas du FRET le donneur d'énergie doit être excité par une source lumineuse pour pouvoir transférer son énergie à l'accepteur, ce qui constitue un désavantage de cette technique car l'accepteur peut être coexcité, générant un bruit de fond interprétable comme du FRET. Le problème a été résolu par le développement du FRET en temps résolu qui utilise la propriété des lanthanides (chélates et cryptâtes de terre rare) tels que l'europium et le terbium qui ont une durée de fluorescence longue et permettent donc d'introduire un délai entre l'excitation du donneur et la détection de la fluorescence de l'accepteur (Maurel et al., 2004; McVey et al., 2001).

Méthodes structurales.

Contrairement aux récepteurs de classe C dont la structure cristallographique du domaine extracellulaire de mGlu1 a révélé un dimère (Kunishima et al., 2000), les seules évidences sur la structure quaternaire des classes A disponibles jusqu'à aujourd'hui provenaient d'une étude en microscopie à force atomique de la rhodopsine (Liang et al., 2003). Les images obtenues sur des membranes natives de photorécepteurs de souris révèlent des rangées de rhodopsine disposées par paires qui ont été interprétées comme une preuve d'organisation de ces récepteurs en dimère ou oligomères d'ordre supérieur (Fotiadis et al., 2003). Cette conclusion a cependant été contestée en avançant que cette organisation serait due à un artéfact de préparation des échantillons de membranes en vue de l'étude en microscopie à force atomique (Chabre et al., 2003). Mais une avancée majeure en faveur de la dimérisation des RCPG de classe A vient juste d'être franchie grâce à la résolution de la structure cristallographique du récepteur CXCR4 sous sa forme dimérique (Wu et al., 2010). Au total cinq cristaux du CXCR4 lié à deux antagonistes

différents révèlent un dimère dont l'interface serait constituée des segments transmembranaires V et VI; les détails de cette structure seront présentés dans le chapitre sur le récepteur CXCR4.

Interface de dimérisation.

Déterminer l'interface de dimérisation des RCPG a été un enjeu majeur dès les premières descriptions de leur assemblage en oligomères; en plus de fournir des arguments structuraux, la connaissance des surfaces de contact pourrait permettre d'inhiber la dimérisation et par conséquent d'en révéler la fonction. Chez les récepteurs de classe C, la résolution de la structure cristallographique des récepteurs mGlu1 a montré qu'un pont disulfure stabilisait les domaines extracellulaires du dimère (Kunishima et al., 2000); l'établissement de cette liaison covalente n'exclue pas que d'autres liaisons plus faibles interviennent pour stabiliser les domaines transmembranaires. Les VFT du récepteur $GABA_b$ sont aussi décrits comme des dimères importants pour la fonction du récepteur (Rondard et al., 2008). Cependant la première interface de contact décrite pour les $GABA_b$ est l'extrémité C-terminale où la sous-unité $GABA_{b2}$ forme une structure en super-hélice (coiled-coil) autour de la sous-unité $GABA_{b1}$ (White et al., 1998). Chez les récepteurs de classe A, le N-terminal est beaucoup plus court que celui des classes C et ne semble pas impliqué dans la dimérisation. Le C-terminal semble lui former une interface pour certains récepteurs tels que démontré pour le récepteur opioïde δ (Cvejic and Devi, 1997). Mais la surface de dimérisation majoritairement décrite pour les classe A se situerait au niveau des domaines transmembranaires. Dans la première étude de dimérisation du récepteur β2-AR en co-immunoprécipitation, les auteurs utilisent un peptide dérivé du domaine transmembranaire VI et démontrent qu'il est capable d'inhiber par compétition non seulement la dimérisation mais aussi la production d'AMPc en réponse à l'agoniste (Hebert et al., 1996) . Le domaine transmembranaire IV a également été suggéré comme interface de dimérisation dans le cas des récepteurs dopamine D_2 (Guo et al., 2005) et CCR5 (Hernanz-Falcon et al., 2004). La mutation des résidus Ile52 dans le TMI et Val150 dans le

TMIV de CCR5 génère un récepteur non fonctionnel qui ne forme plus de dimère.

Pour le récepteur D_2, les auteurs déterminent plusieurs points de contact entre deux protomères situés sur l'hélice IV par pontage de cystéines et démontrent que la liaison d'un agoniste ou agoniste inverse influe de manière différente la création de liaisons entre les résidus substitués. Ceci appuie l'idée d'un changement conformationnel à l'interface des dimères mais aussi qu'un protomère serait potentiellement capable de modifier l'état d'activation du second protomère dans un complexe. Les récepteurs du facteur α de la levure (Overton et al., 2003) et α1-AR (Carrillo et al., 2003) dimériseraient via le TMI. Dans le cas du récepteur chimiokine CXCR4, ce sont des peptides dérivés des domaines transmembranaires II et IV qui semblent le mieux cibler l'interface de dimérisation (Percherancier et al., 2005) et permettent d'inhiber le réarrangement conformationnel entre les protomères induit par le ligand. La très récente résolution de la structure cristallographique du CXCR4 démontre quant à elle une surface de dimérisation impliquant majoritairement les TMV et TMVI (Wu et al., 2010). Cette apparente contradiction qui est observée pour plusieurs RCPG suggère notamment l'existence d'interfaces multiples de contact qui pourraient avoir une rationnelle dans la formation de complexes d'ordre supérieur. La diversité des domaines TM impliqués révèle qu'il y une hétérogénéité au sein des RCPG dans la propension de certaines hélices transmembranaires à former des dimères; cette caractéristique pourrait en partie expliquer la spécificité d'interaction de certains protomères entre eux et l'exclusion d'autres. Elle peut cependant être le résultat de l'utilisation de différentes techniques.

Dimérisation induite par le ligand.

La multiplication des évidences en faveur de la dimérisation des RCPG a soulevé de multiples questions; parmi elles, la dynamique d'association – dissociation des protomères est l'une des plus débattue. Particulièrement, la modulation du transfert d'énergie observée entre certains dimères de RCPG de classe A après stimulation par l'agoniste a remis en cause l'idée que les dimères étaient des entités stables; en effet, si la dimérisation peut être

nécessaire à l'export des récepteurs hors du réticulum endoplasmique, il n'est pas exclu que leur état oligomérique soit modifié une fois qu'ils ont atteint la membrane plasmique. Trois scénarios sont possibles : dans le premier, le dimère est constitutif et la stimulation par le ligand ne change pas son état (Canals et al., 2003; Dinger et al., 2003). Dans le second, le dimère est constitutif et le ligand augmente (Ayoub et al., 2002; Kroeger et al., 2001) ou diminue (Berglund et al., 2003; Cheng and Miller, 2001; Grant et al., 2004) l'état associé à la dimérisation. Enfin, dans un troisième cas, le dimère n'est détecté qu'en présence du ligand; l'activation serait donc absolument requise et entrainerait le rapprochement des protomères (Rocheville et al., 2000a; Yoshioka et al., 2002). En FRET ou en BRET, l'augmentation/diminution du signal a souvent été interprétée comme une variation du nombre de dimères formés/dissociés. Cependant, comme discuté plus haut, l'efficacité de transfert varie à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre le donneur et l'accepteur; il se peut donc que des changements conformationnels subtils entre les protomères aient été interprétés comme des associations ou dissociations de protomères. Les courbes de titration (voir page 39) ont été utilisées comme outil pour différencier un changement conformationnel d'une augmentation du nombre dimères formés. En considérant que tous les protomères-A *R*-Luc sont en dimère à BRET max, une augmentation supplémentaire du signal suite au traitement par l'agoniste serait donc le résultat d'un changement de conformation entre les deux protomères. (Percherancier et al., 2005). Une variation du BRET 50, considéré comme un indicatif de l'affinité relative, serait quant à elle une interprétée comme une variation du nombre de dimères formés (figure 10).

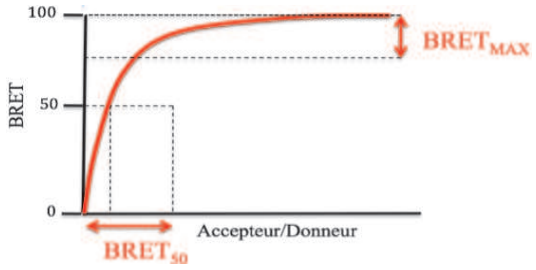


Figure 10 : Courbe de titration: affinité relative.

Concernant les évidences obtenues en immunobuvardage de type western ou en co-immunoprécipitation, la variation de poids moléculaire des bandes immunoréactives suite à un traitement par l'agoniste peut aussi être due à un changement de conformation qui modifie l'accessibilité des épitopes utilisés pour détecter les dimères. Egalement, les structures cristallographiques des dimères de CXCR4 (Wu et al., 2010) et des VFT de mGlu1 (Kunishima et al., 2000) démontrent clairement des changements de conformation et des modifications à l'interface de contact lorsqu'ils sont liés à deux antagonistes différents (CXCR4) ou en liaison à l'agoniste par rapport à l'état libre (mGlu1). La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM) permet de filmer et de suivre l'évolution d'une seule molécule à la surface cellulaire. Une étude récente montrait que le récepteur muscarinique M1 s'assemblait en dimère et se désassemblait de manière dynamique dans l'ordre de la seconde, avec une moyenne de 30% de dimères en tout temps (Hern et al., 2010) et indépendamment de la présence d'agoniste.

Outre la nécessité d'effectuer des contrôles rigoureux, la divergence de ces résultats suggère que la régulation de l'état oligomérique des RCPG pourrait être différente d'un membre à l'autre; la propension à former des complexes de deux partenaires ou plus et d'en réguler la composition serait alors une propriété intrinsèque du récepteur dans son environnement cellulaire non généralisable à l'ensemble des RCPG.

Rôles de la dimérisation

Si la dimérisation des RCPG a été sélectionnée et préservée au cours de l'évolution, c'est sans doute parce qu'elle apporte une dimension supplémentaire à la signalisation cellulaire. Cette partie de l'exposé présente les conséquences fonctionnelles de la dimérisation; nous verrons que malgré la grande diversité de cette famille de récepteurs, l'apport majeur de la dimérisation pourrait être d'augmenter la versatilité et le finesse de l'information transmise par un messager à la cellule, particulièrement grâce à l'assemblage de deux RCPG différents par hétéro-oligomérisation.

Adressage à la membrane plasmique

La dimérisation des RCPG a rapidement été proposée en tant que processus de contrôle de qualité au niveau du réticulum endoplasmique (RE) pour assurer que la fonctionnalité des protéines avant leur adressage à la membrane plasmique, comme dans le cas du récepteur $GABA_b$ (voir p33). L'assemblage en oligomère dès la synthèse dans le RE a depuis été établie pour de nombreux RCPG (Issafras et al., 2002; Terrillon et al., 2003) et l'homodimérisation comme prérequis pour l'adressage en membrane a pu être vérifié sur les RCPG de classe A. Par exemple, la mutation de domaines impliqués dans la dimérisation du récepteur β2-AR empêche son export du RE (Kobayashi et al., 2009; Salahpour et al., 2004).

Pharmacologie d'un dimère

Les preuves d'une nouvelle pharmacologie apportée par la dimérisation sont souvent difficiles à obtenir dans la mesure où une expérience quantitativement rigoureuse nécessiterait de connaître le ratio des homodimères et des hétérodimères formés par chacunes des parties. Des études menées sur les récepteurs opioïdes κ et δ (KOR et DOR) démontrent que cet hétérodimère présente une faible affinité pour les ligands individuels de chacun des protomères (U69593 et DPDPE respectivement) mais qu'il les lie avec une haute affinité lors d'une costimulation, démontrant un phénomène de coopérativité positive (Jordan and Devi, 1999). S'il n'est pas facile de démontrer que cette coopérativité provient de l'interaction physique directe des deux récepteurs et non d'un phénomène de signalisation croisée impliquant d'autres protéines, la démonstration du même phénomène sur d'autres RCPG contribue à privilégier cette hypothèse (Maggio et al., 1999; Rocheville et al., 2000a). Des phénomènes de coopérativité négative ont aussi été observés entre les dimères CXCR4 et CCR2 (Sohy et al., 2007), et CCR2 avec CCR5 et seront abordées dans la section des récepteurs aux chimiokines.

Couplage d'un dimère de RCPG aux protéines G

À partir du modèle initial dans lequel un seul récepteur interagissait avec une protéine G pour activer un effecteur, l'assemblage des RCPG en dimère apporte de nouvelles dimensions à la signalisation: l'augmenter, la diminuer, ou la complexifier en permettant d'activer une nouvelle voie.

La dimérisation peut en premier lieu permettre un couplage qui n'était pas possible dans la forme monomérique. C'est le cas du récepteur $GABA_b$, où la sous-unité G_{b1} qui peut lier le ligand nécessite la sous-unité G_{b2} pour coupler la protéine $G\alpha_i$ et inhiber l'activité de l'adénylate cyclase. Les récepteurs CCR2 et CCR5 qui sont tous deux couplés à $G\alpha_i$ sont capables de générer une libération de calcium intracellulaire résistante à la PTX lorsqu'ils sont co-exprimés; cette nouvelle réponse serait due à la capacité de l'hétérodimère à coupler la protéine $G\alpha_{11}$ (Mellado et al., 2001). Ce phénomène ne se limite pas au couplage des protéines G; une autre étude rapporte par exemple que l'hétérodimérisation des récepteurs opioïdes μOR et δOR conduit à un recrutement constitutif de la β-arrestine2 avec pour conséquence une modification de la régulation des protéines kinases $ERK_{1/2}$ (Rozenfeld and Devi, 2007). Les récepteurs dopamine D_1 et D_2 sont capable de former un hétérodimère (So et al., 2005) qui stimule les voies calciques dépendantes de la PLC alors qu'ils sont individuellement associés respectivement à une stimulation et une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (Lee et al., 2004).

La potentialisation d'une voie de signalisation comme conséquence de l'hétérodimérisation a également été rapporté dans de nombreuses études. Ainsi il a été démontré que le récepteur PAR3 activé par des protéases augmentait la réponse de PAR1 élicitée par la thrombine dans les cellules endothéliales. PAR3 fonctionnerait comme un modulateur allostérique essentiel de la signalisation de PAR1 grâce à l'hétérodimérisation qui permettrait le couplage à la voie $G\alpha_{13}$ (McLaughlin et al., 2007). Également, le peptide Orexine A entraine une phosphorylation 100 fois plus importante des MAPK $ERK_{1/2}$ lorsque son récepteur orexine 1 forme un hétérodimère avec le récepteur cannabinoïde CB_1;

cet effet est bloqué par l'agoniste inverse/antagoniste de CB_1, le Rimonaban (Hilairet et al., 2003). Dans le cas des récepteurs κOR / δOR dont il était question dans la section précédente, les auteurs démontrent aussi une synergie de l'activation des protéines MAPK par l'hétérodimère lors d'une costimulation par les deux agonistes (Jordan and Devi, 1999). De nombreuses études rapportent des cas signalisation favorisée par hétérodimérisation (AbdAlla et al., 2000; Gonzalez-Maeso et al., 2008; Rocheville et al., 2000a) et pour revue voir : (Angers et al., 2002; Terrillon and Bouvier, 2004)

Dans d'autres cas enfin, l'hétérodimérisation a pour effet d'atténuer la signalisation qui est normalement engendrée lorsque les protomères sont exprimés individuellement. Dans une expérience menée sur des fibroblastes qui expriment les récepteurs à la dopamine D_1 et à l'adénosine A_1, la production d'AMPc par D_1 est atténuée par un pré traitement des cellules avec les deux agonistes adénosine R-PIA et dopamine SKF-38393 alors que le pré traitement avec un seul des deux ligands n'a pas d'effet. L'hétérodimérisation serait alors un pré requis à la désensibilisation de la voie Gs (Gines et al., 2000). L'inhibition de la signalisation d'un protomère par hétérodimérisation a également été l'objet de nombreuses autres études (AbdAlla et al., 2000; George et al., 2000; Nijmeijer et al., 2010; Pfeiffer et al., 2001; Sohy et al., 2007)

Au regard de ces exemples, il paraît évident que l'état oligomérique des RCPG influence de multiples façons leur signalisation. En particulier, le couplage des protéines G à un dimère de récepteur génère de nombreuses investigations car la base moléculaire de cette interaction est encore largement méconnue. L'article 1 présenté dans cette thèse adresse la question de l'engagement d'une protéine G par un dimère de récepteur et du rôle de chaque récepteur dans l'engagement lorsque un seul des récepteurs est activé.

Bases moléculaires du couplage d'une protéine G à un dimère de récepteur

Cette partie de l'exposé à pour but de présenter les connaissances actuelles sur la stœchiométrie d'interaction des RCPG avec les protéines G et les mécanismes de couplage qui en découlent.

Plusieurs études de mutagénèse dirigée ainsi que la résolution de structures cristallographiques ont montrées que les protéines G hétérotrimériques formaient de multiples points de contact avec le récepteur (Hamm, 2001) (voir page 18). L'équipe du Dr. Palczewski qui a cristallisé la rhodopsine bovine montre dans une simulation que la surface de contact d'un seul récepteur ne serait pas suffisante pour accommoder tous ces contacts (Filipek et al., 2004). Les tailles relatives de la rhodopsine et de la transducine $G\alpha_t$ hétérotrimerique suggèrent en effet un ratio 2 :1 qui diffère de la stœchiométrie « conventionnelle » 1 :1. Un dimère de récepteurs β2-AR avec un hétérotrimère $G\alpha_{i1}$-β_1-γ_2 sont représentés dans la figure 11 pour illustrer ces propos.

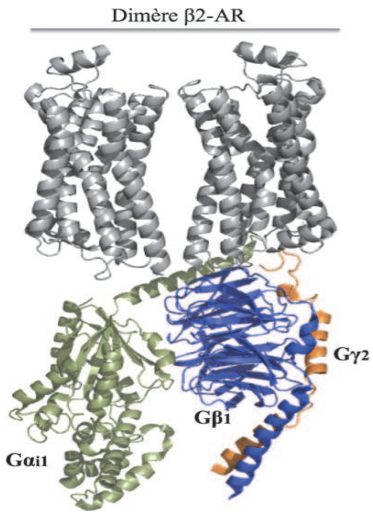


Figure 11 : Modèle d'interaction d'un dimère de récepteur β2-AR avec une protéine G hétérotrimérique.

Réalisé à l'aide du logiciel PyMol et des pdb 2RH1 (β2-AR) et 1GG2 ($G\alpha_{i1}/\beta_1/\gamma_2$)

Cette stœchiométrie 2 :1 a été confirmée expérimentalement avec le récepteur de la leukotriène B4 nommé BLT1, qui est un récepteur de classe A. Dans cette étude, l'auteur

montre grâce à une méthode de pontage de cystéines suivie d'analyses en chromatographie d'exclusion, spectrométrie de masse et de dispersion neutronique, que le récepteur BLT1 est un dimère qui interagit avec une seule protéine G hétérotrimerique pour former un complexe pentamérique $(BLT1.LTB4)_2 : G\alpha_{i2}\beta_1\gamma_2$ (Baneres and Parello, 2003). Ces travaux démontrent également que la dimérisation de BLT1 est dépendante de la liaison du ligand LTB4 et qu'elle est nécessaire à l'interaction avec les protéines G. L'inhibition de formation du dimère $(BLT1.LTB4)_2$ par traitement avec un peptide dérivé du domaine transmembranaire VI empêche la liaison de la protéine G au récepteur, indiquant que le dimère serait nécessaire à la formation d'un complexe pentamérique.

Asymétrie d'activation de la protéine G par un dimère de récepteur.

Lorsqu'on assume une stœchiométrie 2: 1 se pose la question du rôle de chacun des protomères dans l'activation de la protéine G. Le modèle du récepteur $GABA_b$ montre que la mutation des boucles intracellulaires i_2 et i_3 du domaine hepta-hélical (DH) de la sous-unité $GABA_{b1}$ qui est capable de lier le GABA n'altère pas l'activation de la protéine G, alors que les mêmes mutations sur la sous-unité $GABA_{b2}$ suppriment le couplage (Duthey et al., 2002; Robbins et al., 2001). De plus, il a été démontré d'une part que si le DH de $GABA_{b2}$ était suffisant pour l'activation de la protéine G (Binet et al., 2004), le DH de $GABA_{b1}$ augmentait l'efficacité de couplage du dimère, et d'autre part que le VFT de $GABA_{b2}$ augmentait l'affinité de liaison du VFT de $GABA_{b1}$(Galvez et al., 2001). Ces travaux mettent donc en lumière une activation asymétrique *en trans* du récepteur $GABA_b$ mais aussi de multiples interactions allostériques entre les deux sous-unités démontrant l'importance des deux protomères dans le processus d'activation des protéines G. L'équipe du Dr. Pin a également démontré que le blocage d'un seul DH du récepteur mGlu par un agoniste inverse ne diminuait pas du tout l'activité du dimère (Hlavackova et al., 2005). De plus, cette activation asymétrique a pu être confirmée par l'observation que la liaison d'un seul modulateur allostérique positif (PAM) par dimère de récepteur mGlu était suffisante à augmenter son activité (Goudet et al., 2005).

L'étude du récepteur LTB1 a quant à elle été utilisée comme modèle pour connaître la géométrie d'activation des dimères de classe A. En mesurant la fluorescence dans un seul protomère à la fois du dimère BLT1 marqué au 5-hydroxy-tryptophane, l'équipe du Dr. Banères a montré que la liaison d'un seul protomère par le ligand suffit à activer pleinement la protéine G, et que la conformation des deux protomères est différente même si ils sont tous les deux liés par le ligand (Damian et al., 2006); L'asymétrie serait causée par la protéine G qui ne peut lier que'un protomère dans le dimère. Les auteurs concluent donc que l'activation de ce dimère est asymétrique, et que la différence de changement conformationnel dans les deux protomères est due aux protéines G. En effet, en absence de protéines G, des travaux antérieurs sur le même système montraient que les deux protomères pouvaient atteindre un état actif qui se caractérisait par un états conformationnel similaire (Mesnier and Baneres, 2004). Pour savoir si l'état conformationnel du protomère non lié correspond à un état actif, c'est à dire capable de promouvoir l'échange GDP-GTP de la protéine G, ils utilisent dans une dernière étude un hétérodimère purifié BLT1 avec une chimère ALXR. Cette dernière est composée d'un récepteur BLT1 dont la boucle e3, le TMVII et le C-terminal ont été remplacés par les régions correspondantes de ALXR; elle ne peut plus être activée par le leukotriène B4 mais l'est toujours par les agonistes ALXR (Chiang et al., 2000), permettant de cibler sélectivement un seul protomère de l'hétérodimère (Damian et al., 2008). Dans cet hétérodimère, la liaison de l'agoniste à un des deux protomères induit un changement de conformation asymétrique comme noté précédemment; cependant il s'avère que le protomère lié par son agoniste n'est pas capable d'activer les protéines G si sa boucle intracellulaire i_3 est mutée, suggérant qu'il n'y a pas de phénomène de *trans* activation dans ce dimère (Damian et al., 2008). L'état conformationnel du protomère non lié n'est donc pas un état actif en terme d'activation de la protéine G. Il existe cependant un biais dans cette conclusion qui sera abordé dans la partie discussion. De plus, si le second protomère n'est pas dans un état actif vis-à-vis de la protéine G étudiée, il peut l'être pour d'autres

protéines G ou d'autres voies de signalisation; cet aspect sera approfondi dans les parties résultat et discussion également.

Un mécanisme d'activation asymétrique a également été rapportée concernant le dimère de récepteur dopaminergique D_2 (Han et al., 2009). L'auteur montre que si la liaison de l'agoniste à un seul protomère active pleinement la protéine G, l'altération du second protomère par différentes mutations peut moduler profondément voir inhiber cette activation. Ceci a également pu être observé dans l'hétéro-oligomère CXCR4-CCR2; il sera abordé dans les parties résultats et discussion. De manière intéressante, les résultats montrent que la liaison d'un agoniste sur le « second » protomère diminue l'activation de la protéine G par le « premier » protomère, alors que la liaison d'un agoniste inverse la potentialise; la conformation du protomère non lié serait donc cruciale dans ce dimère pour assurer l'activation optimale.

Activation d'une protéine G par un RCPG monomérique

En apparente opposition avec ces travaux, plusieurs études ont pu démontrer que l'état monomérique d'un RCPG était suffisant pour activer une protéine G, mais aussi que le dimère altérait l'activation. C'est le cas du récepteur à la neurotensine NTS1 (White et al., 2007), de la rhodopsine (Bayburt et al., 2007; Ernst et al., 2007), adrénergique β2-AR (Whorton et al., 2007), et aux leukotriène LTB2 (Arcemisbehere et al., 2010). De manière générale, les auteurs utilisent des systèmes dans lesquels ils peuvent contrôler l'état oligomérique des récepteurs purifiés testés (micelles, bicouches de phospholipides) et comparent alors l'activation des protéines G par les préparations de monomères par rapport à celles de dimères. Si un monomère de RCPG peut activer une protéine G comme le montrent incontestablement ces études, la fonction de la dimérisation n'en resterait pas moins, tel que l'illustre ce chapitre, un moyen de moduler cette activation pour apporter une plus grande diversité de réponse à la cellule.

Internalisation d'un dimère de RCPG

L'internalisation des RCPG suite à leur activation (voir page 23) est elle aussi affectée par l'état oligomérique des récepteurs. En effet si un dimère est en interaction stable, on peut s'attendre à ce que l'internalisation de l'un des protomères suite à son activation provoque l'internalisation de l'autre. Concernant un hétérodimère, ce phénomène pourrait avoir des retombées majeures en pharmacologie puisque il serait alors possible d'inhiber la signalisation d'un récepteur en stimulant son internalisation grâce à un autre récepteur. Ainsi dans des cellules exprimant l'hétérodimère α_2-AR/β1-AR, la stimulation du récepteur α_2-AR par son ligand UK 14034 engendre la co-internalisation des récepteurs alors que UK n'a aucun effet sur les cellules exprimant seulement le β1-AR (Xu et al., 2003a). La même observation est faite pour les récepteurs α_{1a}-AR et α_{1b}-AR (Stanasila et al., 2003). L'hétérodimérisation peut aussi permettre l'internalisation d'un récepteur qui ne l'est pas lorsqu'il est exprimé seul, en homodimère. C'est le cas par exemple du récepteur à la somatostatine SSTR1 qui n'est internalisé suite à la liaison de son ligand SCH288 que s'il est en hétérodimère avec le récepteur SSTR5 (Rocheville et al., 2000b). La co internalisation de récepteurs appartenant à des sous-groupes différents a pu être démontrée également; le récepteur opioïde δ-OR, lorsqu'il est exprimé avec le récepteur β2-AR, est internalisé en réponse à l'agoniste adrénergique isoprotérénol. Dans ces mêmes cellules, le récepteur β2-AR est internalisé suite à la stimulation du δ-OR par l'étorphine (Jordan et al., 2001). De manière intéressante, les auteurs observent aussi dans cette étude un effet dominant négatif sur l'internalisation; lorsque le récepteur β2-AR est coexprimée avec κ-OR, la stimulation d'aucun des deux protomères n'est capable d'entrainer l'endocytose. Cet effet « inversé » qui est également une preuve d'hétérodimérisation a aussi été observé pour les récepteurs β1AR/β2AR (Lavoie et al., 2002). L'explication du mécanisme impliqué dans l'internalisation croisée a pu être approfondie pour l'hétérodimère composé du récepteur somatostatine SST2A / opioïde μOR (Pfeiffer et al., 2002); dans cette étude il est montré que le récepteur μOR est internalisé suite à la stimulation du SST2A lorsqu'ils sont

en hétérodimère. L'auteur démontre qu'il y a une phosphorylation croisée de μOR élicitée par l'activation de SST2A mais aussi une désensibilisation croisée des voies de l'adénylate cyclase et des MAPK $ERK_{1/2}$ qui pourraient s'expliquer par le schéma classique de recrutement des GRK et de la β-arrestine. Le phénomène de désensibilisation croisée a aussi été rapporté pour l'hétérodimère des récepteurs adénosine A_{2A} et dopamine D_2 (Hillion et al., 2002). Enfin, une étude de l'équipe du Dr. Bouvier démontre que dans l'hétérodimère de récepteurs vasopressine V_{1a}/V_2, la stimulation par un agoniste non sélectif entraine une internalisation du dimère caractéristique des RCPG de classe B (interaction stable avec la β-arrestine sans recyclage la membrane plasmique) alors qu'un agoniste sélectif V_{1a} montre un schéma d'endocytose de type A (interaction faible avec la β-arrestine et recyclage la membrane plasmique). La cointernalisation observée en présence d'un mutant du V_2 qui internalise de manière constitutive démontre de plus que l'activation d'un seul protomère est suffisante à promouvoir l'endocytose (Terrillon et al., 2004). Comme pour les protéines G, une stœchiométrie d'interaction 1 :1 entre l'arrestine visuelle et la rhodopsine a aussi été démontrée in vivo et in vitro (Hanson et al., 2007), mettant en avant la nécessité de clarifier la base moléculaire de cette interaction.

Réalité physiologique des dimères de RCPG

La plupart des études menées sur la dimérisation des RCPG sont faites sur des systèmes hétérologues qui impliquent l'expression « artificielle » des récepteurs. Il paraît donc nécessaire au préalable de s'assurer que les deux récepteurs étudiés sont co exprimés dans un type cellulaire. De plus, si il a été montré dans de nombreux travaux que la stimulation d'un RCPG pouvait moduler l'activité d'un autre, il faut arriver à exclure les possibilités de signalisation croisée intracellulaires qui ne signifie pas l'association physique des deux récepteurs en hétérodimère. L'implication directe de la dimérisation a cependant pu être démontrée pour certaines pathologies telles que la schizophrénie. L'interaction des récepteurs au glutamate $mGluR_2$ et sérotonine $5HT_{2A}$ par leur domaine transmembranaire IV et V module l'activation des protéines G en réponse aux hallucinogènes. Lorsqu'ils sont en complexe, l'activation de $mGluR_2$ abolit la signalisation

spécifique des hallucinogènes médiée par $5HT_{2A}$ – celle qui est impliquée dans la schizophrénie - ainsi que la réponse comportementale. Or cette étude rapporte que les cerveaux humains post-mortem de sujets schizophrènes non traités présentent une régulation à la hausse des récepteurs $5HT_{2A}$ et à la baisse des $mGluR_2$ (Gonzalez-Maeso et al., 2008). D'autres études in vivo permettent de penser que certains dimères seront de bons candidats thérapeutiques; c'est le cas par exemple des dimères de récepteurs cannabinoïde CB1/adénosine $_{A2}$ pour les effets moteurs induits par les cannabinoïde sur le striatum (Carriba et al., 2007). Une des preuves les plus convaincantes de la fonctionnalité physiologique des dimères de RCPG est rapportée dans une étude de complémentation fonctionnelle du récepteur de l'hormone lutéinisante LH chez la souris (Rivero-Muller et al., 2010). Une souris totalement déficiente en récepteur à la LH (KO LH-R) est générée et utilisée comme base de l'étude; elle présente un phénotype d'hypogonadisme et de stérilité. Deux lignées transgéniques exprimant un récepteur LH soit ne pouvant lier l'hormone, soit totalement déficient dans la transduction du signal, sont établies à partir des souris KO LH-R. Chacune des lignées présente le même phénotype d'hypogonadisme et de stérilité que le KO LH-R. L'expérience clé est la production d'une troisième lignée transgénique exprimant les deux récepteurs mutants dans laquelle la gamétogénèse et la fertilité sont rétablies à un niveau quasi-similaire aux souris sauvages.

Organisation des RCPG en complexes d'ordre supérieurs

La grande densité de récepteurs dans certaines zones subcellulaires comme les récepteurs au $GABA_b$ dans la synapse, les profils de coopérativité entre récepteurs, mais aussi la versatilité et la multiplicité des interfaces de contact entre les RCPG, sont autant de raisons qui ont suggéré que l'association des RCPG pouvait regrouper plus de deux membres.

Premières évidences.

La première étude qui suggère l'existence d'oligomères d'ordre supérieur démontre par immunoprécipitation que les récepteurs à la dopamine D3 provenant de cerveaux de primates et de rongeurs donne des bandes immunoréactives à des poids moléculaires correspondant à des monomères (50kDa), mais aussi à des dimères et tétramères (supérieures à 180 kDa) (Nimchinsky et al., 1997). Quelques années plus tard, l'analyse des résultats de liaison de ligand du récepteur muscarinique M2 rapporte que ce récepteur comprendrait au moins quatre sites d'interactions, vraisemblablement dans un tétramère, où le ligand agirait de manière coopérative (Park et al., 2002). L'évidence la plus concrète de l'organisation des RCPG en oligomères d'ordre supérieur vient de l'étude du Dr. Palczewski utilisant la microscopie a force atomique sur des disques de membrane venant du segment externe des cellules en bâtonnets de la rétine; les images démontrent que les molécules de rhodopsine sont arrangées en colonnes ordonnées de dimères (Liang et al., 2003) . Par analyse des dimensions du paracristal de rhodopsine et de l'aire des surfaces de contact, les auteurs proposent que le contact intra-dimère (symétrique) se fasse par les TMIV et TMV. Dans leur modèle, la plupart des contacts entre les dimères adjacents dans chaque colonne impliquent la boucle intracellulaire entre les TMV et VI d'un monomère avec la boucle intracellulaire entre les TMI et TMII et le C-terminal de l'autre monomère. Les résidus hydrophobes du TMI proche du coté extracellulaire forment l'interaction entre les colonnes de dimères (figure 12). De manière intéressante, une étude publiée au même moment sur le récepteur au complément C5a utilisant la méthode de pontage de cystéines démontre une interface symétrique pour le dimère C5a impliquant les TMIV mais aussi les TMI et TMII. Comme il était difficile d'intégrer ces deux pontages symétriques dans un modèle de dimère, les auteurs proposent comme explication la plus vraisemblable que les récepteurs C5a s'assemblent en une structure oligomérique (Klco et al., 2003).

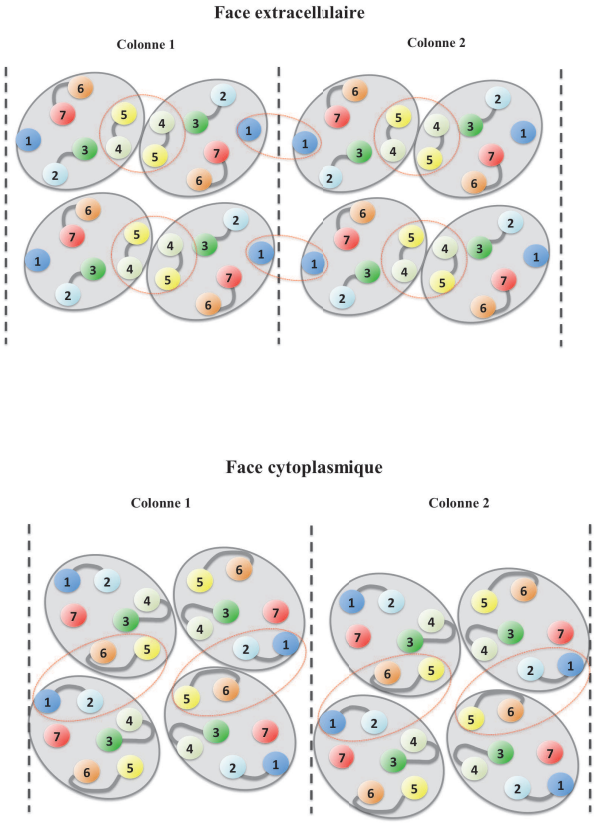


Figure 12 : Représentation schématique des interactions entre les protomères de rhodopsine arragés en colonnes de dimères.

Méthodes de transfert d'énergie : FRET séquentiel

Le développement des technologies de transfert d'énergie et la création de multiples variants de protéines fluorescentes ont permis la mise au point de protocoles qui allaient rendre possible la détection de plusieurs protéines simultanément en cellules vivantes. L'équipe du Dr. Milligan tire parti en 2007 de 3 variants de la GFP (CFP,YFP, et $DsRed_2$) et des connaissances sur les interfaces de dimérisation du récepteur adrénergique α_{1b}-AR (Carrillo et al., 2004) pour démontrer que ce récepteur forme des oligomères d'ordre

supérieur (Lopez-Gimenez et al., 2007). En utilisant une méthode de FRET séquentiel (figure 13) et des mutations de résidus hydrophobes sur les domaines TM il prouve que trois molécules de récepteurs α_{1b}-AR au moins s'assemblent en trimère dès leur synthèse dans le RE et que l'intégrité des TMI et IV formant l'interface d'interaction des récepteurs est une condition à leur adressage en membrane. Comme pour la dimérisation, l'assemblage oligomérique par l'intermédiaire de plusieurs surfaces de contact aurait donc une importance dans la maturation et l'export des RCPG hors du RE.

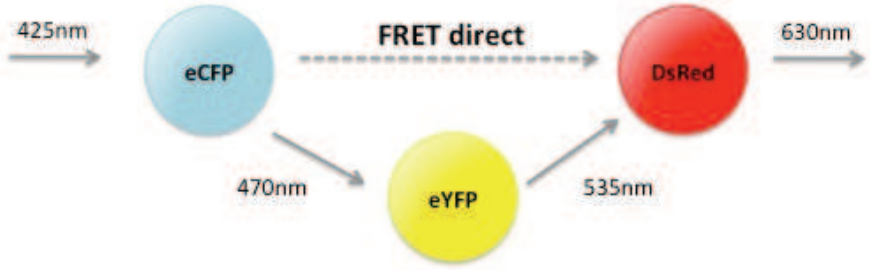


Figure 13 : FRET séquentiel entre 3 variants de la GFP

Essais de complémentation de protéines (PCA)

Une avancée majeure a été de parvenir à détecter l'association de protéines dimériques grâce à la technique de complémentation bimoléculaire d'un fluorophore (BiFC) (Hu et al., 2002) ou d'une enzyme bioluminescente (BiLC**)** regroupé sous le terme de PCA pour essai de complémentation de protéine (Paulmurugan et al., 2002). Les PCA permettront en effet, combinés aux méthodes de transfert d'énergie, de mesurer des interactions entre trois partenaires au moins. Dans un essai PCA « simple », deux hémifragments d'un fluorophore tel que la GFP ou d'une enzyme luciférase fusionnées génétiquement à deux protéines vont être reconstitués et émettre un signal grâce au rapprochement permis par la dimérisation des protéines d'intérêt (figure14).

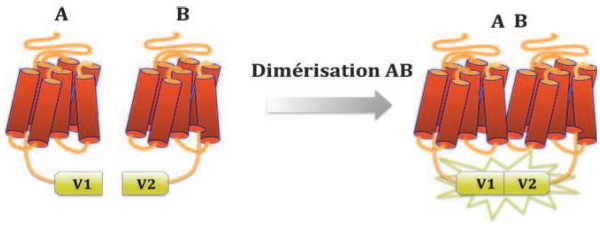


Figure 14 : Schéma de fonctionnement des essais de complémentation de protéine

Comme elle est basée sur la formation d'un complexe fluorescent à partir de constituants non fluorescents, la BiFC est une méthode très sensible qui a suscité beaucoup d'intérêt; elle a donc été utilisée dans de nombreux organismes (Kerppola, 2006) et la troncation de plusieurs variants de la GFP en différents sites ont été générés (tableau IV).

Tableau IV : Les différents variants de GFP qui ont été utilisés en essais BiFc pour l'étude d'interactions protéine – protéine, et leur site de troncation.

Protéine	Position de coupure	Référence
GFP	157-158	(Ghosh et al., 2000)
YFP/Citrine/Venus	154-155	(Hu et al., 2002)
	172-173	(Shyu et al., 2006)
CFP/Cerulean	154-155	(Hu et al., 2002)
	172-173	(Shyu et al., 2006)
Venus/Cerulean	154-155	(Shyu et al., 2006)
	172-173	(Hu and Kerppola, 2003)
mRFP1-Q66T	154-155	(Jach et al., 2006)
	168-169	
mCherry	159-160	(Fan et al., 2008)

Les différents variants de GFP tronqués ont été utilisés dans un premier temps pour détecter de multiples interactions protéine - protéine par un essai dit de « BiFC multicolore ». Une protéine A fusionnée au fragment C-terminal d'une GFP (cerulean : C_C) peut interagir avec la protéine B ou C fusionnée respectivement avec le N-terminal de la même GFP (cerulean : C_N) ou celui d'un autre variant (venus :V_N). L'interaction des protéines AB donnera une couleur décalée vers le vert alors que l'association AC reconstituera la protéine fluorescente jaune (Kerppola, 2006). Ce procédé qui a par exemple permis la détection simultanée des homodimères adénosine A_{2A} et des hétérodimères A_{2A}/dopamine D_2 (Vidi et al., 2008) n'autorise cependant pas de contrôler la composition de complexes composés de plus de 2 protéines. Mais la troncation d'un fluorophore en tant que rapporteur de la dimérisation allait aussi offrir l'opportunité de combiner la BiFC avec les méthodes de transfert d'énergie (RET) pour détecter l'interaction directe de 3 protéines au moins. En combinant les essais de BRET et de BiFC, l'équipe du Dr. Bouvier démontre que le récepteur du peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) doit être composé d'un dimère de récepteurs CRLR et d'une protéine modifiant l'activité des récepteurs à 1 domaine transmembranaire (RAMP1) pour atteindre la surface cellulaire et être actif (figure15)(Heroux et al., 2007). La puissance de la combinaison des deux méthodes permet à l'auteure de démontrer en BiFC que les homodimères de CRLR et de RAMP1 sont retenus dans le RE alors que l'hétéromultimère $(CRLR)_2$-RAMP1 détecté en BRET est localisé à la membrane plasmique. Peu de temps plus tard une étude sur le récepteur adénosine A_{2A} utilisant la même méthode de BRET-BiFC démontre que ce récepteur forme un trimère au moins (Gandia et al., 2008). De la même manière, la BiFC a pu être combinée au FRET (Shyu et al., 2008); dans ce cas il est possible de déterminer la localisation sub cellulaire du complexe trivalent en microscopie-FRET.

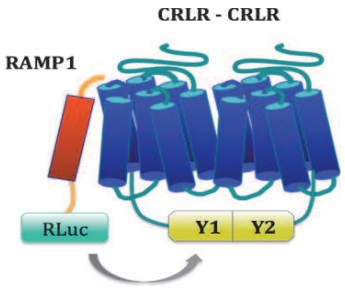


Figure 15 : Combinaison des méthodes de BRET et BiFC

Transfert d'énergie entre RAMP1-*R*Luc et un dimère CRLR-YFP_1 / CRLR-YFP_2 (Y_1 et Y_2)

En prenant en compte l'assemblage en homodimère et en hétérodimère des RCPG, la formation de complexes tétramériques (dimères de dimères) plutôt que trimériques était attendue, et allait de pair avec les tentatives de combiner BiLC et BiFC en FRET et en BRET. À ce jour le BRET seulement a pu être combiné à une double approche de PCA. La preuve de concept est donnée par l'équipe du Dr. Hébert qui parvient à détecter un tétramère de récepteurs adrénergiques β2-AR grâce au BiLC de *Gaussia Princeps G*Luc (tableau V) en tant que donneur d'énergie et un et une BiLC YFP comme accepteur (Rebois et al., 2008). Cependant, si les versions tronquées sauvages des luciférases donnaient de très bon résultats pour détecter des dimères de protéines (Paulmurugan et al., 2004) ou générer des biosenseurs (Stefan et al., 2007), leur utilisation se limitait à la détection de la reconstitution des fragments par émission de luminescence. Le BiLC luciférase n'était cependant assez efficace en tant que donneur d'énergie en BRET et il a donc fallu attendre que les luciférases tronquées portent certaines mutations qui ont amélioré leur rendement quantique (*R*Luc2 et *R*Luc8, voir tableau III et V).

Tableau V : Les différentes luciférases qui ont été tronquées et leur site de coupure.

Protéine	Position de coupure	Excitation/ émission (nm)	Référence
RLuc	110-111	Ch/485	(Stefan et al., 2007)
RLuc	229-230	Ch/485	(Paulmurugan et al., 2004)
GLuc	93-94	Ch/480	(Remy and Michnick, 2006)
RLuc8	229-230	Ch/485	(Guo et al., 2008)
RLuc2	110-111	Ch/485	(Martel et al., 2010)

La BiLC RLuc8 qui fut générée dans le même temps que la BiLC RLuc2 dans notre laboratoire (tableau V) a permis à l'équipe du Dr. Javitch de démontrer un transfert d'énergie robuste en BRET-PCA entre 4 protomères de récepteurs dopaminergiques D_2 (Guo et al., 2008). Dans cette étude les résultats obtenus par l'approche BRET BiLC BiFC sont supportés par la modélisation des deux interfaces d'interaction et confirmés par pontage de cystéines entre les TM. Dans un premier temps l'auteur établit la titration du dimère D_2-venus$_1$/D_2-venus$_2$ sur le dimère D_2-Luc$_1$/D_2-Luc$_2$ et démontre une saturation dans ces conditions, preuve de la spécificité d'interaction des 4 partenaires. En revanche aucun effet du ligand n'est observé sur les tétramères pour démontrer la dynamique de leur interaction. Nous verrons dans l'article 1 et dans la partie discussion que la modulation de l'interaction entre les protomères peut également être prise comme une preuve de spécificité d'interaction entre les récepteurs. Concernant les expériences en pontage de cystéine, la même équipe avait précédemment identifié le TMIV comme interface symétrique de dimérisation du récepteur D2R (Guo et al., 2005); elle confirme ce résultat ici et parvient en plus à identifier un groupe de résidus du TMI comme seconde interface symétrique d'interaction. En prenant en compte les résolutions cristallographiques des

récepteurs de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000) et du récepteur β2-AR (Cherezov et al., 2007), l'auteur confirme à partir de la position de ces segments qu'ils ne peuvent contribuer à la même interface dimérique et que le récepteur D_2 doit être organisé en tétramères à la membranes des cellules intactes. Ces oligomères de récepteurs D_2, comme les oligomères adrénergiques α_{1b} seraient organisés en « chaine » avec une succession d'interactions TMI – TMIV. Par extrapolation, le schéma de plusieurs chaines parallèles s'assimilerait à l'organisation paracristalline de la rhodopsine visualisée en microscopie à force atomique.

En utilisant le FRET en temps résolu et la technologie SNAP-tag pour marquer les sous-unités de leur récepteur, l'équipe du Dr. Pin a démontré que deux hétérodimères $GABA_{b1}$/$GABA_{b2}$ pouvaient s'assembler pour former des dimères d'hétérodimères (Maurel et al., 2008). Cette méthode consiste à fusionner sur le N-terminal du récepteur l'enzyme modifiée O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) qui va catalyser le transfert du groupement benzyl du O^6-benzyl guanine fusionnée à un fluorophore pour marquer irréversiblement la protéine d'intérêt (Keppler et al., 2003). Cette technique présente les avantages majeurs d'effectuer des marquages avec des rapporteurs dont le poids moléculaires est environ 7 fois inférieur à ceux utilisant des anticorps et pouvant se faire exclusivement à la membrane plasmique. Elle permet donc de s'assurer que les signaux de FRET entre deux protéines ne sont pas facilités par un rapprochement des fluorophores dû à la taille des anticorps, et qu'ils ne proviennent pas d'une agrégation dans le RE. La stratégie permettant de démontrer l'oligomérisation de $GABA_b$ a été de regarder si un transfert d'énergie était possible entre deux sous-unités $GABA_{b1}$ ou deux sous-unités $GABA_{b2}$ qui aurait lieu entre deux hétérodimères G_{b1}/G_{b2}. Les auteurs enregistrent un FRET entre les sous-unités G_{b1} alors que les sous-unités G_{b2} semblent être trop distantes; deux hétérodimères G_{b1}/G_{b2} seraient donc capables d'interagir entre eux *via* G_{b1}. Il est important de noter que cette étude est la seule à ce jour à révéler une fonction pour la formation de tétramères, qui serait la régulation de l'activité des protéines G. Les résultats présentés dans

l'article 1 viennent apporter de nouveaux éléments sur l'engagement de la protéine Gαi et de la β-arrestine2 par un hétérocomplexe CXCR4-CCR2.

Choix du modèle d'étude

Le premier et principal article présenté utilise les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR2 comme modèle pour démontrer la formation de tétramères et étudier les mécanismes d'interaction de ces complexes avec leurs effecteurs. L'hypothèse que l'association de ces récepteurs pouvait impliquer plus de deux protomères s'appuie majoritairement sur l'étude où Percherancier *et al*. démontrent que CXCR4 et CCR2 pouvaient former des homodimères, mais aussi des hétérodimères entre eux (Percherancier et al., 2005). Il était donc envisageable que l'hétérodimère soit en fait l'interaction d'un dimère de CXCR4 avec un dimère de CCR2. L'inhibition *trans* allostérique de liaison de ligand observée dans cet hétérodimère (Sohy et al., 2007) et la modulation du changement conformationnel d'un protomère par activation de l'autre révélaient une communication entre ces deux partenaires qui offrait alors l'opportunité d'étudier une interaction dynamique entre deux dimères.

Modèle d'étude: les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2

Généralités

Les chimiokines représentent une large famille de peptides de 6 à 15kDa de la famille des cytokines sécrétées par les cellules de la lignée sanguine. Leur nom qui est la contraction de « chemoattractant cytokines » vient de leur capacité à attirer les cellules par chimiotactisme. Ce sont en effet des acteurs majeurs de la migration cellulaire, impliqués dans la surveillance immunitaire, l'inflammation et le développement (Foxman et al., 1997; Springer, 1994). Leurs actions sont médiées par liaison aux récepteurs chimiokines qui sont des RCPG. Leur importance physiologique mais aussi leur implication dans de nombreuses pathologies telles que l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine

(VIH), les désordres inflammatoires, le cancer et les métastases cancéreuses, en font un sujet d'étude privilégié et une cible thérapeutique très exploitée (Schwarz and Wells, 2002). La résolution de leur structure et de leur fonctionnement sont les clés qui permettront la compréhension de leur mécanisme d'action et la synthèse de composés visant à inhiber leur activité. La coexpression cellulaire de nombreux récepteurs aux chimiokines semble donner lieu à une complexité supplémementaire de la signalisation due à l'intégration de la réponse de plusieurs membres par des phénomènes de coopérativité. La résolution du mode d'interaction de ces récepteurs et de l'influence réciproque de leur signalisation est donc un chapitre crucial de la recherche sur les chimiokines, et plus généralement, sur les RCPG.

Familles de chimiokines et leurs récepteurs

Aujourd'hui 50 chimiokines environ et 20 récepteurs ont été découverts (tableau VI et VII); la nomenclature présentée a été établie par l'union internationale de pharmacologie (Murphy et al., 2000). Habituellement, les chimiokines et leurs récepteurs sont divisés en 4 familles en fonction de la séquence séparant les deux premières cystéines de la chimiokine: C, CC, CXC, CXXXC ont respectivement une seule cystéine, deux cystéines consécutives, un résidu ou trois séparant les deux premières cystéines.

Tableau VI : Chimiokines et récepteurs aux chimiokines CC et leur expression cellulaire.

(TC = lymphocytes T, LB = lymphocytes B, CD = cellules dendritiques, plaq. = plaquettes, MCP-1 = monocyte chemotactic peptide)

Récepteurs	**chimiokines**	**Type cellulaire**
CCR1	CCL3/5/7/13/14/15/16/23	LT, monocytes, éosinophiles, basophiles.
CCR2	CCL2 (**MCP-1**)/7/8/13/16	Monocytes, CD, LT mémoires.
CCR3	CCL5/7/8/11/13/15/16/24/26/28	Éosinophiles, basophiles, mastocytes, plaq.

CCR4	CCL17/22	LT, CD, basophiles, macrophages, plaq.
CCR5	CCL3/4/5/8/11/14/16	LT, monocytes.
CCR6	CCL20	LT, LB, CD.
CCR7	CCL19/21	LT, CD.
CCR8	CCL1	LT, monocytes, CD.
CCR9	CCL25	LT, plasmocytes.
CCR10	CCL27/28	LT.

Tableau VII : Chimiokines et récepteurs aux chimiokines CXC, XC et C3XC et leur expression cellulaire.

(CE = cellules endothéliales, LTh = lymphocytes T helper de type , cellules NK = cellules natural killer, SDF-1 : stromal derived factor)

Récepteurs	**Chimiokines**	**Type cellulaire**
CXCR1	CXCL6/7/8	Neutrophiles, monocytes.
CXCR2	CXCL1/2/3/5/6/7/8	Neutrophiles, monocytes, CE microvascullaires.
CXCR3-A	CXCL9/10/11	LTh1, mastocytes, cellules mesangiales
CXCR3-B	CXCL4/9/10/11	CE microvascullaires, cellules néoplastiques.
CXCR4	CXCL12 (**SDF-1**)	Largement exprimé
CXCR5	CXCL13	LB, LTh folliculaires
CXCR6	CXCL16	LT CD8+, cellules NK, LT CD4+
CXCR7	CXCL12	LT, LB, CD matures
XCR1	XCL1/2	LT, cellules NK
CX3CR1	CX3CL1	Macrophages, CE, cellules lisses vasculaires.

Fonction

Même si de nombreux détails varient en fonction de la chimiokine et du contexte, une représentation générale peut être faite de la migration d'un leucocyte à travers un endothélium à partir de la circulation sanguine, pour atteindre un tissu affecté lors d'une réponse inflammatoire. Dans un premier temps les selectines de l'endothélium interagissent de manière non stable avec les récepteurs mucine sur les leucocytes provoquant un roulement du leucocyte à la surface cellulaire (Springer, 1994). Les chimiokines qui ont été sécrétées en réponse aux cytokines pro inflammatoires lient les glycosaminoglycanes (GAG) à la surface de l'endothélium au niveau du site de l'inflammation (Proudfoot et al., 2003). La concentration localisée de chimiokines donne alors un signal directionnel aux cellules. La liaison de la chimiokines à son récepteur sur le leucocyte déclenche une réponse intracellulaire qui résulte en son adhésion *via* des intégrines et son extravasation du sang vers les tissus où elle exercera son rôle.

Le Récepteur CCR2.

Le récepteur CCR2 est cloné en 1994 par le groupe du Dr. Charo; deux variants d'épissage de 360 résidus (CCR2a) et 374 résidus (CCR2b) qui se distinguent par la longueur de leur extrémité C-terminale ont été isolés (Charo et al., 1994). Les deux variants diffèrent dans certaines de leurs voies de signalisation et de leurs actions; par exemple la mobilisation de calcium n'est pas requise pour la chimiotaxie induite par CCR2a alors qu'elle l'est pour CCR2b (Cho et al., 2007). Avec quelques prédominances pour un variant ou l'autre, CCR2 est exprimés dans les monocytes, les lymphocytes T mémoire, lymphocytes B et dans les basophiles (Frade et al., 1997); et peut avoir une action pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction du type cellulaire sur lequel il est exprimé.

Chimiokine MCP-1

Comme la plupart des récepteurs aux chimiokines, CCR2 peut être activé par plusieurs ligands (tableau VI). CCL2 ou MCP-1 dont il sera question dans cet exposé est la première chimiokine de type CC découverte chez l'humain. Elle est composée de 76 acides aminés (Van Coillie et al., 1999) et elle est un puissant facteur chimiotactique des monocytes. MCP-1 est exprimé par de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales, épithéliales, et les muscles lisses (Cushing et al., 1990; Standiford et al., 1991); cependant les monocytes/macrophages sont la source principale de MCP-1 (Yoshimura et al., 1989). La chimiokine peut être produite soit constitutivement, soit après induction par un stress oxydatif, des cytokines ou des facteurs de croissance. Elle régule la migration des monocytes, des lymphocytes T, cellules NK, et elle est impliquée dans de nombreuses pathologies incluant la sclérose multiple (Sorensen et al., 2004), l'arthrite rhumatoïde (Hayashida et al., 2001), l'athérosclérose (Kusano et al., 2004), et les diabètes insulino-dépendants (Sartipy and Loskutoff, 2003).

Signalisation de CCR2

CCR2 lie la chimiokine MCP-1 à haute affinité avec un Kd de 260pM et induit une mobilisation de calcium rapide par l'activation de la PLC-β *via* les sous-unités Gβγ ainsi qu'une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase. Comme pour la plupart des récepteurs aux chimiokines CCR2, est couplé à la voie des protéines $G\alpha_i$ et les voies de signalisation précédemment citées sont donc inhibées par traitement à la PTX (Myers et al., 1995). Il a également été démontré que la protrusion des lamellipodes dépendait de l'activation de la PI3K et de la petite protéine G Rac (Terashima et al., 2005). La liaison de MCP-1 à CCR2 induit une désensibilisation rapide de la réponse calcique due à la phosphorylation de résidus sérine et thréonine sur son C-terminal par les protéines GRK2 et GRK3 suivie par le recrutement de β-arrestine (Aragay et al., 1998). L'internalisation de CCR2 via la β-arrestine suit un mécanisme dépendant de la clathrine et semble requise pour permettre l'activation des MAPK $ERK_{1/2}$ (Garcia Lopez et al., 2009).

Rôle physiologique

MCP-1 et plusieurs autre chimiokines sont exprimées lors de l'inflammation des tissus en réponse aux médiateurs pro-inflammatoires facteur de nécrose tumorale α (TNF-α), l'interleukine 1 (IL-1) et aux endotoxines (Strieter and Kunkel, 1993). L'axe MCP-1 / CCR2 joue un rôle clé dans le recrutement des monocytes lors d'une infection ou dans d'autres conditions inflammatoire. L'expression de MCP-1 plutôt que d'autres chimiokines dépend de l'invasion bactérienne considérée et va promouvoir l'émigration des monocytes inflammatoires de la moelle osseuse vers la circulation sanguine et sur le lieu de l'infection ou ils se différencieront en macrophages (Deshmane et al., 2009). Les modèles murins invalidés pour le gène de CCR2 sont viables et présentent de nombreux phénotypes différents relatifs au défaut de recrutement des macrophages, cellules présentatrices d'antigène (CPA) et de lymphocytes T tels que des défauts de clairance du cholestérol (Stein et al., 2003), la susceptibilité aux pathogènes comme *mycobactérium tuberculosis* (Peters et al., 2001), mais aussi une propension à l'arthrite induite par le collagène (Quinones et al., 2004), ou une perte de la douleur neuropathique (Abbadie et al., 2003).

Dimérisation

Plusieurs études utilisant les techniques de co-immunoprécipitation (Rodriguez-Frade et al., 1999) ou de BRET (El-Asmar et al., 2005; Percherancier et al., 2005) montrent que CCR2 peut former des homodimères. L'ambigüité selon laquelle la dimérisation serait induite par le ligand (Rodriguez-Frade et al., 1999) ou constitutive (El-Asmar et al., 2005; Percherancier et al., 2005) a été abordée dans le chapitre « dimérisation induite par le ligand » (page 43), et le cas spécial des récepteurs aux chimiokines sera développé dans le chapitre concernant l'homodimère CXCR4 (page 89). Néanmoins, l'observation d'un signal de BRET basal entre les deux sous-unités CCR2 et l'augmentation de ce signal suite à la stimulation par le MCP-1 est considérée comme une preuve de spécificité d'interaction des deux protomères à la membrane plasmique (Percherancier et al., 2005). Parmi les preuves fonctionnelles de la dimérisation de CCR2, la génération d'un mutant CCR2b-

Y139F qui n'est plus capable de générer une réponse calcique agirait comme un dominant négatif sur la réponse du CCR2 sauvage (Rodriguez-Frade et al., 1999).

L'hétérodimérisation de CCR2 avec CCR5 qui a été démontrée en BRET également a un intérêt particulier puisqu'elle suggère fortement l'influence de la conformation d'un protomère sur l'autre au sein d'un hétérodimère; en effet, le ligand de CCR5 est capable d'inhiber la liaison du ligand de CCR2 uniquement lorsque les deux récepteurs sont exprimés, démontrant un phénomène d'allostérie négative entre ces deux récepteurs (El-Asmar et al., 2005).

Le récepteur CXCR4.

Généralités

Le récepteur CXCR4 a été cloné en 1993 par plusieurs équipes en tant que récepteur orphelin aux chimiokines et fut nommé LESTR ou fusin (Loetscher et al., 1994; Nomura et al., 1993). En 1996, il est identifié comme un co-facteur essentiel d'entrée du VIH-1 et VIH-2 sur les lymphocytes T CD4+ (Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Feng et al., 1996). Ce n'est que lorsque le SDF a été reconnu comme son ligand biologique qu'il a été reclassé comme le récepteur chimiokine CXCR4 (Bleul et al., 1996a; Oberlin et al., 1996). Son expression a été rapportée à la surface de la plupart des leucocytes, incluant la majorité des lymphocytes T, tous les lymphocytes B et monocytes, et très peu sur les cellules NK (Hori et al., 1998). Cependant, à la différence des autres récepteurs chimiokines, il est exprimé dans de nombreux autres tissus et aurait notamment un rôle dans le développement du cerveau et des tissus cardiaques (Jazin et al., 1997; Zou et al., 1998). Les souris invalidées pour le gène de CXCR4 présentent globalement le même phénotype de létalité périnatale que celles n'exprimant plus le SDF, et révèlent le rôle essentiel de CXCR4 dans le développement, l'organogénèse, l'hématopoïèse et la vascularisation (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998). Ses multiples rôles physiologiques, son implication en tant que corécepteur d'entrée du VIH, et son expression dans 23 types de cancers d'origines diverses (Balkwill, 2004b) en ont sans doute fait le récepteur aux chimiokines le plus étudié. L'étude

de l'assemblage oligomérique de CXCR4 en homo-complexes et avec d'autres récepteurs aux chimiokines, notamment CCR2, a apporté des éléments nouveaux sur la compréhension de son fonctionnement ainsi que de nouvelles pistes thérapeutiques.

La chimiokine SDF-1

La chimiokine SDF-1 (CXCL12) a été isolée à partir de cellules stromales issues de la moelle osseuse; la fonction qui lui est attribuée est le support de la prolifération des progéniteurs des lymphocytes B en présence d'interleukine-7 (IL7) (Nagasawa et al., 1994; Tashiro et al., 1993). SDF-1 présente un fort chimiotactisme envers les lymphocytes et les monocytes et elle est exprimée constitutivement dans un nombre élevé de tissus; son expression ne dépend donc pas de stimuli pro inflammatoires à la différence des autres chimiokines connues (Bleul et al., 1996b; Nagasawa et al., 1994). Deux isoformes liant le récepteur CXCR4 avec une affinité similaire d'environ 10nM (Hesselgesser et al., 1998) sont classiquement décrits; SDF-1α est constitué de 68 résidus et SDF-1β de 72 résidus par extension de 4 résidus sur son extrémité C-terminale (Shirozu et al., 1995). Quatre autres variants d'épissages SDF-1 $\gamma/\delta/\varepsilon/\varphi$ portant aussi des extensions C-terminales sont désormais décris (Yu et al., 2006). Ces isoformes sont fonctionnels et présentent une distribution tissulaire différente mais leur rôle est méconnu.

SDF1 présente une structure tridimensionnelle en clé grecque classique des chimiokines; l'extrémité N-terminale désordonnée est suivie par une longue boucle (boucle N), un feuillet β à trois brins antiparallèles puis un domaine C-terminal en hélice α. Deux ponts disulfures relient la boucle N aux brins β2 et β3 (Crump et al., 1997). Les sites de liaison au récepteur se situeraient principalement sur les 17 premiers acides aminés de la portion N-terminale dont un motif RFFESH particulièrement important qui interagirait avec l'extrémité N-terminale de CXCR4. Ce motif servirait de point d'ancrage à la chimiokine pour permettre la liaison subséquente de ses deux premiers résidus sur les boucles extracellulaires du récepteur (Crump et al., 1997; Gozansky et al., 2005). SDF-1 a été décrite comme une protéine monomérique (Crump et al., 1997), dimérique (Dealwis et al.,

1998), ou en équilibre monomère – dimère (Holmes et al., 2001). La liaison du SDF aux Glycosaminoglycanes (GAG) faciliterait la dimérisation du SDF in vivo (Veldkamp et al., 2005); cependant le monomère est rapporté comme étant la forme active au moins pour certaines fonctions (Veldkamp et al., 2009). Le rôle crucial de SDF-1 est supporté par la délétion de son gène chez la souris qui conduit à la mort périnatale des animaux à cause d'une réduction importante de la lymphopoïèse des lymphocytes B et de la myélopoïese de la moelle osseuse, mais également d'une atrophie du septum ventriculaire cardiaque (Nagasawa et al., 1996). De plus, sa séquence en acides aminés est remarquablement conservée entre les espèces avec 99% d'homologie entre la souris et l'humain (Shirozu et al., 1995; Tashiro et al., 1993), suggérant un rôle essentiel de cette chimiokine dans la physiologie animale.

Liaison de la chimiokine SDF-1 par CXCR4.

La portion N-terminale de CXCR4 est impliquées dans la liaison du SDF selon un mécanisme en deux étapes; l'interaction initiale entre les résidus 12 à 17 du SDF et 2 à 36 de CXCR4 provoquerait un changement de conformation du récepteur (Huang et al., 2003) qui faciliterait l'interaction entre les huit premiers acides aminés de SDF et les boucles extracellulaires e_2 (Asp187) et e_3 (Glu268) de CXCR4 (Brelot et al., 2000; Zhou et al., 2001). La sulfatation de certaines tyrosines de l'extrémité N-terminale de CXCR4 (Tyrosines 7, 12, et 21) semble aussi être importante dans la liaison du SDF à haute affinité. De manière intéressante, une étude en RMN révèle un complexe symétrique 2 :2 dans lequel un dimère de SDF est stabilisé par les liaisons aux sulfotyrosines de chaque récepteur. Le dimère de SDF qui est capable de générer une réponse calcique bloque en revanche la chémotaxie, contrairement au monomère qui permet les deux réponses (Veldkamp et al., 2008). Le changement dynamique de l'état oligomérique du ligand pourrait donc être à l'origine d'une nouvelle diversité dans la signalisation de CXCR4.

Autres ligands de CXCR4.

Le tableau VIII présente les ligands connus de CXCR4; parmi eux il est important de noter que l'AMD 3100 ou Plerixafor a été identifié à l'origine comme un agent inhibant

la réplication des VIH-1 et VIH-2; l'essai clinique en phase I révèle cependant une augmentation des cellules de la lignée blanche dans le sang (De Clercq, 2003). En effet, l'AMD a une action antagoniste sur le SDF qui retient les cellules souche dans la moelle osseuse (homing); la conséquence est une augmentation de leur nombre dans le sang périphérique. Le Plerixafor (Mozobil) est maintenant testé cliniquement comme un mobilisateur des cellules souches sanguines pour aider la transplantation autologue des cellules souches chez les patients atteints de lymphomes non-Hodkiniens et de myélomes multiples (De Clercq, 2010).

Tableau VIII : Principaux ligands de CXCR4

Ligand	**Forme**	**Action**
CXCL12 (SDF)	peptide	Agoniste plein
CXCL12 1-17	Fragment peptidique	Agoniste plein
AMD3100	Composé Synthétique organique	Agoniste partiel / antagoniste
ALX40-4C	Peptide	Agoniste partiel
T134	Peptide	Antagoniste
T140	Peptide	Agoniste inverse
vMIP-II	Peptide	Antagoniste
T22	Peptide	Antagoniste

Structure du récepteur CXCR4

CXCR4 est un récepteur de 352 acides aminés composé d'une partie N-terminale de 39 résidus et un C-terminal de 45 résidus. Plusieurs résidus importants pour la structure et

la signalisation de CXCR4 ont été décrits; le motif DRY hautement conservé dans la boucle i_2 des RCPG est un pivot permettant l'activation du récepteur suite au réarrangement conformationnel induit par le ligand (Cotecchia et al., 2003). Certaines mutations dans ce motif altèrent significativement l'activité de la protéine G (Berchiche et al., 2007). Le motif TXP dans le deuxième TM est un déterminant structural qui est très conservé dans la famille des récepteurs aux chimiokines; par contre, si la mutation de la thréonine rend les récepteurs CCR2 et CCR5 constitutivement actifs, elle n'affecte pas CXCR4 (Alvarez Arias et al., 2003). En revanche la mutation de l'asparagine 119 (N119) dans le troisième TM peut rendre CXCR4 constitutivement actif lorsqu'elle est substituée par une serine (S) ou une alanine (A) (Zhang et al., 2002). La mutation de N119 en lysine (N119K) empêche CXCR4 d'induire la signalisation : l'échange GDP-GTP est abolit et l'inhibition de la production d'AMPc presque inexistante (Berchiche et al., 2007).

Une avancée majeure pour la compréhension du fonctionnement de CXCR4 et des RCPG en général vient d'être franchie par sa très récente résolution cristallographique (Wu et al., 2010). En plus d'en décrire la structure tertiaire, cette étude montre pour la première fois un dimère de récepteur de classe A dans les 5 cristaux dont la structure a été résolue. Comme pour les récepteurs β2-AR et A_{2A}, CXCR4 a été stabilisé par insertion du lysosyme T4 mais aussi d'une mutation thermo stabilisatrice et en présence d'un dérivé d'isothio-urée IT1t ou d'un peptide cyclique à 16 résidus CVX15, tous deux des antagonistes. Par rapport aux récepteurs cristallisés précédemment, la structure de CXCR4 présente de nombreuses différences dans l'orientation de ses domaines TM qui se répercutent surtout sur le domaine extracellulaire, soulignant l'intérêt de ce modèle de récepteur à ligand protéique. La poche de liaison est plus large, ouverte, et située plus proche de la surface extracellulaire que les précédentes structure; l'IT1t en occupe une partie délimitée par les TM I, II, III, VII, ce qui le différencie aussi des ligands décris dans les précédents cristaux. Certaines différences sont aussi notées dans le domaine intracellulaire, notamment l'absence de l'hélice VIII qui est supposée être une caractéristique structurale des récepteurs de classe A. S'il est possible que cette absence soit due à un artéfact du cristal, le motif consensus de l'hélice α n'est que partiellement conservé dans ce récepteur, ce qui pourrait la rendre plus instable. Les auteurs

notent également que contrairement à de nombreux RCPG, CXCR4 n'a pas de site de palmitoylation à la fin de l'hélice VIII. L'apport majeur de cette étude dans le cadre de cet exposé est la révélation d'une structure en dimère de CXCR4. Lorsque le récepteur est lié à IT1t, l'interface de dimérisation implique le côté extracellulaire des hélices V et VI (figure 16). L'association en dimère serait due majoritairement à des interactions hydrophobes impliquant une dizaine de résidus dans ces deux TM mais aussi la boucle extracellulaire e_2. Le dimère lié par CVX15 est pour sa part stabilisé par le côté intracellulaire des hélices III et IV et la boucle intracellulaire i_2. De manière intéressante, les auteurs notent que la liaison à CVX15 induit un changement conformationnel qui ramène les parties intracellulaires de l'hélice V de chaque protomère à proximité, ce qui pourrait expliquer les phénomènes de coopérativité observés pour certains ligands de CXCR4.

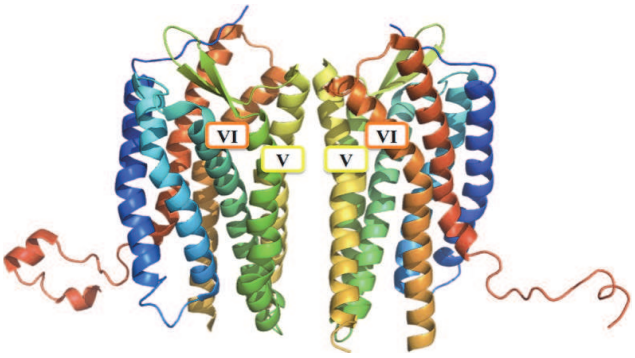


Figure 16 : Représentation tridimensionnelle de la structure du dimère CXCR4

Réalisé à l'aide du logicile PyMol et du pdb 3ODU.

Rôles physiologiques

SDF-1 est un chimio-attracteur très efficace des lymphocytes T et des monocytes par sa liaison à CXCR4 et joue donc un rôle majeur dans le recrutement de ces cellules aux sites de l'inflammation mais aussi dans la domiciliation (homing) des lymphocytes T aux

sites de l'immunité (Bleul et al., 1996a; Bleul et al., 1996b; Oberlin et al., 1996). La chimiotaxie peut être modulée par certaines cytokines telles que IL4 ou IL10 qui augmentent ou diminuent respectivement l'expression de CXCR4 sur les lymphocytes T (Jinquan et al., 2000).

Le couple CXCR4-SDF à également un rôle dans l'hématopoïese où il attire et retient les précurseurs des lymphocytes B dans certains microenvironnements de la moelle osseuse pour permettre leur croissance et leur différentiation en lymphocytes B matures (D'Apuzzo et al., 1997). Ces données ont été confirmées sur les souris KO CXCR4 chez lesquelles le nombre de lymphocytes pro-B est fortement diminué dans le foie et la moelle osseuse, les deux organes hématopoïétiques majeurs de la vie embryonnaire et adulte respectivement (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998). CXCR4 et son ligand induisent également une réponse des cellules CD34+ fétales et adultes de la moelle osseuse (Aiuti et al., 1999; Jo et al., 2000), des CD34+ du sang périphérique (Lataillade et al., 2000), et des progéniteurs des mégacaryocytes (Hamada et al., 1998), indiquant un rôle majeur pour diriger la migration de ces cellules progénitrices aux sites appropriés de la moelle osseuse.

L'implication de l'axe SDF-CXCR4 dans le développement a également pu être mis à jour grâce à la délétion des gènes de la chimiokine et de son récepteur chez la souris. Les animaux KO SDF meurent *in-utero* par déficit d'hématopoïèse et une cardiogénèse anormale. En plus de ce phénotype, les souris KO CXCR4 présentent une malformation des vaisseaux larges du tractus gastro-intestinal sans doute dû à un manque de ramifications vasculaires, confirmant les études antérieures qui mentionnaient que CXCR4 et SDF pouvaient induire la migration de cellules endothéliales en culture et participer à l'angiogénèse (Ma et al., 1998; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). CXCR4 joue aussi un rôle important dans le développement neuronal; son expression a été détectée dans les cornes dorsales de la moelle épinière, le cortex moyen et préfrontal, l'hypothalamus et les tissus olfactifs, et dans le cervelet (McGrath et al., 1999; Zou et al., 1998). Dans le développement normal, les cellules de la couche granulaire externe cérébelleuses migrent vers les couches internes en passant par les cellules de Purkinje juste après la naissance;

chez les souris KO CXCR4 cette migration est prématurée, provoquant une malformation du cervelet (Zou et al., 1998).

La capacité chimiotactique du couple CXCR4-SDF est donc utilisée durant toute la vie de l'organisme pour réguler des fonctions clés telles que l'embryogénèse, l'immunité et l'hématopoïèse.

Pathologies impliquant CXCR4.

Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

L'entrée du VIH dans la cellule est un processus en plusieurs étapes; la protéine d'enveloppe virale gp120 lie d'abord la protéine CD4 à la surface de l'hôte; cette interaction provoque un changement conformationnel exposant la boucle variable V3 et permettant au complexe de lier un récepteur aux chimiokines et provoquer la fusion entre la membrane virale et celle de la cellule hôte (Olson et al., 1999; Wu et al., 1996). Les récepteurs chimiokines les plus importants impliqués dans l'entrée virale sont les récepteurs CXCR4 et CCR5, même si d'autres peuvent être impliqués (Neil et al., 2005). La liaison du VIH-1 à CCR5 par la souche R5 serait responsable de la transmission virale et dominerait durant la phase asymptomatique de l'infection, alors que l'utilisation de CXCR4 comme co-récepteur par la souche X4 interviendrait quand l'infection est avancée, concomitant avec l'apparition des signes cliniques (Connor et al., 1997; Feng et al., 1996). Comme il a été montré que les ligands de CCR5 et CXCR4 pouvaient inhiber l'entrée du VIH dans la cellule, plusieurs molécules et peptidomimétiques liant ces récepteurs sont des candidats potentiels dans la prévention et / ou le traitement de l'infection. Il est intéressant de noter qu'une mutation naturelle de CCR5 provoquant la délétion de 32 paires de bases (CCR5Δ32) résulte en une rétention intracellulaire du récepteur et donne une résistance quasi complète aux individus homozygotes vis à vis de l'infection (Liu et al., 1996; Samson et al., 1996); le fait que ces individus vivent sans perturbation notoire signifie que l'inhibition de ce récepteur par des drogues est un projet clinique pertinent. Comme

mentionné plus haut, l'inhibition de CXCR4 pose en revanche beaucoup plus de problèmes en perturbant le trafic et la domiciliation des lymphocytes T.

Cancer

CXCR4 est le récepteur aux chimiokines le plus souvent exprimé sur les cellules cancéreuses (Zlotnik, 2006), et se retrouve dans plus de 20 types de cancers (Balkwill, 2004b). La surexpression de CXCR4 a pu être constatée sur plusieurs tissus tumoraux qui n'expriment habituellement pas, ou peu, ce récepteur (Muller et al., 2001). Une des raisons de cette dérégulation est la condition d'hypoxie dans laquelle se trouvent les cellules au sein d'une tumeur, qui peut permettre l'activation du facteur induit par l'hypoxie (HIF1) (Hirota and Semenza, 2006); HIF1 permet en retour l'expression de nombreux gènes dont CXCR4 (Staller et al., 2003). De nombreux autres facteurs tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ou NF-κB ont la capacité d'augmenter l'expression cellulaire de CXCR4. Comme mentionné plus haut, CXCR4 tient un rôle dans l'organogénèse, ce qui implique une fonction dans la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, mais aussi l'organisation correcte d'un organe en développement; et c'est ce qui en fait un candidat idéal dans l'évolution d'une tumeur. Mais le plus marquant dans la progression d'une tumeur est sans doute l'utilisation détournée de la chimiotaxie permise par l'axe CXCR4-SDF pour générer des métastases dans des organes distants. Dans le cas du cancer du sein, les cellules surexprimant CXCR4 vont préférentiellement migrer vers les organes secondaires présentant les plus fortes concentrations de SDF-1: le foie, les poumons, la moelle osseuse, et le cerveau (Muller et al., 2001). Les données présentées dans l'article 3 démontrent une nouvelle voie de signalisation qui provoque la migration des cellules de tumeurs mammaires par l'activation de CXCR4 et la dissémination de métastases. La neutralisation de ces voies de signalisation est donc un enjeu thérapeutique majeur.

Le syndrome WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, recurrent bacterial Infection, and Myelokathexis)

Ce syndrome est dû à des mutations hétérozygotes pour le gène encodant CXCR4, qui aboutissent toutes à des troncations de l'extrémité C-terminale du récepteur et qui éliminent par conséquent des sites de phosphorylation. Les CXCR4 mutés ne sont plus désensibilisés ni internalisés (Balabanian et al., 2005), et démontrent une réponse calcique et une chimiotaxie accrue (Kawai et al., 2005). Il est intéressant de noter que des cas de WHIM ont été trouvés chez des patients ne présentant pas de mutations du CXCR4 (Balabanian et al., 2005); le perte de désensibilisation et d'internalisation serait due ici à une régulation anormale du récepteur par les protéines GRK et / ou arrestines qui mimeraient les effets de la troncation de CXCR4.

Signalisation

Le récepteur CXCR4 est majoritairement couplé à la protéine Gαi (Ganju et al., 1998) avec laquelle il interagit par les boucles intracellulaires i_2 et i_3 (Roland et al., 2003). La stimulation par SDF résulte en l'inhibition de l'adénylate cyclase et donc une diminution de la concentration en AMPc, mais aussi l'activation des tyrosines kinases de la famille Src. La voie Gi active également la PLC-β par les protéines Gβγ ainsi que la PI3K (Curnock et al., 2003; Dutt et al., 1998). Ces voies de signalisation dépendantes de la protéine Gi (figure 17) sont donc sensibles à la PTX et aboutissent à l'initiation de la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, et la transcription de gènes. Il a cependant été démontré que la migration ne dépendait pas que de voies de signalisation sensibles à la PTX : alors que Gi active Rac par les protéines Gβγ, la migration des lymphocytes T Jurkat dépend aussi du couplage de CXCR4 à $G\alpha_{13}$ pour activer Rho, et les deux voies seraient nécessaire à la réponse au SDF (Tan et al., 2006).

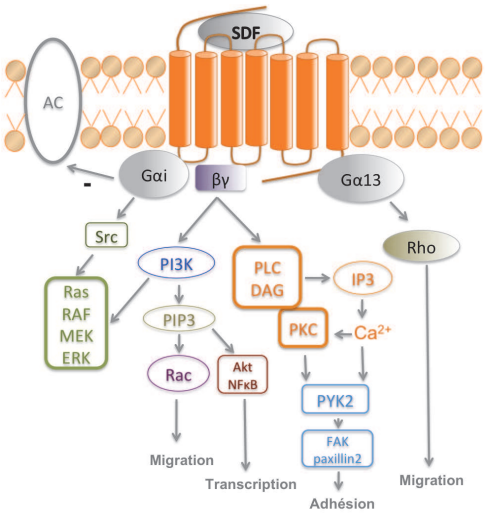


Figure 17 : Voies de signalisation de CXCR4 dépendantes des protéines G.

Certaines voies de signalisation utilisées par CXCR4 ont été proposées comme étant indépendantes des protéines G. La liaison de SDF induit l'association et l'activation de JAK2/3 qui permet le recrutement et la phosphorylation de plusieurs membres de la famille STAT et leur translocation nucléaire (Vila-Coro et al., 1999). Les β-arrestines 2 et 3, en plus de leur rôle dans la désensibilisation et l'internalisation, sont aussi responsables d'une signalisation indépendante des protéines G; une étude rapporte en effet que la chimiotaxie en réponse au SDF est diminuée dans des lymphocytes issus de souris KO pour la β-arrestine 2 (Fong et al., 2002). Le rôle de protéines de soutien joué par les arrestines permet aussi d'augmenter la réponse des MAPK ERK (Cheng et al., 2000) et d'activer la MAPK p38 pour induire la migration (Sun et al., 2002).

Terminaison de la signalisation par les GRK et les arrestines

Le récepteur CXCR4 est rapidement phosphorylé et internalisé suite à son activation par le SDF (Haribabu et al., 1997; Signoret et al., 1997). La régulation homologue de CXCR4 impliquerait au moins GRK2 et GRK6; en effet la coexpression de GRK2 et β-

arrestine 1 ou 2 potentialise l'internalisation de CXCR4 (Cheng et al., 2000; Orsini et al., 2000), et le KO de GRK6 potentialise l'activité GTPase de Gαi et la libération de calcium intracellulaire par défaut de désensibilisation (Fong et al., 2002; Vroon et al., 2004). La troncation de l'extrémité C-terminale de CXCR4 a été effectuée pour identifier les sites de sa régulation; il en résulte une perte de phosphorylation, une augmentation de l'activité du récepteur et une diminution de son internalisation (Haribabu et al., 1997; Signoret et al., 1997). En effet plusieurs études rapportent que sur les 45 acides aminés de la partie C-terminales, les 3 thréonines et 15 sérines sont pour la plupart phosphorylées et régulent l'activité du récepteur (figure 18) (Orsini et al., 2000; Signoret et al., 1998). La boucle intracellulaire i_3 semble aussi pouvoir lier la β-arrestine et cette interaction régulerait l'internalisation du récepteur ainsi que l'activation de MAPK $ERK_{1/2}$ (Cheng et al., 2000). Plusieurs travaux démontrent que les RCPG peuvent être régulés par de multiples kinases permettant la désensibilisation préférentielle de certaines voies de signalisation; c'est le cas du récepteur CXCR4 (Busillo et al., 2010) qui sera présenté dans l'article 2 mais aussi du β2-AR (Violin et al., 2006), V2R (Ren et al., 2005), et AT1(Kim et al., 2005).



Figure 18 : C-terminal de CXCR4

Sérines de l'extrémité C-terminale de CXCR4 dont la phosphorylation a été décrite.

Suite à la phosphorylation de son C-terminal et au recrutement des β-arrestines, les récepteurs CXCR4 sont internalisés. Seulement 5 à 30% de récepteurs sont recyclés à la membrane plasmique en fonction du type cellulaire (Tarasova et al., 1998), la plupart étant

adressés aux lysosomes pour dégradation après ubiquitination par AIP4 (Marchese et al., 2003).

Dimérisation / oligomérisation

Sur la vingtaine de récepteurs aux chimiokines actuellement connus, environ 1/3 sont décrit comme pouvant former des homo et / ou hétérodimères entre eux (tableau IX). À cette liste s'ajoute un nombre aussi important d'interactions avec d'autres familles de récepteurs plus lointaines; pour un aperçu complet, consulter (Khelashvili et al., 2010). Cette section de l'exposé n'abordera que l'oligomérisation de CXCR4 et la formation d'hétérocomplexes avec d'autres membres de la famille des récepteurs aux chimiokines, et principalement avec CCR2.

Tableau IX : Homo et hétéro-dimères de récepteurs aux chimiokines, et les méthodes ayant permis leur détection.

Dimère	Méthode	Référence
CCR2-CCR2	BRET, **co-iP**	(El-Asmar et al., 2005; Percherancier et al., 2005)
CCR2-CCR5	BRET, co-iP, radioliaison	(El-Asmar et al., 2005)
CCR2-CXCR4	BRET, radioliaison	(Percherancier et al., 2005; Sohy et al., 2007)
CXCR4-CXCR4	BRET, FRET	(Babcock et al., 2003; Percherancier et al., 2005)
CCR5-CCR5	FRET, BRET, Co-iP, pontage de cystéines	(El-Asmar et al., 2005; Hernanz-Falcon et al., 2004; Issafras et al., 2002)
CXCR1-CXCR1	FRET, BRET, Co-iP,	(Wilson et al., 2005)

CXCR1-CXCR2	FRET, BRET, Co-iP,	(Wilson et al., 2005)
CXCR2-CXCR2	FRET, BRET, Co-iP,	(Trettel et al., 2003; Wilson et al., 2005)
CXCR7-CXCR7	BRET	(Kalatskaya et al., 2009)
CXCR4-CXCR7	FRET	(Sierro et al., 2007)
CXCR4-CCR5	BRET	(Contento et al., 2008)

Homodimère CXCR4

L'homodimérisation de CXCR4 a elle aussi été démontrée par plusieurs équipes utilisant des techniques différentes; l'ambiguïté encore une fois est de définir si CXCR4 est un homodimère constitutif ou si c'est la stimulation par le SDF qui induit sa dimérisation. Vila-Coro *et al*. montrent que suite à l'immunoprécipitation de CXCR4, seules les cellules ayant été stimulées avec du SDF présentent des bandes immunoréactives à 80kDa, le poids moléculaire approximatif d'un dimère de CXCR4 (Vila-Coro et al., 1999). Cependant, ces résultats peuvent aussi s'expliquer par un changement conformationnel au sein d'un dimère pré existant qui rendrait l'interaction des protomères plus stable; cette hypothèse est par ailleurs étayée par les variations de l'interface de contact observées sur la structure cristallographique du dimère CXCR4 lié à CVX15 (Wu et al., 2010), et les données obtenues en BRET (Percherancier et al., 2005). De plus, les auteurs utilisent un agent de pontage dans leur expérience et il est possible que la présence de la chimiokine liée aux dimères de récepteurs augmente l'efficacité du pontage en liant les protomères via les chimiokines. Dans une autre étude menée en FRET cette fois, Toth et al. constatent un transfert d'énergie basal entre CXCR4-CFP et CXCR4-YFP et une augmentation de signal après stimulation par le SDF; ils en concluent que la dimérisation de CXCR4 peut se faire de manière indépendante mais aussi dépendante du ligand (Toth et al., 2004). En parallèle, plusieurs travaux démontrent que la dimérisation de CXCR4 est constitutive (Babcock et

al., 2003; Issafras et al., 2002; Percherancier et al., 2005; Wang et al., 2006). Les courbes de titration obtenues par Percherancier et al. pour l'homodimère CXCR4 en absence et en présence de ligand révèlent un BRET basal augmenté par le SDF mais où le $BRET_{50}$ reste inchangé; ils concluent donc que le ligand induit un changement conformationnel entre les protomères mais que le nombre de dimères formés ne varie pas (page 44) (Percherancier et al., 2005).

Dans cette même étude les auteurs constatent qu'un peptide issu du TMIV a la capacité d'inhiber le changement conformationnel et la réponse calcique induit par le SDF, prouvant l'implication du réarrangement des protomères dans la fonction du récepteur (Percherancier et al., 2005). L'effet d'un peptide issu de ce TM a été rapporté également par Wang et al. qui constatent non seulement une réduction du FRET dans le dimère CXCR4 mais aussi une inhibition de la polymérisation d'actine et de la chimiotaxie induite par le SDF sur des cellules tumorales (Wang et al., 2006). L'implication apparente de ce TM dans la dimérisation et les récentes évidences cristallographiques impliquant les TMV et TMVI (Wu et al., 2010), suggérent encore une fois la possibilité d'interfaces multiples d'interaction. Une évidence physiologique de la dimérisation de CXCR4 a été fournie dans l'étude du syndrome WHIM (voir page 84). Les individus hétérozygotes exprimant les versions tronquées et sauvages du récepteur présentent le même phénotype que les homozygotes pour la mutation, à savoir une potentialisation de la chemotaxie et de l'activation des MAPK $ERK_{1/2}$ (Balabanian et al., 2005). Comme la perte d'internalisation du CXCR4 mutant est retrouvée également sur le sauvage et que les deux versions du récepteur (sauvage et mutant) peuvent former des « hétérodimères », les auteurs concluent alors que le mutant peut altérer la fonction du sauvage par dimérisation (Lagane et al., 2008).

Hétérodimérisation

Le recrutement de CXCR4 et CCR5 à la synapse immunologique des lymphocytes T et leur association subséquente permettrait la co-stimulation de ces cellules par les chimiokines. L'hétérodimère CXCR4/CCR5 pourrait se coupler à Gq et /ou G_{11} au lieu de Gi pour générer un signal pouvant augmenter l'activation des cellules T (Contento et al., 2008; Molon et al., 2005). CXCR4 peut également former un hétérodimère avec CXCR7, un récepteur qui a la particularité de lier le même ligand, SDF-1. Cet hétérodimère constitutif a été révélé en FRET et en co-immunoprécipitation et potentialiserait la réponse calcique de CXCR4 (Sierro et al., 2007).

L'hétérodimère CXCR4 / CCR2 qui est la pierre angulaire de cette thèse serait lui aussi formé de manière constitutive car un signal de BRET basal est observé entre les deux récepteurs. De plus, cette interaction est modulable par le SDF-1 et le MCP-1 (Percherancier et al., 2005; Sohy et al., 2007), ce qui prouve que chaque ligand est capable de provoquer un changement conformationnel entre le protomère lié et le second protomère de l'hétérodimère. L'utilisation des peptides dérivés des segments TM de CXCR4 est venue confirmer cette idée et la pousser plus loin; les peptides TM II, TMIV et TMVI sont capables d'inhiber en partie le changement conformationnel entre CXCR4 et CCR2 induit par MCP-1. Ceci suggère donc que la liaison du MCP n'implique pas seulement un réarrangement conformationnel de son propre protomère mais qu'il peut influencer la conformation du second protomère, non lié (Percherancier et al., 2005). Cette hypothèse semble de plus en accord avec les travaux de *Sohy et al.* qui décrivent une inhibition allostérique dans cet hétérodimère grâce à un essai de compétition sur la liaison de ligands (Sohy et al., 2007). La liaison de [^{125}I MCP-1] est diminuée par addition de SDF-1 sur des cellules exprimant CCR2 et CXCR4 alors qu'aucun effet n'est observé sur les cellules n'exprimant que CCR2. Également, la liaison de [^{125}I SDF-1] est diminuée en présence de MCP-1 dans les cellules exprimant les deux récepteurs. Cette inhibition croisée est considérée allostérique dans la mesure où l'on assume que la liaison du ligand à un protomère affecte la capacité de liaison de l'autre protomère par un changement de

conformation *en trans*. De manière intéressante, la même étude rapporte que TAK779, agoniste inverse de CCR2 et AMD3100, un antagoniste de CXCR4, peuvent réduire respectivement la liaison du SDF ou du MCP radiomarqués. Ceci signifie donc que le récepteur n'a pas besoin d'atteindre son état actif pour inhiber la liaison dans le second protomère excluant une régulation croisée. Les réponses fonctionnelles testées par les auteurs confirment que l'AMD3100 et TAK779 inhibent les réponses calciques mais aussi la chimiotaxie des lymphocytes T induite par l'activation de CCR2 et CXCR4 respectivement. Ces derniers essais qui ont été menés sur des lymphocytes T CD4+ exprimant constitutivement les deux récepteurs confirment la pertinence biologique de cette interaction.

L'inhibition allostérique croisée qui avait déjà été observée par les auteurs entre CCR2 et CCR5 (El-Asmar et al., 2005) peut être expliquée de deux manières. Le dimère inoccupé est pré couplé à une protéine G mais ne peut l'activer; lors de la liaison du ligand, la conformation du protomère lié change, permettant une interaction de haute affinité avec la protéine G et son activation. La conformation du protomère non lié est alors affectée soit directement par un réarrangement conformationnel passant par son interface de contact, soit indirectement par le repositionnement de la protéine G. Il y aurait donc une asymétrie dans ces hétérodimères qui est conditionnée par la protéine G, comme dans le cas du récepteur BLT1.

Objectifs de la thèse

L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des RCPG est à la base de la compréhension de leur fonctionnement et des thérapies de demain. Durant cette thèse, la régulation du récepteur de chimiokines CXCR4 a été étudiée au niveau de son organisation quaternaire et de l'interaction avec ses effecteurs, principalement les protéines G et les β-arrestines.

Depuis 2003, plusieurs travaux suggèrent que les RCPG pourraient s'assembler en complexes d'ordre supérieurs. Durant l'année 2005, des travaux réalisés au laboratoire démontraient que CXCR4 et CCR2 pouvaient chacun former des homodimères mais aussi des hétérodimères entre eux (Percherancier et al., 2005). L'idée a alors émergé que ces récepteur de chimiokines seraient peut être des dimères de dimères.

Cette thèse débute à la fin de l'année 2006 avec comme premier objectif de générer un outil permettant de mesurer l'interaction directe, dans des cellules vivantes, de plus de deux RCPG, ce qui fut accompli grâce au développement de la complémentation de protéines (PCA) de la *Rénilla* Luciférase II (*R*LucII). Nous voulions ensuite combiner le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) avec un double essai de PCA (donneur et accepteur d'énergie tronqués) pour vérifier l'hypothèse selon laquelle CXCR4 et CCR2 formeraient des dimères de dimères.

Le second objectif a été de déterminer les conséquences des changements conformationnels trans-récepteurs observés entre CXCR4 et CCR2 sur les voies de signalisation. Nous avons alors étudié le rôle de chacun de ces récepteurs dans l'engagement de la protéine Gαi et de la β-arrestine.

Enfin, grâce à des travaux en collaboration avec des équipes américaines, nous avons pu remplir un troisième objectif qui était la description et l'analyse de nouveaux mécanismes de signalisation de CXCR4 avec les protéines G et les β-arrestines.

Article 1

The Quaternary Structure of CXCR4 and CCR2 homo and hetero-oligomers

Résumé

Les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 ont chacun été décris comme pouvant former des homodimères. Dans cette étude, nous utilisons une combinaison de transfert d'énergie de résonance (BRET), de complémentation bimoléculaire de fluorescence et de luminescence (BiFC et BiLC) pour démontrer que ces deux récepteurs forment des homo et hétérotétramères. L'association de deux dimères de nature différente telle que nous l'observons pour CXCR4-CCR2 pourrait alors correspondre à ce que nous considérions auparavant comme des hétérodimères. L'activation de CCR2 par son agoniste, le peptide chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1) entraîne un changement de conformation au sein du dimère de récepteurs CXCR4 que nous qualifions de réarrangement conformationnel trans-récepteur. L'engagement de la protéine Gαi et de la β-arrestine2 par CXCR4 lors de l'activation de CCR2 nous ont confirmé que ces complexes représentaient la forme fonctionnelle des récepteurs. Dans cette même configuration, nous observons une diminution significative de l'engagement de Gαi par le mutant N119K de CXCR4 qui est déficient dans sa capacité à activer la protéine G, signifiant l'importance du récepteur non lié dans l'engagement de la protéine G par l'hétéro-oligomère CXCR4-CCR2.

The Quaternary Structure of CXCR4 and CCR2 homo and hetero-oligomers

[5]Armando S, [*&]Percherancier Y, [1]Heveker N, [3]Pin JP, [3]Prezeau L, [2]Bouvier M.

[2]Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

[1]Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada. The Research Centre/Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5.

[3]Institut de Genomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203, INSERM U661, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France

[&]Current address : CNRS Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système, Bordeaux, France

ABSTRACT

Oligomerization is a general property shared by many membrane proteins including the G protein-coupled receptors (GPCRs). In most cases, evidence suggests that GPCR assemble as dimer early in the biosynthetic path. In some cases, however, larger oligomeric species have been proposed to form. For the chemokine receptor CXCR4 and CCR2, both homo and hetero-dimers have been described. Here using a combination of bimolecular fluorescence complementation (BiFC), bimolecular luminescence complementation (BiLC) and bioluminescence resonance energy transfer assays we show that CXCR4 and CCR2 can assemble as homo and hetero-oligomers forming tetramers. The CXCR4-CCR2 hetero-oligomer is formed by the assembly of CXCR4 and CCR2 homo-dimers suggesting that what was previously described as hetero-dimers may in fact result from the assembly of two distinct homo-dimers. Consistent with such an oligomeric arrangement playing a functionally relevant role, activation of CCR2 with the selective polypeptidic chemokine, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), resulted in trans-dimer conformational rearrangement of the CXCR4 dimer and the engagement of both $G\alpha_{i1}$ and βarrestin-2 by the hetero-tetramer. A mutation in the third transmembrane domain (N119K) of CXCR4 that prevents CXCR4 coupling to Gi inhibited the CCR2-promoted engagement of $G\alpha_i$ by the hetero-oligomer, indicating that trans-regulation of CXCR4 by CCR2 contributes to the engagement of the G protein. Consistent with this notion,

MCP-1 binding to CCR2 was also sufficient to promote a conformational rearrangement detectable between the CCR2 and CXCR4 homo-dimers confirming that hetero-tetramer reached the cell surface and respond to ligand stimulation as a functional complex. Taken together, these new forays into the quaternary structure of the chemokine receptors provide insights into the molecular mechanism underlying the allosteric cooperative regulation observed between CCR2 and CXCR4 in monocytes and memory T-cells.

INTRODUCTION

In recent years biochemical and biophysical studies carried out with purified receptors (Baneres and Parello, 2003)in heterologous expression systems (Angers et al., 2002; Bouvier, 2001)native tissue (Albizu et al., 2010; Fotiadis et al., 2003; Rivero-Muller et al., 2010) unequivocally demonstrate that many if not all G protein-coupled receptors (GPCRs) can form homo- and hetero- oligomers. In most cases, the data obtained could be explained by the formation of dimers without excluding the possibility that higher order oligomers could also form. It was proposed that dimerization occurs early in the biosynthetic pathway, most likely in the endoplasmic reticulum (ER) where it could play a role in the quality control as well as anterograde and retrograde trafficking of the receptors to and from the plasma membrane (Terrillon and Bouvier, 2004). Hetero-dimerization has also proposed to contribute to the pharmacological and signaling diversity of GPCRs. Indeed, it has been shown that hetero-dimerization can result in distinct radioligand binding properties and/or in the activation of distinct signaling pathways (Milligan, 2010; Rios et al., 2001).

In some cases, however, the existence of GPCR tetramers and even higher order oligomers has been suggested (Fotiadis et al., 2004; Fung et al., 2009; Guo et al., 2008; Jastrzebska et al., 2006; Maurel et al., 2008). These studies raise questions about the general quaternary organization of both homo- and heteromers. For the class C GABAb receptor, which is an obligatory hetero-oligomer composed of a receptor subtype that binds GABA (GABAbR1) and a second one (GABAbR2) that can engage the G protein, it has been proposed that tetramers can result from the homo-dimerization of hetero-dimers. For the largest family A of GPCRs, very little is known on the possible arrangement into oligomers of higher order than dimers. In

particular, whether or not functional tetramers can reach the plasma membrane be bound by ligands and engage downstream effectors remains largely unknown.

Among the family A GPCR for which homo and hetero-oligomerization have been well characterized both in reconstituted and in physiological systems are the chemokine receptors CXCR4 and CCR2 (Percherancier et al., 2005; Sohy et al., 2007; Sohy et al., 2009). These receptors that are co-expressed in monocytes, dendritic cells and memory T cells (Viola and Luster, 2008) play central roles in the chemotactic response evoked by chemokines such as the monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) for CCR2 and the stromal-derived factor-1 (SDF1) for the CXCR4. They are involved in normal immune and inflammatory responses (Charo and Ransohoff, 2006) and could contribute to metastasis dispersion in certain cancers (Muller et al., 2001). CXCR4 for its part has also been shown to control the mobilization of hematopoetic cells from the bone marrow (D'Apuzzo et al., 1997) and to act as a co-receptor for HIV entry (Wu et al., 1996)Studies carried out in heterologous expression systems have shown that CCR2 and CXCR4 can form both homo and hetero-oligomers that were interpreted to be dimers. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) studies also revealed that ligand binding to one protomer promoted conformational rearrangements that could be detected at the level of both homo and heter-dimers (Berchiche et al., 2007; Percherancier et al., 2005; Sohy et al., 2007). Such dimerization has been proposed to be responsible for the negative ligand binding cooperativity and cell signaling cross-talk observed for the CXCR4 and CCR2 in T lymphocytes (Rodriguez-Frade et al., 2004; Sohy et al., 2007)

Given the recent suggestions that class A GPCR could form tetramers, the present study aimed at probing the quaternary arrangement of CXCR4 and CCR2. For this purpose, bi-molecular fluorescence and luminescence complementation assays (BiFC; BiLC) were combined to BRET analysis to assess the possible formation of CXCR4 and CCR2 homo and hetero-tetramers. In addition to demonstrate that homo-dimers of CXCR4 can assemble with either a CCR2 homo-dimer or another CXCR4 homo-dimer to form hetero-tetramers, our study shows that selective binding of MCP1 to CCR2 promote conformational rearrangement of the CCR2/CXCR4 hetero-tetramers that lead to the engagement of both Gαi and βarrestin by the hetero-tetramer. This demonstration of the existence of a functional hetero-tetramer provides

new structural insight to explain the cross-talk regulation occurring between these two important chemokine receptors in native tisues.

RESULTS

Conformational rearrangement of a CXCR4 homo-dimer upon CCR2 activation

Both CCR2 and CXCR4 have been shown to form homo and hetero dimers in living cells and several studies have suggested cross-talk regulation between these two subtypes of chemokine receptor. This raises the possibility that CXCR4 and CCR2 may form larger oligomeric complexes. To test the possible functional interaction between a dimer of CXCR4 and CCR2, we assessed the effect of activating CCR2 on the BRET signal between two CXCR4 receptors fused to RLuc and vYFP respectively. As shown in **Figure 1a** and as previously reported (Percherancier et al., 2005), direct stimulation of cells co-expressing CXCR4-RLuc, CXCR4-vYFP with CXCR4 selective ligand stromal derived factor-1 (SDF-1) led to a significant increase in BRET., In cells expressing CCR2 in addition to CXCR4-RLuc and CXCR4-vYFP stimulation with the CCR2-specific ligand, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), also induced an increase in BRET between the two CXCR4 protomers in a dose-dependent manner (**Figure 1b**). The EC50 of MCP-promoted BRET (0.42nM) was similar to the reported Kd of the ligand for CCR2 (Charo et al., 1994; Myers et al., 1995). The selectivity of action of MCP-1 on the CCR2 receptor is further confirmed by the fact that no significant change in BRET was observed following MCP-1 stimulation in cells expressing only the CXCR4-*R*luc/CXCR4-vYFP BRET pair (**Figure 1c**). These results indicate that CCR2 activation affects the CXCR4 complex either by modulating the conformation of the dimer or promoting dimerization. No such effect was observed upon activation of an unrelated GPCR, the D2-dopamine receptor, expressed at similar cell surface expression level (**Supplementary Fig. 1**) further supporting the selectivity of the phenomenon.

Activation of CCR2 promotes conformational rearrangements of a CXCR4-CCR2 hetero-oligomer

Although we cannot rule out that such effect could result from cross-talk regulation as a consequence of CCR2 down-stream signaling, these data are consistent with the possible formation of a complex between CCR2 and a dimer of CXCR4. To directly test this latter hypothesis, we combined protein complementation and BRET in a single assay (Guo et al., 2008; Heroux et al., 2007; Martel et al., 2010). The protein complementation assay (PCA) used is based on the ability of two fragments of *R*Luc to reconstitute a luminescent protein when brought in close proximity (Stefan et al., 2007). The "Split *R*Luc" L1 and L2 fragments (see **Supplementary Fig. 2a**) were fused to two CXCR4 constructs and the ability of co-expressed CXCR4-L1, CXCR4-L2 to generate a luminescent signal and to yield a BRET signal with a CCR2-vYFP were assessed. Co-expression of CXCR4-L1 and CXCR4-L2 led to a robust luminescent signal whereas no luminescence signal was observed when each of the constructs were expressed individually (**Supplementary Fig. 2b**) confirming that the receptor can form homo-dimers. In cells expressing CXCR4-L1, CXCR4-L2 and CCR2-vYFP, a robust basal BRET signal was detected, and stimulation of the cells with MCP-1 led to a significant increase in the BRET signal (**Figure 2a**) indicating that ligand engagement promotes a rearrangement of a ternary complex composed minimally of a dimer of CXCR4 and a monomer of CCR2. The selectivity of this effect was confirmed by the observation that stimulation with quinpirole (**Figure 2b**) of cells co-expressing the D2-dopamine receptor did not promote any modulation of the marginal BRET signal observed between CXCR4-L1/L2 and D2R-vYFP. Interestingly, the absence of signal obtained with the D2R-vYFP rule out the possibility that any Gi coupled receptor could promote the rearrangement observed within the CXCR4 dimer as does the Gi coupled chemokine receptor CCR2.

Stoechiometry of CXCR4 hetero and homo-complexes

The above results suggest the formation of an oligomeric complex between a dimer of CXCR4 and at least a monomer of CCR2 and would be consistent with the possibility that the complex may be formed by the association between homo-dimers of CXCR4 and CCR2. This possibility is further supported by the fact that similarly to CXCR4, CCR2 has been shown to form homo-dimers (El-Asmar et al., 2005; Percherancier et al., 2005). To test the possible formation of an hetero-tetramer composed of CXCR4 and CCR2 homo-dimers, we extended the PCA-BRET assays to include split *R*Luc and the Split vYFP (see V1 and V2 fragments in **Supplementary Fig. 3a**) constructs that allow to monitor the interaction between 4 partners simultaneously (Guo et al., 2008; Rebois et al., 2008). As predicted form the previously reported dimerization of CCR2, co-expression of CCR2-V1 and CCR2-V2 led to the reconstitution of vYFP yielding a robust fluorescent signal whereas the expression of each fragment individually did not (**Supplementary fig 3b**). As shown in **Figure 3a**, co-expressing CXCR4-L1, CXCR4-L2, CCR2-V1, and CCR2-V2, led to a significant BRET signal that was modulated upon activation of CCR2. Indeed, as was the case when considering only the ternary complex CXCR4-L1-CXCR4-L2-CCR-2vYFP, MCP-1 led to a significant increase of the BRET between CXCR4-L1/L2 and CCR2-V1/V2. These results are consistent with the existence of a hetero-oligomeric complex composed of at least two CXCR4 and two CCR2 molecules. In cells co-expressing CXCR4L1/L2 with D2R-V1/V2, quinpirole failed to promote any modulation of the very weak BRET signal detected (**Figure 3b**), confirming the selectivity of the interactions. Yet, a robust fluorescence signal was reconstituted by the co-expression of D2R-V1 and D2R-V2 confirming that these receptors can form at least homo-dimers (Guo et al., 2008) (**Supplementary fig 3b**).

The observation that hetero-oligomers forming at least a tetramer composed of two CCR2 and two CXCR4 raises the question of the stoechiometry of the homo-oligomers described for these chemokine receptors that were previously assumed to be dimers. To assess the formation of higher order homo-oligomers we used 'two split-BRET' assays. Co-expressing CXCR4-L1, CXCR4-L2 with CXCR4-V1 and CXCR4-V2 (**Figure 4a**), yielded a significant BRET signal (See **inset**) that was increased in a dose dependent manner by SDF-1. Once more and as shown

in **Figure 2b and Figure 3b**, no agonist-modulated BRET could be observed between CXCR4-L1/L2 and D2R-V1/V2 (**Figure 4b**). These results therefore indicate that CXCR4 can form homo-oligomers that can include at least 4 receptor molecules.

Engagement of G proteins and βarrestin by a CXCR4/CCR2 hetero-oligomer

To determine if the CXCR4/CCR2 oligomers could engage their cognate G protein, we first assessed the ability of a homo-dimer of CXCR4 to engage $G\alpha_{i1}$ by monitoring the BRET between CXCR4-V1/V2 and $G\alpha_{i1}$-*R*luc in a series of PCA-BRET assays. For this purpose, $G\alpha_{i1}$ constructs harboring Rluc in three different positions of the Gα subunit, that correspond to flexible loops ($G\alpha_{i1}$-*R*luc91, $G\alpha_{i1}$-*R*luc122 and $G\alpha_{i1}$-*R*luc60) (**Figure 5a**) (Gales et al., 2006) have been used. As shown in **Figure 5b**, activation of CXCR4 with SDF-1 led to an increase in BRET between CXCR4-V1/V2 and either $G\alpha_{i1}$-Rluc91 or $G\alpha_{i1}$-Rluc60 and a reduction in BRET between CXCR4-V1/V2 and $G\alpha_{i1}$-Rluc122. These data demonstrate that receptor activation by SDF-1 promotes the engagement of $G\alpha_{i1}$ to a dimer of CXCR4. The difference in the orientation of the BRET changes observed depending of the position of Rluc within the Gα subunit, indicates that the BRET changes corresponds to a conformational reorganization of the CXCR4-$G\alpha_{i1}$ oligomeric complex that leads to distinct changes in distance/orientation between the split vYFP attached to CXCR4 and the *R*luc present in different loops of Gαi1 (Gales et al., 2006).

To determine whether the activation of a hetero-oligomer could also lead to the engagement of a G protein, we assessed the effect of MCP-1 stimulation on the BRET between CXCR4-V1/V2 and $G\alpha_{i1}$-*R*luc91 in cells co-expressing WT CCR2. As shown in **Figure 6a**, activation of the CCR2 receptor promoted a significant BRET increase between the CXCR4 dimer and $G\alpha_{i1}$. No such increase was observed in cells that were not co-transfected with CCR2. The selectivity of the effect was further supported by the fact that quinpirole stimulation of cells expressing the D2R to levels comparable to CCR2 (**Supplementary Fig.4a**) did not promote any change in the BRET between the CXCR4 dimer and $G\alpha_{i1}$ (**Figure 6b**).

To determine if the MCP-1 promoted increase in BRET between the CXCR4 and $G\alpha_{i1}$ resulted from an engagement of the G protein to the CXCR4 itself or to the CCR2 within the hetero-oligomer, we took advantage of a mutant form of the CXCR4 which is largely uncoupled from $G\alpha_i$. CXCR4-N119K has been previously shown to be compromised in its ability to promote GTPγS binding despite a normal cell surface expression (Berchiche et al., 2007) The compromised coupling of CXCR4-N119K to $G\alpha_i$ was confirmed by the inability of SDF-1 to promote a BRET increase between the receptor and $G\alpha_{i1}$, in contrast with the robust SDF-1-promoted BRET observed between the WT CXCR4 and $G\alpha_{i1}$ (**Figure 7a**). When this $G\alpha_i$-coupling compromised CXCR4-N119K-vYFP was co-expressed with Myc-CCR2 and $G\alpha_{i1}$-Rluc91, the MCP1-promoted BRET between CXCR4-N119K and $G\alpha_{i1}$ was greatly reduced (and did not reach statistical significance) in comparison with what is observed with the WT-CXCR4-YFP (Figure 7b). These data indicate that the engagement of $G\alpha_{i1}$ to the hetero-oligomer upon CCR2 activation involves a coupling between CXCR4 and the G protein.

To further characterize the ability of the homo and hetero-oligomers to interact with downstream effectors, we also assessed the recruitment of βarrestin-2 to homo and hetero-oligomers of CXCR4 and CCR2. As shown in **Figure 8**, SDF-1 and MCP-1 stimulation promoted a time dependent increase in BRET between *R*luc-βarrestin-2 and either CXCR4-V1/V2 (**Figure 8a**) or CCR2-V1/V2 (**Figure 8b**) indicating that βarrestin-2 could be recruited to a homo-dimers of both CXCR4 and CCR2. Upon co-expression of CCR2, activation by MCP-1 also led to a BRET increase between the CXCR4 dimer and βarrestin-2 (Figure 9a).

No effect of MCP-1 was observed in cells co-expressing CXCR4-V1/V2 and βarrestin2-*R*luc in the absence of CCR2 (Figure 9b). In cells co-expressing the D2R to the same level (Supplementary Fig.4b), quinpirole stimulation, which promotes βarrestin-2 recruitment to the D2R (Masri et al., 2008) did not promote any BRET between CXCR4 and βarrestin-2, confirming the selectivity of CCR2 to promote the engagement of βarrestin-2 by CXCR4 (figure 9b). These data indicate that as is the case for the G protein, βarrestin can be engaged by a CCR2-CXCR4 hetero-oligomer in response to the activation of a single receptor subtype.

To determine the effect of the G protein uncoupling mutation on the ability of the hetero-oligomer to recruit βarrestin-2, the effect of SDF-1 and MCP-1 was assessed in cells co-expressing CCR2, *R*luc-βarrestin-2 and either CXCR4-vYFP or CXCR4-N119K-vYFP. As shown in **Figure 10a**, stimulation with SDF-1 promoted a significant time dependant BRET increase between CXCR4-vYFP and *R*lucII-βarrestin-2 but failed to promote any BRET between *R*lucII-βarrestin and CXCR4-N119K-vYFP, indicating that the mutation also dramatically affected the ability of CXCR4 to directly recruit βarrestin. Also, MCP-1 was found to promote a time dependant engagement of *R*LucII-βarrestin to CXCR4-vYFP, confirming the recruitment of βarrestin-2 to a CXCR4-CCR2 hetero-dimer in response to the activation of a single protomer. Interestingly, the MCP1-promoted BRET between *R*lucII-βarrestin and CXCR4-N119K-vYFP was found to be potentiated by the mutation. These data indicate that the N119K mutation within CXCR4 differentially affect the ability of each receptor subtype to promote the recruitment of βarrestin to the hetero-oligomer.

DISCUSSION

In the present paper we demonstrated that homo- and hetero-oligomeric assemblies of CXCR4 and CCR2 receptors including up to 4 receptor molecules can engage both G proteins and βarrestin upon agonist stimulation indicating that they represent functional forms of the receptor. The hetero-oligomer was found to be formed by at least 2 CXCR4 and 2 CCR2 molecules suggesting that the quaternary structure may result from the assembly of two homo-dimers. The existence of dimers of both CXCR4 and CCR2 has previously be reported both in heterologous expression systems (Babcock et al., 2003; Berchiche et al., 2007; Issafras et al., 2002; Percherancier et al., 2005)as well as memory T cells (Sohy et al., 2007) and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Rodriguez-Frade et al., 2004) where the two receptors are endogenously expressed. Such oligomeric assembly has been proposed as the basis of negative binding cooperativity between the receptor subtypes (El-Asmar et al., 2005). The negative binding cooperativity has been shown to have functional consequences since binding of an antagonist to one of the receptor subtypes blocks the signalling activity of the other subtype (Sohy et al., 2007). At the patho-physiological level, the hetero-oligomerization has been proposed as an explanation for the observation that inactivating CCR2 antibodies that do not

have intrinsic signalling activity, block the CXCR4-mediated infection by a T-tropic X4 HIV-1 strain (Rodriguez-Frade et al., 2004). Our observation that selective binding of MCP to the CCR2 promotes a conformational change within the CXCR4 dimer provides molecular and structural bases underlying an allosteric trans-receptor regulatory mechanism. The fact that the trans-receptor conformational rearrangement can occur between two dimers and not necessarily within a simple hetero-dimer provides a new structural basis to interpret the functional cross-talk occurring between the two receptor subtypes. Interestingly, the conformational change is not only transmitted to the dimer but also to the Gαi engaged by the empty receptor dimer supporting the notion that trans-dimer allosteric regulation can have signalling repercussions.

Although oligomer of higher order than dimers have also been suggested for other GPCRs including the D2 dopamine (Guo et al., 2008), metabotropic GABA (Maurel et al., 2008), M2-muscarinic (Park et al., 2002), β2-adrenergic, (Fung et al., 2009) and rhodospsin (Fotiadis et al., 2003), our data provide the first direct evidence documenting conformational changes occurring within a tetramer upon ligand binding. The ligand-promoted change in BRET observed between the Rluc and vYFP that were reconstituted by the homodimerization of CXCR4 and CCR2 respectively could result either from a conformational rearrangement resulting directly from the binding of the ligand or as a downstream consequence of the recruitment of signalling partners or accessory proteins. Although it is difficult to distinguish between these two possibilities, the fact that the ligand-promoted BRET changes could also be seen in washed membrane preparations in which the CXCR4 and CCR2 cognate G protein, Gi, was inactivated by pertusis toxin treatment (data not shown) favours the former. In either case, our data clearly indicate the functional engagement of minimally a hetero-tetramer upon activation of only one of the receptor subtype present in the complex.

These data raise the question of the quaternary arrangement of the GPCR hetero-oligomers. Hetero-dimers are generally seen as the assembly of two distinct GPCR monomers. However, our data raise the possibility that hetero-oligomers may represent the assembly between two homo-dimers. Given that several studies indicate that dimers are required for ER exit and may be involved in hydrophobic mismatch ER quality control, the data suggest that the homo-dimers may represent the simplest building block of GPCR and that hetero-oligomers

result from the assembly of distinct homo-dimers. This has obvious implications on the structural arrangements of the oligomers. The formation of hetero-oligomers from homo-dimers would imply that distinct interfaces are used for homo-dimerization and hetero-oligomerization. For the D2R, distinct symmetrical interface involving TMV-TMV and TM1-TMI contacts have been proposed as the basis for a higher order oligomer (Guo et al. 2008). The recent resolution of the 3D structure of CXCR4 revealed that the receptor can form homo-dimers. The five structures obtained in the presence of two distinct ligands presented very similar interface involving trans-membrane domains V and VI (Wu et al., 2010). Further work will be needed to determine the interfaces involved in a hetero-tetramer.

The MCP1-promoted increase in BRET between the CXCR4 and CCR2 dimers could represent either a conformational rearrangement within a pre-existing hetero-tetramer or an increase in the number of hetero-tetramers formed. Current technologies do not allow differentiating between these possibilities and a possible dynamic regulation between dimers and tetramers cannot be excluded. The fact that homo-tetramer of CXCR4 could also be observed and that stimulation with SDF1 also lead to a dose-dependent increase in BRET similar to the one observed for the CXCR4-CCR2 hetero-tetramer may indicate that the increases observed do not results from a dynamic equilibrium between dimers and tetramers but rather from conformational changes. On the other hand, the existence of a dynamically regulated equilibrium between homo-dimers and hetero-tetramers could explain why the extent of negative cooperativity observed between CXCR4 and CCR2 did not perfectly fit with a hetero-dimeric model (Sohy et al., 2007). It should also be noted that our data indicate that at least tetramers can form but does not exclude the possibility that higher order structure complexes may form. Based on the atomic force microscopy images obtained for rhodopsin in retinal membranes (Fotiadis et al., 2003), it has been proposed that GPCRs could form rows of dimers organized in a daisy chain type structure (Guo et al., 2008; Liang et al., 2003; Lopez-Gimenez et al., 2007).

In any case, the functional relevance of a hetero-tetrameric complex between CXCR4 and CCR2 is supported by the observation that activation of CCR2 by MCP1 promoted BRET between the CXCR4 dimer and Gαi1. Interestingly this CCR2-promoted engagement of Gαi1

required a functional CXCR4 since the N119K mutation, which prevents CXCR4 coupling to Gi, inhibited the MCP1-stimulated BRET between CXCR4 and Gαi1. It follows that the MCP1-promoted BRET increase did not result simply from the engagement of Gαi1 to CCR2 without the involvement of CXCR4 (only bringing Gαi1 in close proximity of CXCR4) but also involved the trans-activation of CXCR4. No agonist-promoted BRET between the CXCR4 dimer and Gαi was promoted by the activation of another Gi-coupled receptor, the D2R, further supporting the specificity of the effect observed. The occurrence of cross-dimer regulation upon CCR2 activation is supported by the observation that MCP1 also promoted a BRET increase between two CXCR4 molecules in the complex consistent with the notion that the conformational changes imposed to CCR2 upon MCP1 binding were transmitted to the CXCR4 dimer.

GPCR trans-regulation within homo-dimer, whereby binding to one protomer induces conformational changes to both monomers, has been previously proposed for the BLT1R (Damian et al., 2006)and D2R (Han et al., 2009). Similarly, trans-receptor conformational changes were reported for the μ-opioid receptor/α2adrenergic receptor hetero-dimer upon activation of the μ-opioid receptor (Vilardaga et al., 2008). However, to our knowledge our study is the first to document trans-regulation of GPCR within a tetramer. In the case of the BLT1R homodimer, it has been proposed that activation of the agonist-bound protomer is sufficient to activate the G protein (Damian et al., 2008). In contrast, for the D2R, it has been suggested that activation of the G protein can occur through the trans-activated ligand-free protomer (Han et al., 2009). In the present study, we cannot determine whether one, two or more hetero-trimeric G proteins are recruited to the CXC4-CCR2 hetero-tetramer. As such, we cannot determine if the activation of the ligand-bound CCR2 dimer can functionally engage Gi on its own in the tetramer. However, our data clearly indicate that the coupling integrity the unliganded CXCR4 dimer is required for the optimal engagement of Gαi1 by the complex upon CCR2 activation since the N119K mutation inhibited the MCP1-promoted BRET between CXCR4 and $G\alpha_{i1}$ clearly supporting some form of trans-activation of the unliganded protomers. This is in sharp contrast with what was observed for the recruitment of βarrestin. The N119K mutation in CXCR4 also prevented the recruitment of βarrestin to CXCR4 in response to SDF1, consistent with the notion that the G proteins and βarrestins may share similar binding sites on the receptor intracellular surface (Gurevich and Gurevich, 2006). However, the same mutation did not inhibit

the CCR2-promoted BRET between βarrestin-2 and CXCR4 clearly indicating distinct mode of engagement for Gαi1 and βarrestin-2 to the CCR2-CXCR4 hetero-oligomer.

The present incursion in the quaternary structure of GPCR was made possible by the use of BiLC and BiFC in combination with BRET. Despite the power of these assays to monitor both constitutive and dynamically regulated multi-protein interactions, one limitation imposed by the technique, is the fact that once associated, the two fragments of vYFP cannot readily dissociate. It is therefore important to consider that no dynamic regulation of the dimers reconstituting vYFP can be monitored. Since both CXCR4 and CCR2 were previously shown to form constitutive dimers, this is of little consequence for our study. In addition, in contrast, to the vYFP fragments, the association of the Rluc fragments used in the present study is easily reversible and the Rluc complementation can be dynamically regulated (Stefan et al., 2007). It follows that any competition between CXCR4R-L1 and CCR2-V1/V2 or CXCR4-V1/V2 to associate with CXCR4-L2 would have resulted in a loss of BRET. Therefore, the detection of both constitutive and agonist-promoted BRET between CXCR4-L1/L2 and CCR2-V1/V2 or CXCR4-V1/V2 clearly demonstrates the formation of true tetrameric complexes that were not forced by the complementation assays.

In conclusion, our study clearly demonstrates that CXCR4 and CCR2 can form both homo and hetero-oligomers composed of at least 4 protomers. Such tetramers composed of either 4 molecules of CXCR4 or 2 molecules of CCR2 and 2 molecules of CXCR4 can reach the plasma membrane where their cognate ligands can promote conformational rearrangement of the oligomeric complex. Both Gαi1 and βarrestin 2 can be engaged by the CXCR4-CCR2 hetero-oligomeric complex in response to the activation of only one of the two receptor subtypes confirming the functionality of the complex. Such quaternary arrangement, offers novel structural basis to explain the cooperative allosteric regulation observed for CXCR4 and CCR2 in monocytes and memory T cells where they are naturally co-expressed.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

All fusion proteins in this study were subcloned in the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). CXCR4-L1 was PCR amplified and inserted into NotI-ClaI sites of the PKA-F(1) described in (Stefan et al., 2007). RlucII was derived from *Renillia* luciferase where two punctual mutations (C124A and M185V) were introduced by side change PCR. The last 606 nucleic acids of RlucII construct were PCR amplified and inserted into ClaI-XbaI sites of the CXCR4-L1 construct described above to generate CXCR4-L2. D2s-V1 and D2s-V2 were a generous gift from Dr. Javitch and have been described in (Guo et al., 2008). To generate CXCR4-V1, CCR2-V1, CXCR4-V2 and CCR2-V2, cDNA of CXCR4 and CCR2 were PCR amplified and subcloned into the HindIII restriction sites ofD2s-V1 and D2s-V2, respectively. . To generate the Myc-tagged receptors, CCR2 and D2s were PCR amplified with a 5' oligonucleotide containing the Myc sequence *gagcagaagctgatcagcgaagaggacctg* and subcloned into the HindIII-XbaI restriction sites of the pcDNA3.1 vector. CXCR4-Rluc and CXCR4-YFP are described in (Percherancier et al., 2005). CXCR4-YFP-N119K is described in (Berchiche et al., 2007). Gαi91-RLuc, Gαi122-RLuc and Gαi60-RLuc are described in (Gales et al., 2006). To generate CCR2–vYFP and D2s-vYFP, the vYFP encoding sequence was PCR amplified and inserted into XhoI-XbaI restriction sites from CCR2-V1 and D2s-V1 described above. The BRET-cAMP biosensor, GFP10-EPAC-Rluc2, was previously published (Leduc et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 331:297–307)

Cells culture and transfection

HEK293s cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (Wisent, Qc, Canada) and incubated at 37°C in 5% CO_2. 24 h before transfection, cells were seeded at a density of 500,000 cells per well in 6-well dishes. 48 h before experiment, cells were transfected using polyethylenimine 25 kD linear (PEI;Polysciences, Warrington, PA, USA) at 3:1 PEI/DNA ratio. Each of the expression vectors was diluted in

150 mM NaCl and the total quantity of DNA was completed at 3ug with Salmon Sperm DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Except for the G protein experiments, after overnight incubation, transfection medium was replaced with fresh DMEM for 4 h to allow cell recovery. Transfected cells were then detached and seeded in 96-well white plates (Cultur-plate, PerkinElmer) pre-treated with polyornitine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and left in culture for an additional 24 h before being processed for BRET assay.

BRET measurements

Except for the G proteins experiments, transfected cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) directly in the 96-well culture plates, and kept in 100µl of PBS. For the G protein experiments, cells were washed twice, detached, and resuspended in PBS. 100,000 cells per well were distributed in 96-well microplate (Optiplate, PerkinElmer). The expression level of the energy acceptor (vYFP or split-vYFP) tagged proteins were measured as total fluorescence using a FlexStationII microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with an excitation filter at 480 nm and an emission filter at 530 nm. The expression level of the energy donor (*R*luc) tagged protein was measured 10 min after addition of 5 µM coelenterazine h (NanoLight Technology) using a Mithras LB940 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and BRET readings were then collected with a sequential integration of the donor emission at 485±20 nm and acceptor emission at 530±20 nm. BRET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter divided by the emission detected using the energy donor filter. Finally, the specific BRET signal was obtained by substracting the BRET signal obtained with Rluc alone.

Surface ELISA

Cells were transfected directly in black, clear bottom 96-well microplates (Cultur-plate, PerkinElmer) pre-treated with polyornitine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) in parallel of the transfection done for the BRET experiments. The day of the experiment, cells were fixed 5 minutes with 3% Paraformaldehyde (PFA), then mouse anti-Myc 9E10 primary antibody was added for 30 minutes. Horseradish (HRP)-conjugated sheep IgG anti-

mouse Ab (GE Healthcare) was added for 30 minutes and total luminescence measured with a Mithras LB 940 microplate reader 6 minutes after the addition of the HRP Substrate superSignal West Femto (Thermo-scientific).

EPAC assay

To follow cellular cAMP level, $BRET_2$ -EPAC biosensor was used. Cells were transfected with 500ng-1μg of receptor and 50ng of EPAC biosensor directly in 96-well microplates (Cultur-plate, PerkinElmer) pre-treated with polyornitine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The day of the experiment, transfected cells were washed twice directly in the 96-well culture plates, with PBS and kept in PBS. CCR2 and CXCR4 ligands, MCP-1 (200nM) or SDF-1 (200nM) were added 5 minutes before 20 μM Forskolin (List Biological Laboratories Inc.). 10 minutes after, coelenterazine 400A (Biotium, Hayward, CA, USA) was added and readings started 2 min after. BRET ratio were measurement with a Mithras LB 940 microplate reader.

Statistical analysis

Statistical significances of the differences between two conditions were assessed by student t-test and differences between multiple conditions (>3) by one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Asterisks indicates significant difference *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05. All the tests have been carried out with the Prism™ 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Acknowlegement:

We are grateful to Dr. Javitch for the generous gift of the split v-YFP. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research to M.B. S.A. received a studentship from le ministère de la recherche et du travail (MRT) M.B. holds a chair in Signal transduction and Molecular Pharmacology.

References

Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., *et al.* (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. Nat Chem Biol *6*, 587-594.

Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. Annu Rev Pharmacol Toxicol *42*, 409-435.

Babcock, G.J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003). Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. J Biol Chem *278*, 3378-3385.

Baneres, J.L., and Parello, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. J Mol Biol *329*, 815-829.

Berchiche, Y.A., Chow, K.Y., Lagane, B., Leduc, M., Percherancier, Y., Fujii, N., Tamamura, H., Bachelerie, F., and Heveker, N. (2007). Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. J Biol Chem *282*, 5111-5115.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. Nat Rev Neurosci *2*, 274-286.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., and Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 2752-2756.

Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med *354*, 610-621.

D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J.A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. Eur J Immunol *27*, 1788-1793.

Damian, M., Martin, A., Mesnier, D., Pin, J.P., and Baneres, J.L. (2006). Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. EMBO J *25*, 5693-5702.

Damian, M., Mary, S., Martin, A., Pin, J.P., and Baneres, J.L. (2008). G protein activation by the leukotriene B4 receptor dimer. Evidence for an absence of trans-activation. J Biol Chem *283*, 21084-21092.

El-Asmar, L., Springael, J.Y., Ballet, S., Andrieu, E.U., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. Mol Pharmacol *67*, 460-469.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. Nature *421*, 127-128.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. FEBS Lett *564*, 281-288.

Fung, J.J., Deupi, X., Pardo, L., Yao, X.J., Velez-Ruiz, G.A., Devree, B.T., Sunahara, R.K., and Kobilka, B.K. (2009). Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. EMBO J *28*, 3315-3328.

Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. Nat Struct Mol Biol *13*, 778-786.

Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. EMBO J *27*, 2293-2304.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther *110*, 465-502.

Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. Nat Chem Biol *5*, 688-695.

Heroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., and Bouvier, M. (2007). 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 *282*, 31610-31620.

Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. J Biol Chem *277*, 34666-34673.

Jastrzebska, B., Fotiadis, D., Jang, G.F., Stenkamp, R.E., Engel, A., and Palczewski, K. (2006). Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. J Biol Chem *281*, 11917-11922.

Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., and Engel, A. (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. J Biol Chem *278*, 21655-21662.

Lopez-Gimenez, J.F., Canals, M., Pediani, J.D., and Milligan, G. (2007). The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. Mol Pharmacol *71*, 1015-1029.

Martel, C., Dugre-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trepanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., and Desgroseillers, L. (2010). Multimerization of Staufen1 in live cells. RNA *16*, 585-597.

Masri, B., Salahpour, A., Didriksen, M., Ghisi, V., Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2008). Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 13656-13661.

Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.L., Bourrier, E., Ayoub, M.A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prezeau, L.*, et al.* (2008). Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. Nat Methods *5*, 561-567.

Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. Curr Opin Pharmacol *10*, 23-29.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N.*, et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature *410*, 50-56.

Myers, S.J., Wong, L.M., and Charo, I.F. (1995). Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. J Biol Chem *270*, 5786-5792.

Park, P.S., Sum, C.S., Pawagi, A.B., and Wells, J.W. (2002). Cooperativity and oligomeric status of cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemistry *41*, 5588-5604.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. J Biol Chem *280*, 9895-9903.

Rebois, R.V., Robitaille, M., Petrin, D., Zylbergold, P., Trieu, P., and Hebert, T.E. (2008). Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. Methods *45*, 214-218.

Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. Pharmacol Ther *92*, 71-87.

Rivero-Muller, A., Chou, Y.Y., Ji, I., Lajic, S., Hanyaloglu, A.C., Jonas, K., Rahman, N., Ji, T.H., and Huhtaniemi, I. (2010). Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 2319-2324.

Rodriguez-Frade, J.M., del Real, G., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Soriano, S.F., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Lucas, P., Prieto, I., Martinez, A.C.*, et al.* (2004). Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. EMBO J *23*, 66-76.

Sohy, D., Parmentier, M., and Springael, J.Y. (2007). Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. J Biol Chem *282*, 30062-30069.

Sohy, D., Yano, H., de Nadai, P., Urizar, E., Guillabert, A., Javitch, J.A., Parmentier, M., and Springael, J.Y. (2009). Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists. J Biol Chem *284*, 31270-31279.

Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C.R., Nyfeler, B., Bouvier, M., and Michnick, S.W. (2007). Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 16916-16921.

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

Vilardaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z., and Lohse, M.J. (2008). Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. Nat Chem Biol *4*, 126-131.

Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. Annu Rev Pharmacol Toxicol *48*, 171-197.

Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C.*, et al.* (2010). Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. Science.

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W.*, et al.* (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. Nature *384*, 179-183.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Cis and trans-conformationnal rearrangement of a dimer of CXCR4 dimers assessed by BRET. HEK293 cells were transfected with CXCR4-*R*luc and CXCR4-vYFP in the absence (control) or presence of Myc-CCR2 or Myc-dopamine D2 receptor (Myc-D2), as indicated. (**a**) Cells were stimulated with increased concentration of SDF-1 (**a**) or MCP-1 (**b**), and BRET measured following the addition of coelenterazine-h dose dependently increases the BRET signal in HEK-293-T cells transfected with CXCR4-Rluc and CXCR4-vYFP (Ec_{50} = 17 nM) The result Shown shown in (a) is representative the result of one reprensentative experiment done in triplicate (EC_{50} = 17 nM). (**b**) MCP-1 promotes a dose dependent conformational change between CXCR4-*R*luc and CXCR4-vYFP in cells cotransfected with Myc-CCR2. Results in (b) are the average +/- SEM of five independant independent experiments done in triplicate. (Ec50EC_{50} = 0,42 nmnM) (**c**) Cells were stimulated with that are not transfected with Myc- CCR2 or transfected with the unrelated Myc-dopamine D2 receptor showed no significant increase in the BRET signal between CXCR4-*R*luc and CXCR4-vYFP upon MCP-1 (1μM) or quinpirole (1μM, negative control) stimulation respectively compared to . Results shown are the maximal increase in BRET signal elicited at the dose indicated over vehicule value, and are the mean +/- SEM of three independant experiment done in triplicate. Statistical analysis were was carried out by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test . Asterisks indicates significant difference between the CXCR4-RLuc / CXCR4-vYFP / Myc-CCR2 MCP-1 treated condition and controlthe two others . ***p<0,001

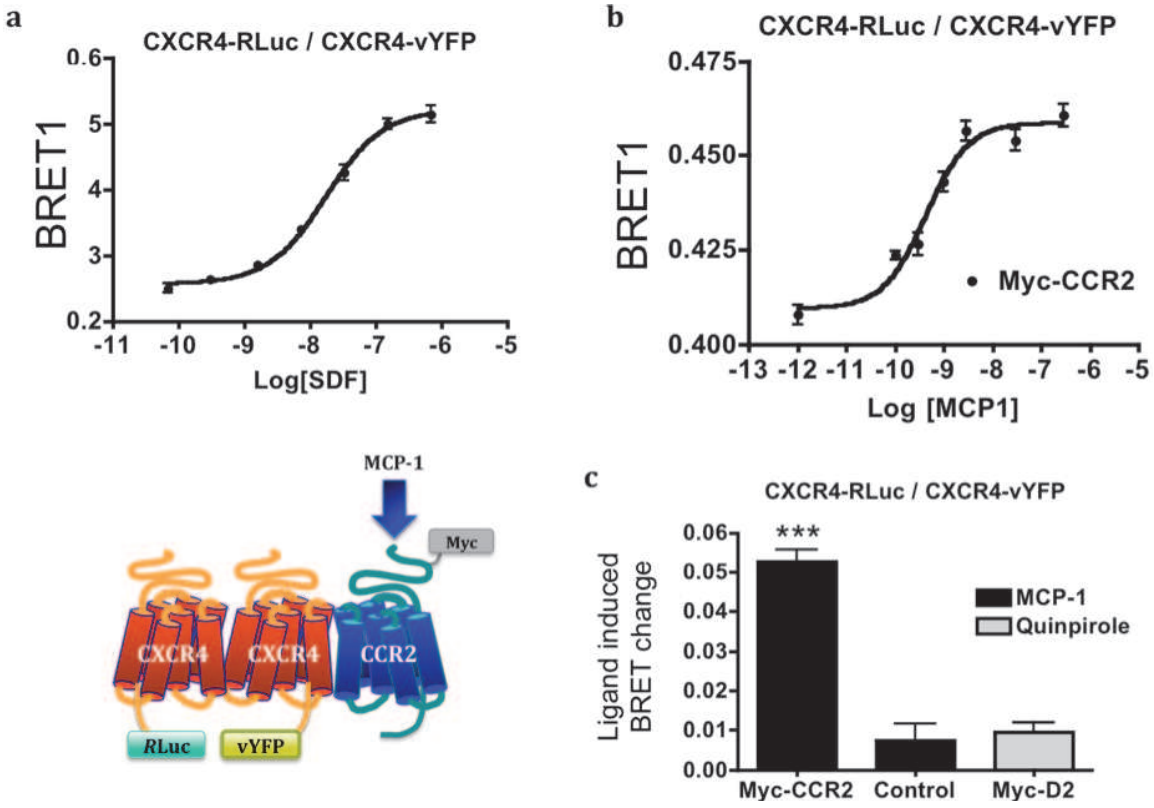

a
CXCR4-RLuc / CXCR4-vYFP
BRET1
0.6
5
4
3
0.2
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
Log[SDF]
b
CXCR4-RLuc / CXCR4-vYFP
BRET1
0.475
0.450
0.425
0.400
Myc-CCR2
-13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
Log [MCP1]
MCP-1
Myc
CXCR4
CXCR4
CCR2
RLuc
vYFP
c
CXCR4-RLuc / CXCR4-vYFP
Ligand induced BRET change
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
***
MCP-1
Quinpirole
Myc-CCR2
Control
Myc-D2

Figure 2: **Direct trans conformational change between CCR2 and a dimer of CXCR4 assessed by BRET-BiLC.** HEK293 cells were transfected with CXCR4-L1 and CXCR4-L2 along with either CCR2v-YFP (a) or D2-vYFP (b). Cells were stimulated with the vehicle (Veh), 1μM MCP-1 or 10μM quinpirole, as indicated, and BRET measured. (a) A strong basal BRET signal detected in cells transfected with CXCR4-L1/L2 and CCR2v-YFP was further increased significantly upon MCP-1 (1μM) stimulation. (b) Cells transfected with CXCR4-L1, CXCR4-L2 and D2 v-YFP displayed a weaker signal that was not increased by quinpirole (10μM) treatment. Statistical analysis were carried out with Student t test . Asterisks indicates significant difference between treated and untreated conditions.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05.

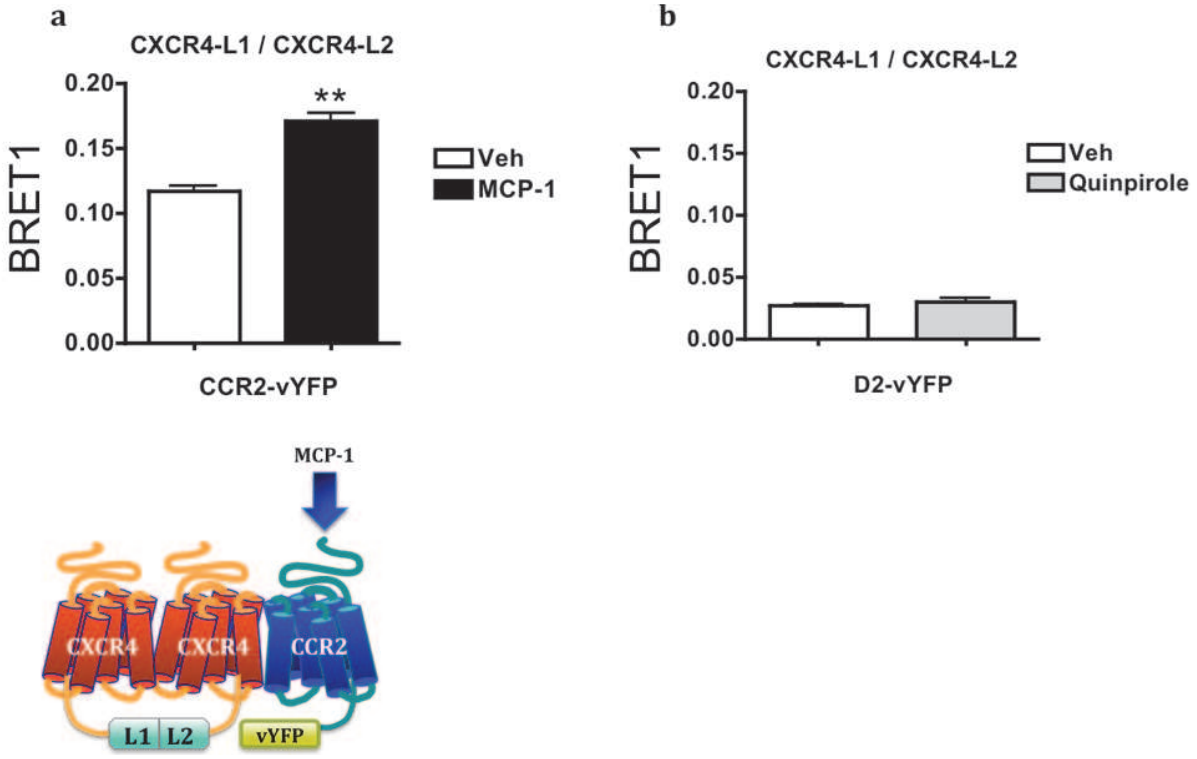

a
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
BRET1
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
Veh
MCP-1
CCR2-vYFP
b
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
BRET1
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Veh
Quinpirole
D2-vYFP
MCP-1
CXCR4
CXCR4
CCR2
L1
L2
vYFP

Figure 3: **Direct trans conformational change between a dimer of CCR2 and a dimer of CXCR4 assessed by BRET-BiLC-BiFC**. HEK293 cells were transfected with CXCR4-L1/CXCR4-L2 pair and either the CCR2-V1/CCR2-V2 pair (a) or the D2-V1/D2-V2 pair (b, negative control). Cells were stimulated or not (Veh) with 1μM MCP-1 (a) or 10μM quinpirole (b) and BRET measured. The basal BRET signal detected between CXCR4-L1/L2 and CCR2-V1/V2 was further increased by MCP-1 treatment (1μM). (b) Cotransfection CXCR4-L1/L2 along with the control receptor D2-V1/V2 displayed a weaker signal that was not further increased by quinpirole (10μM). Statistical analysis were was carried out with Student t test . Asterisks indicates significant difference between treated and untreated conditions. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05.

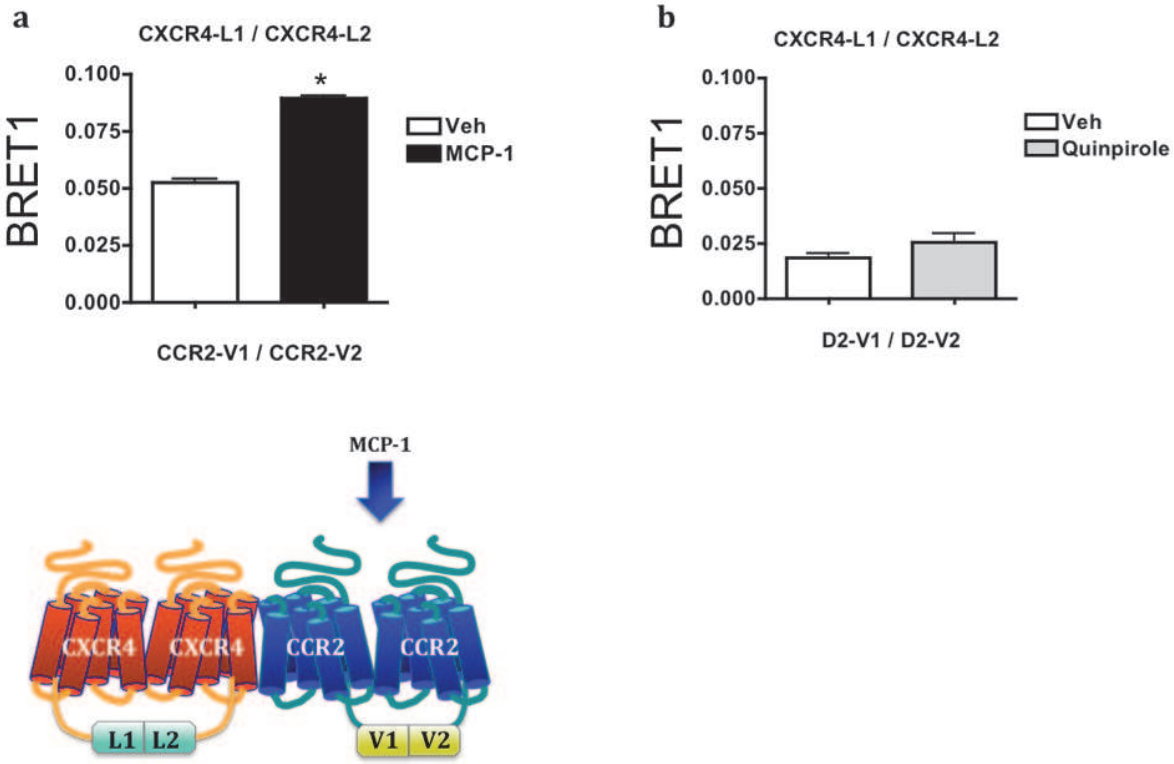

a
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
BRET1
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
*
Veh
MCP-1
CCR2-V1 / CCR2-V2
b
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
BRET1
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
Veh
Quinpirole
D2-V1 / D2-V2
MCP-1
CXCR4
CXCR4
CCR2
CCR2
L1
L2
V1
V2

Figure 4: **Conformationnal rearrangement between 4 protomers of CXCR4 assessed by BRET-BiLC-BiFC.** HEK293 cells were transfected with CXCR4-L1/CXCR4-L2 pair and either the CXCR4-V1/CXCR4-V2 pair or the D2-V1/D2-V2 pair, as indicated. (**a**) Cells were stimulated with increased concentration of SDF-1 dose dependently increases the BRET signal in cells transfected with CXCR4-L1/L2 and CXCR4-V1/V2 and ligand induced BRET measured (ECc_{50} = 3,8 nM). Shown are tThe datas shown are the mean +/- SEM of six experiments done in triplicate and represented over the unstimulated values. Inset shows the absolute values of the basal energy transfer detected at 530nm in the presence of CXCR4-L1/CXCR-L2/CXCR4-V1/CXCR-V2 compared to CXCR4-L1/CXCR4-L2 alone. (b) Cells were stimulated with either 1μM SDF-1 or 10μM quinpirole and the ligand indiced BRET measured. No significant increase in BRET signal was detected in cells coexpressing CXCR4-L1/L2 and D2-V1/V2 upon SDF-1 (1μM) treatment nor quinpirole (10μM) compared to CXCR4-L1/L2 and CXCR4-V1/V2 stimulated by SDF-1(1μM). Statistical analysis were was carried out by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test . Asterisks indicates significant difference between CXCR4-L1/CXCR-L2/, CXCR4-V1/CXCR-V2 upon SDF-1 stimulation and the two control conditions. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05.

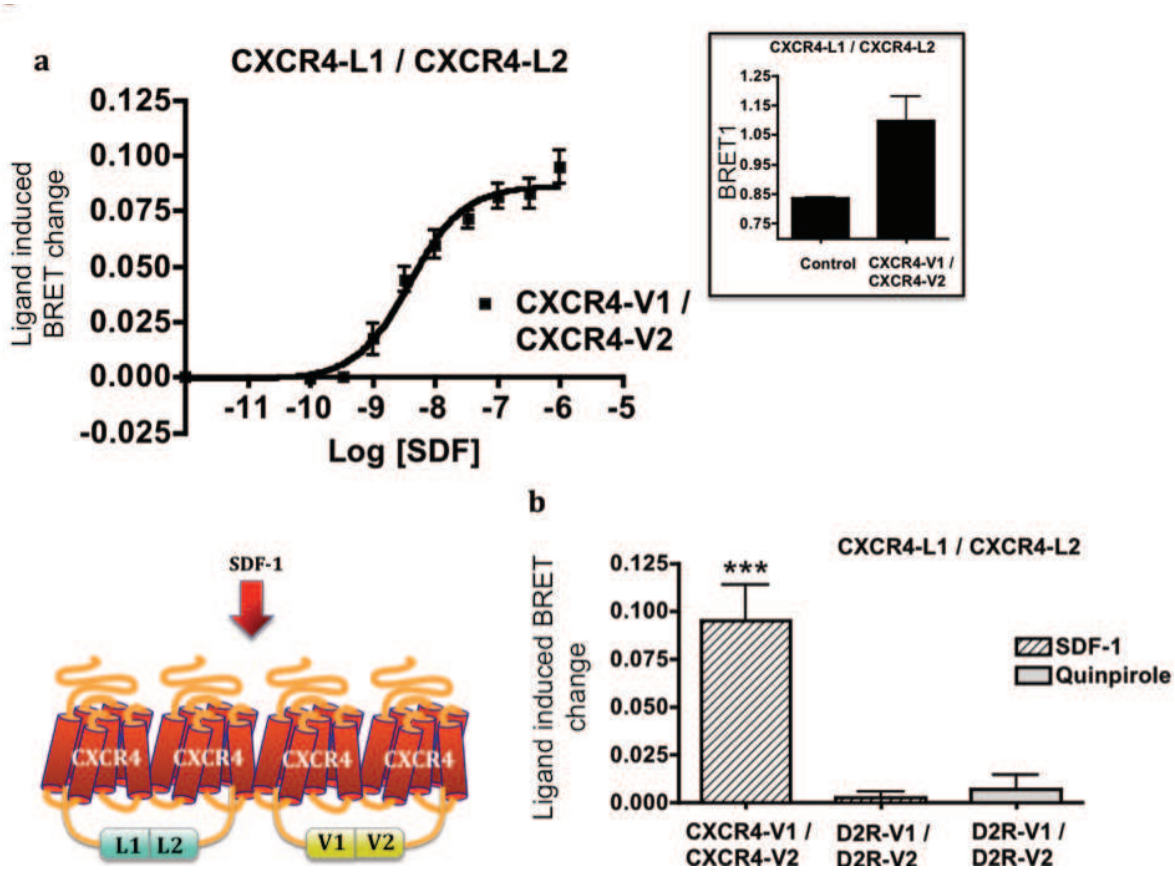

a
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
Ligand induced BRET change
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
-0.025
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
Log [SDF]
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
BRET1
1.25
1.15
1.05
0.95
0.85
0.75
Control
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
b
SDF-1
CXCR4
CXCR4
CXCR4
CXCR4
L1
L2
V1
V2
CXCR4-L1 / CXCR4-L2
Ligand induced BRET change
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
***
SDF-1
Quinpirole
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
D2R-V1 / D2R-V2
D2R-V1 / D2R-V2

Figure 5: **SDF-1 induced engagement of $G\alpha_{i1}$ by CXCR4 dimer.** (a) Tri-dimensional representation of $G\alpha_{i1}$ structure (pdb 1C1P) depicting the three positions of *R*Luc insertion: Glycine (G) 60, Leucine (L) 91, and Glutamate (E) 122. (b) Cells were transfected with CXCR4-V1/CXCR4-V2 pair with either $G\alpha_{i1}$-60-*R*Luc, $G\alpha_{i1}$-91-*R*Luc or $G\alpha_{i1}$-122-*R*Luc. Cells were stimulated or not (Veh) SDF-1 (200nM) and promoted BRET measuredincrease between CXCR4-V1/V2 and $G\alpha_{i160}$-*R*Luc or $G\alpha_{i191}$-*R*Luc and a decrease in BRET between CXCR4-V1/V2 and $G\alpha_{i1122}$-*R*Luc. Statistical analysis were carried out with Student t test . Asterisks indicates significant difference between treated and untreated conditions *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05

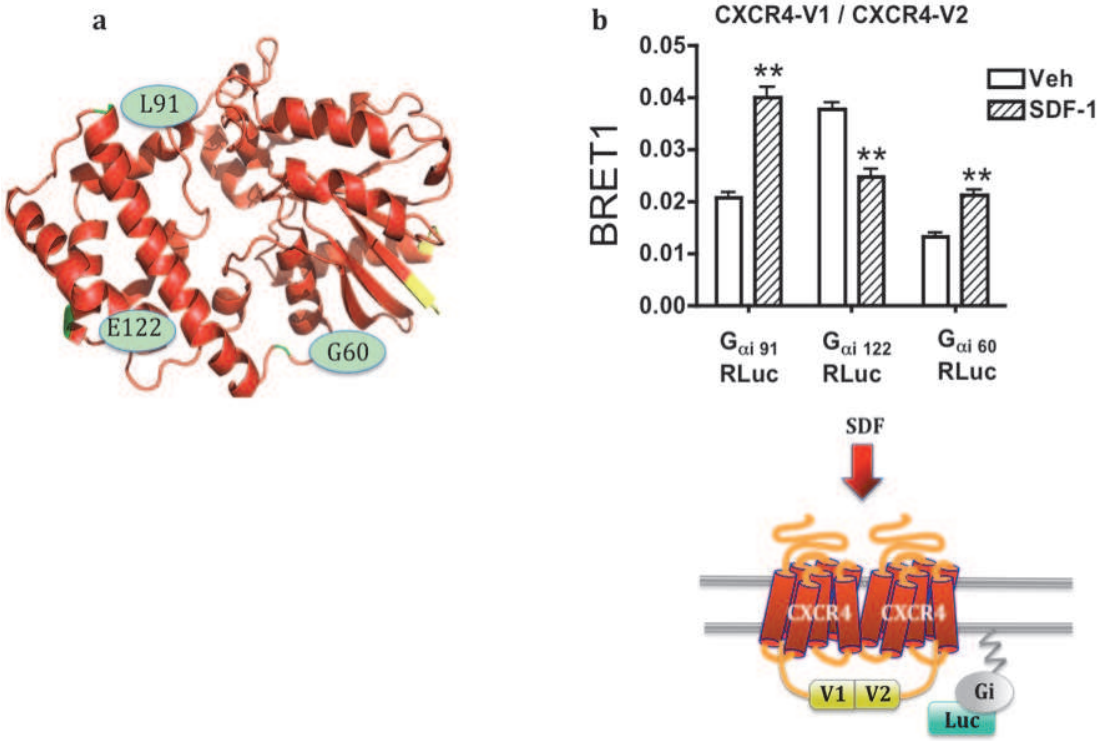

a
L91
E122
G60
b
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
BRET1
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
**
**
**
Veh
SDF-1
Gαi 91 RLuc
Gαi 122 RLuc
Gαi 60 RLuc
SDF
CXCR4
CXCR4
V1
V2
Gi
Luc

Figure 6: **CCR2 promoted trans-regulation between $G\alpha_{i1}$ and a dimer of CXCR4.** HEK293 cells were transfected with CXCR4-V1/CXCR4-V2/$G\alpha_{i1}$-91-*R*Luc (control) along with either (a) CCR2 (a) or Myc-D2 (b). Cells were then stimulatedion or not (Veh) with either by MCP-1 (200nM) or promoted a BRET increase between $G\alpha_{i191}$-*R*Luc and CXCR4-V1/V2. (b) No significant increase in BRET signal between $G\alpha_{i191}$-*R*Luc and CXCR4-V1/V2 was detected upon MCP-1 (200nM) stimulation in absence of cotransfected receptor or when the cotransfected Myc-D2 was treated with quinpirole (10μM), as indicated compared to vehicule condition. Results are the average mean +/- SEM of three independant independent experiments done in triplicate. Statistical analysis were carried out with Student t test. Asterisks indicates significant difference between treated and untreated condition. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05

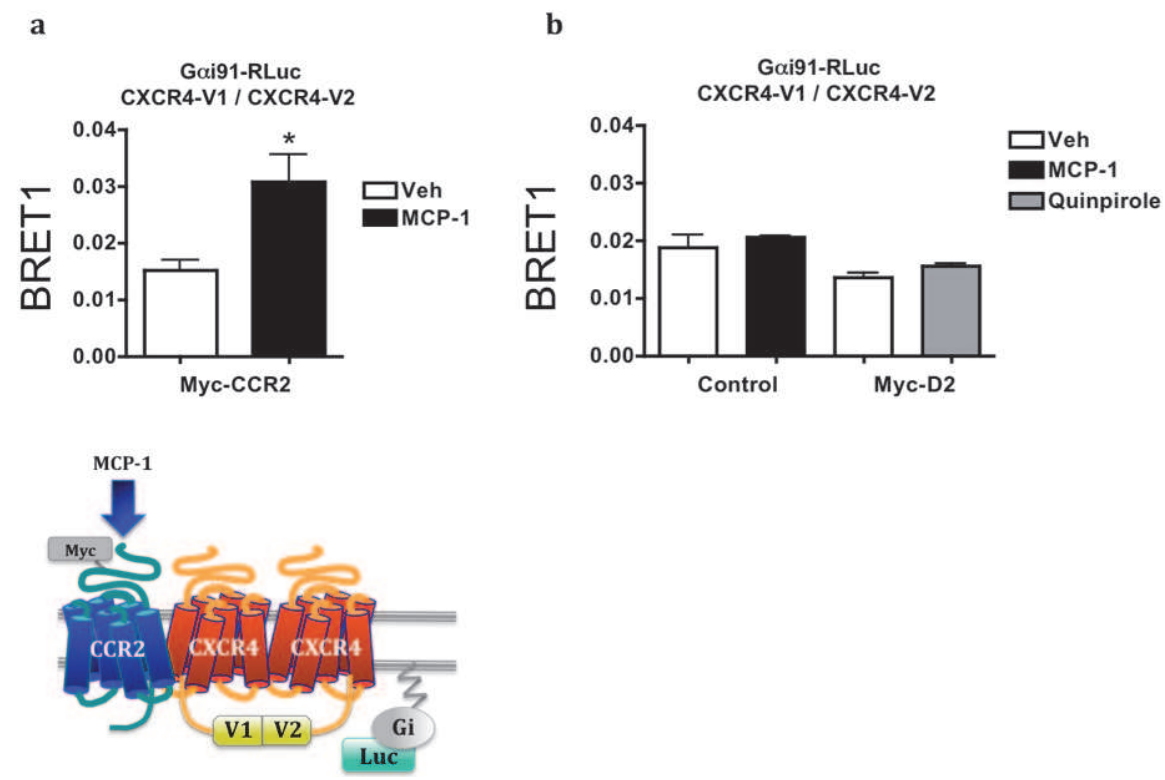

a
Gαi91-RLuc
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
BRET1
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
Veh
MCP-1
Myc-CCR2
b
Gαi91-RLuc
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
BRET1
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Veh
MCP-1
Quinpirole
Control
Myc-D2
MCP-1
Myc
CCR2
CXCR4
CXCR4
V1
V2
Gi
Luc

Figure 7: **Implication of CXCR4 in CCR2 promoted Gα_i engagement to CXCR4-CCR2 hétérocomplexheterocomplex.** (a) Cell were transfected with Gα_{i1}-91-*R*Luc and either CXCR4-vYFP or CXCR4-N119K-YFP. Cells were then stimulated or not (Veh) with 200nM SDF-1 and BRET measured(200nM) promoted BRET increase between Gα_{i191}-*R*Luc and CXCR4-vYFP is impaired when CXCR4-YFP asparagine 119 is mutated into lysine (N119K). (b) Cell were transfected with Gα_{i1}-91-*R*Luc and CCR2, along with either CXCR4-vYFP or CXCR4-N119K-YFP. They were then CCR2 stimulatedion by with (Veh) or without 200nM MCP-1 (200nM) promoted a BRET increase between Gα_{i191}-*R*Luc and CXCR4-vYFP that was significantly reduced when using CXCR4-N119K-vYFP. Results are the average +/- SEM of four independant independent experiments done in triplicate. Statistical analysis were carried out by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test . Asterisks indicates significant difference between stimulated and unstimulated conditions in (a) and between CXCR4-vYFP wt Vs vs CXCR4-N119K-vYFP stimulated conditions (b), as indicated. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05

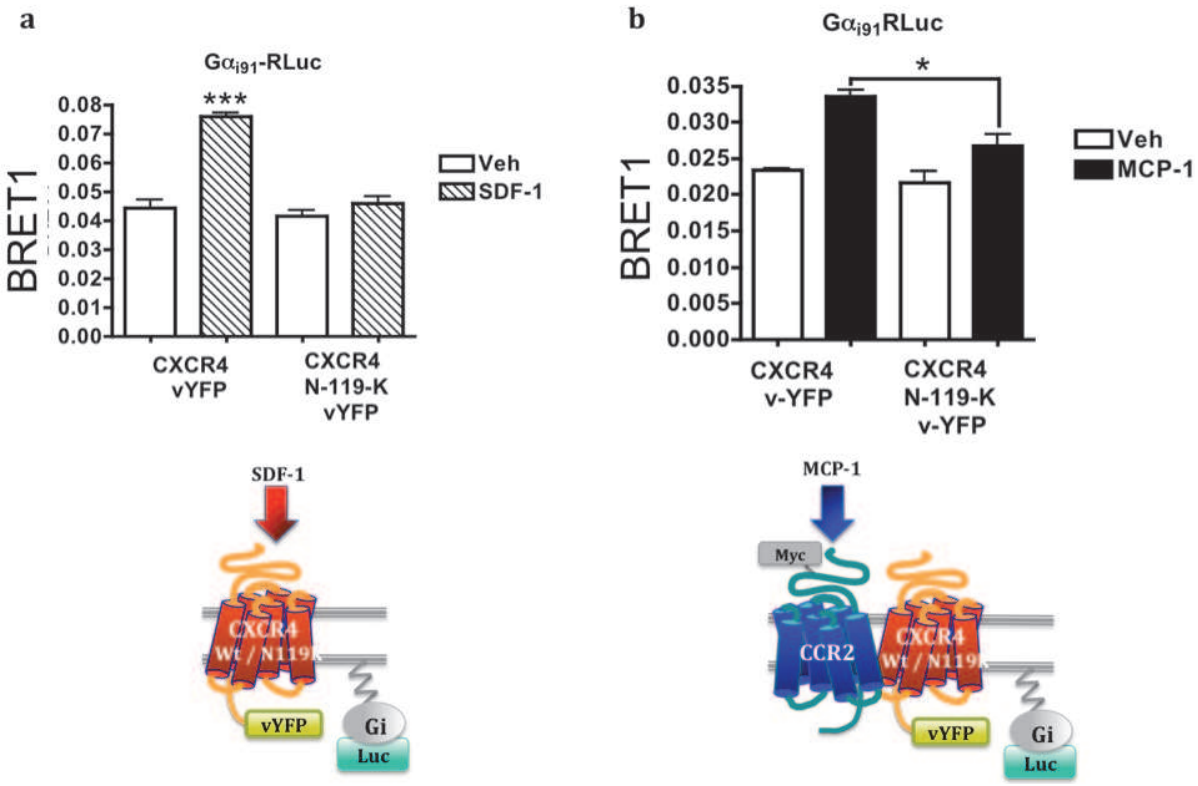

a
Gαi91-RLuc
BRET1
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
***
Veh
SDF-1
CXCR4 vYFP
CXCR4 N-119-K vYFP
SDF-1
CXCR4 Wt / N119K
vYFP
Gi
Luc
b
Gαi91RLuc
BRET1
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
*
Veh
MCP-1
CXCR4 v-YFP
CXCR4 N-119-K v-YFP
MCP-1
Myc
CCR2
CXCR4 Wt / N119K
vYFP
Gi
Luc

Figure 8: **Agonist promoted recruitment of β-arrestin2 to CXCR4 dimer and CCR2 dimer.** Cells were transfected with *R*LucII-β-arrestin2 and either CXCR4-V1/CXCR4-V2 pair (a) or CCR2-V1/CCR2-V2 pair (b). Cells were stimulated with either 200nM SDF-1 (a) or 200nM MCP-1 (b200nM) promoted time dependant recruitment of *R*LucII-β-arrestin2 to CCR2-V1/V2. Shown is one representative experiment of at least three independent experiment done in duplicate.

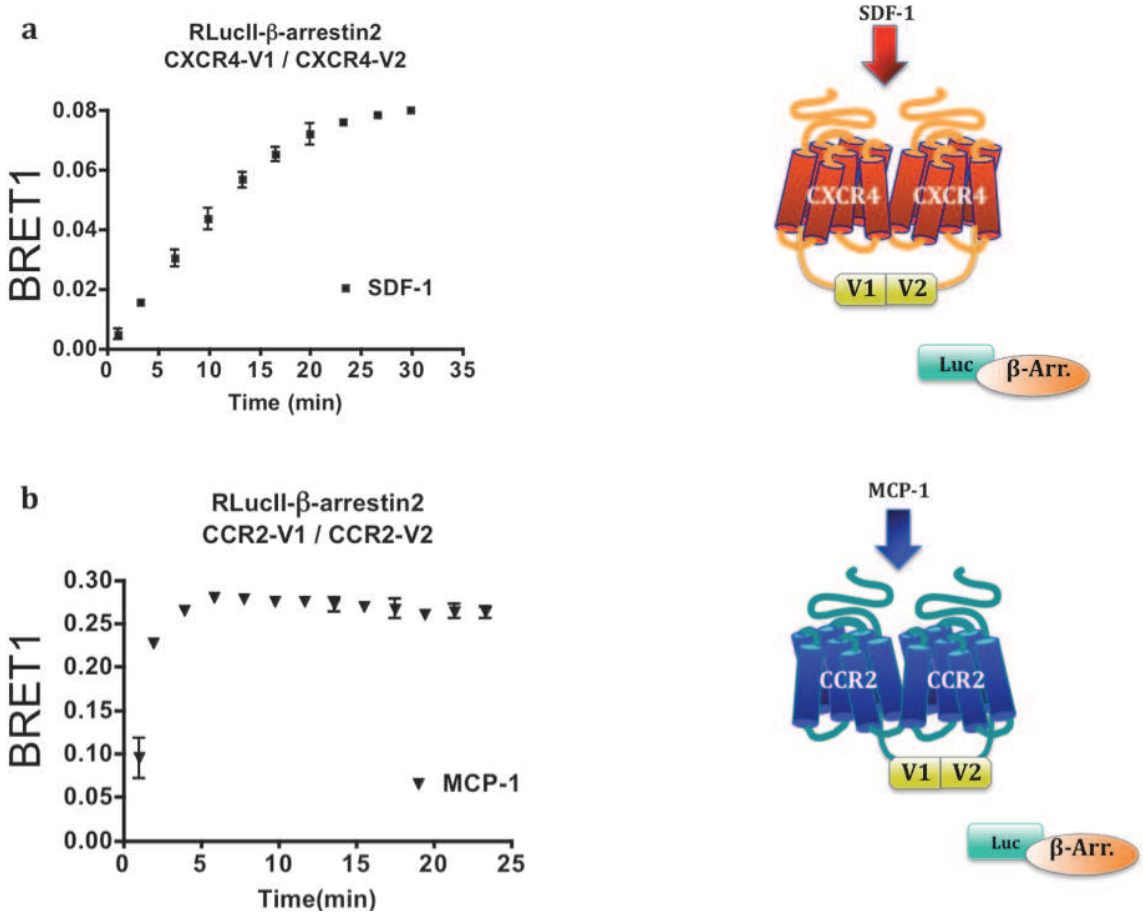

a
RLucII-β-arrestin2
CXCR4-V1 / CXCR4-V2
BRET1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0 5 10 15 20 25 30 35
Time (min)
SDF-1
SDF-1
CXCR4
CXCR4
V1
V2
Luc
β-Arr.
b
RLucII-β-arrestin2
CCR2-V1 / CCR2-V2
BRET1
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0 5 10 15 20 25
Time(min)
MCP-1
MCP-1
CCR2
CCR2
V1
V2
Luc
β-Arr.

Figure 9: **CCR2 promoted recruitment of β-arrestin2 to CXCR4-CCR2 heterocomplex.**

Cells were transfected with *R*LucII-β-arrestin2 and CXCR4-V1/CXCR4-V2 pair with or without (control) Myc-CCR2 (a) or Myc-D2 (b). Cells were then stimulated or not (Veh) with (a) CCR2 stimulation by 200nM MCP-1 or 10μM quinpirole, as indicated. (200nM) promoted a BRET increase between *R*LucII-β-arrestin2 and CXCR4-V1/V2. Results are the average +/- SEM of three independant experiments done in triplicate. (b) No significant increase in BRET signal between *R*LucII-β-arrestin2 and CXCR4-V1/V2 was detected upon MCP-1 (200nM) stimulation in absence of cotransfected receptor or when the cotransfected Myc-D2 was treated with quinpirole (10μM), compared to vehicule condition. Statistical analysis were carried out with Student t test. Asterisks indicates significant difference between treated and untreated condition. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. No asterisks means p>0,05

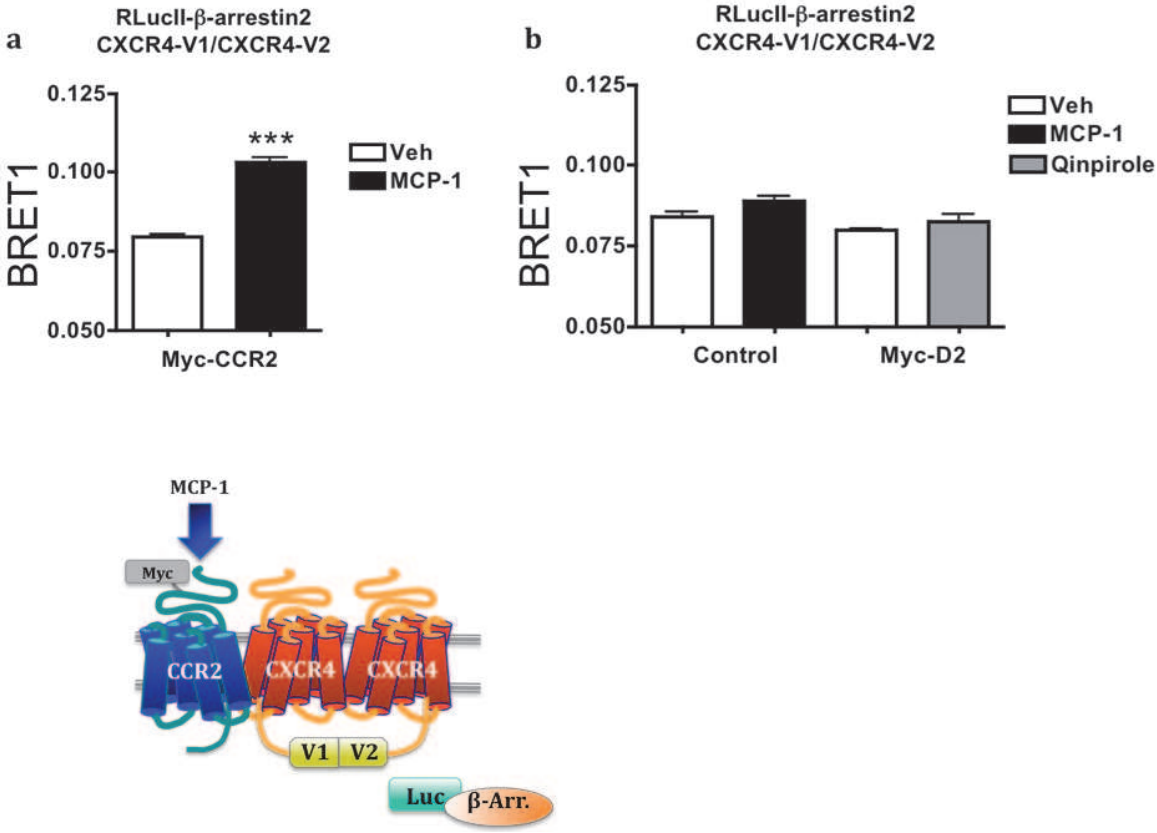
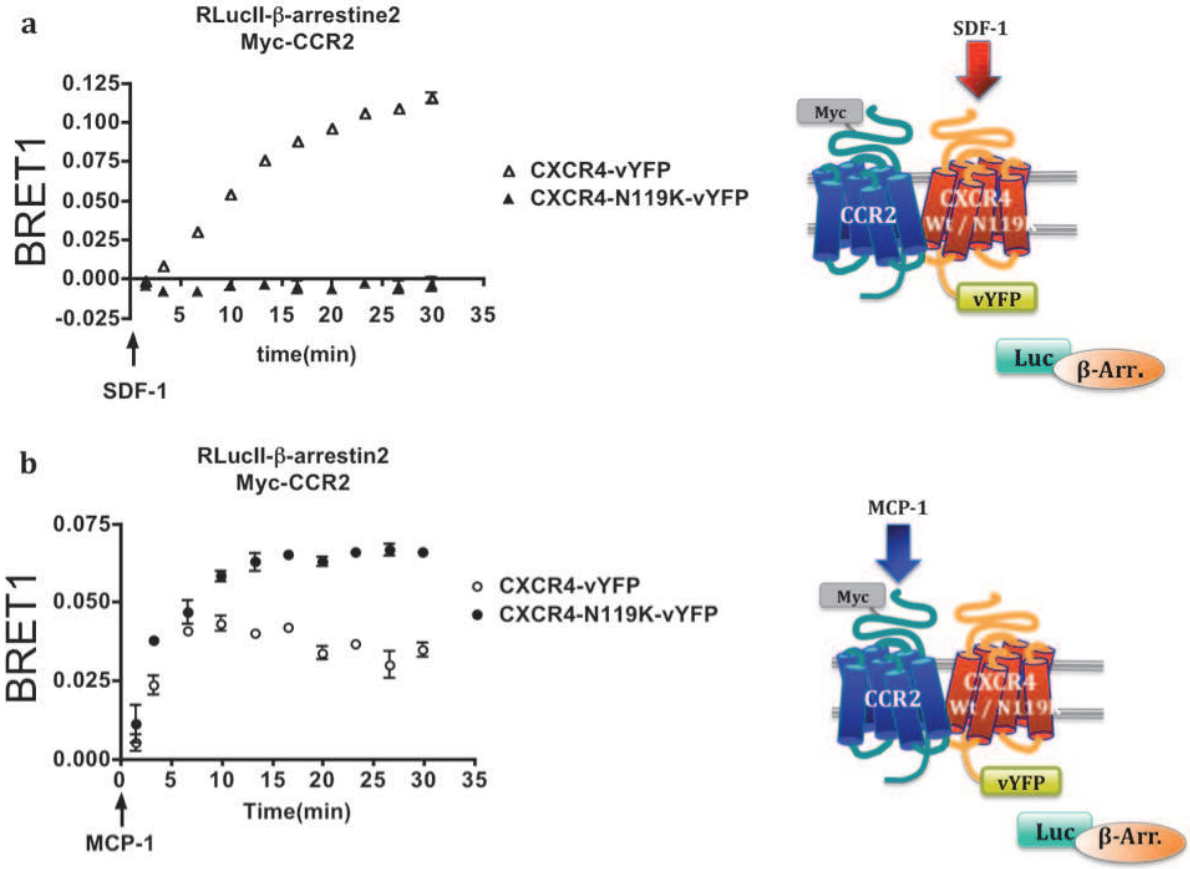
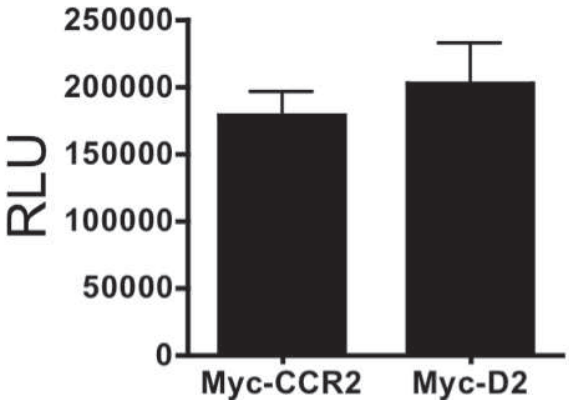

a
RLucII-β-arrestin2
CXCR4-V1/CXCR4-V2
BRET1
0.125
0.100
0.075
0.050
***
Veh
MCP-1
Myc-CCR2
b
RLucII-β-arrestin2
CXCR4-V1/CXCR4-V2
BRET1
0.125
0.100
0.075
0.050
Veh
MCP-1
Qinpirole
Control
Myc-D2
MCP-1
Myc
CCR2
CXCR4
CXCR4
V1
V2
Luc
β-Arr.

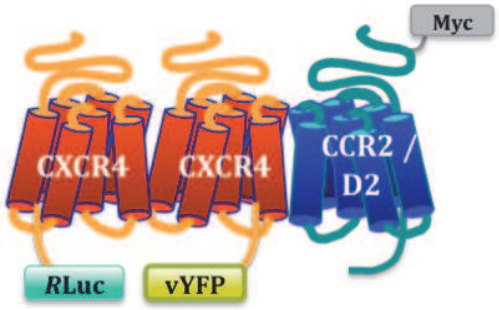
Figure 10: **CXCR4 N119K differentially regulates SDF-1 and MCP-1 mediated β-arrestin2 recruitment to CXCR4-CCR2 heterodimer.** Cells were transfected with *R*LucII-β-arrestin2 and Myc-CCR2 along with either CXCR4-vYFP or CXCR4-N119K-vYFP. Cells were then stimulated with 200nM of either SDF-1 (a) or MCP-1 (b) for the indicated time. **(a)** SDF-1 (200nM) promoted time dependant BRET increase between *R*LucII-β-arrestin2 and CXCR4-vYFP is totally impaired with the mutated form of CXCR4 N119K. (b) CCR2 stimulation by MCP-1 (200nM) promoted a time dependant BRET increase between *R*LucII-β-arrestin2 and CXCR4-vYFP that was significantly potentiated when using CXCR4-N119K-vYFP. Shown is one experiment representative of at least three independent experiment done in duplicate.


a
RLucII-β-arrestine2
Myc-CCR2
BRET1
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
-0.025
5
10
15
20
25
30
35
time(min)
SDF-1
CXCR4-vYFP
CXCR4-N119K-vYFP
SDF-1
Myc
CCR2
CXCR4
vYFP
Luc
β-Arr.
b
RLucII-β-arrestin2
Myc-CCR2
BRET1
0.075
0.050
0.025
0.000
0
5
10
15
20
25
30
35
Time(min)
MCP-1
CXCR4-vYFP
CXCR4-N119K-vYFP
MCP-1
Myc
CCR2
CXCR4
vYFP
Luc
β-Arr.

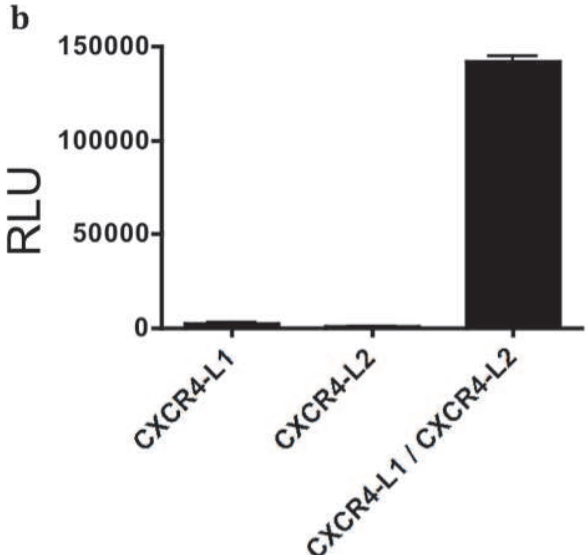
Supplementary Figure 1. Cell surface expression of Myc-CCR2 and Myc-D2. Cells were transfected with CXCR4-*R*LucII and CXCR4-vYFP along with either Myc-CCR2 or Myc-D2. Cell surface expression of Myc-tagged CCR2 and D2receptors in presence of cotransfected receptors depicted was assessed by ELISA using a . Myc receptors have been detected by mouse anti-Myc antibody $9^{E}10$ and a secondary rabbit antibody anti-mouse antibody fused to horse radish peroxydase., then the tTotal luminescence emitted was counted 10 minutes after substrate addition by using a luminometer, as decribed in Materials and Methodsprotocol.

Supplementary Figure 2. Dimerisation specificity of CXCR4 using BiLC. a) Schematic representation of CXCR4 BiLC *R*LucII encoding DNA fragments, with troncation the truncation site indicated. b) Cells were transfected with either CXCR4-L1 or CXCR4-L2 alone, or with the CXCR4-L1/CXCR4-L2 pair and luminescence measured.luminescence emmited by the two fragments CXCR4-L1 and CXCR4-L2 alone and after reconstitution. RLU: relative luminescence units


250000
200000
150000
100000
50000
0
RLU
Myc-CCR2
Myc-D2


Myc
CXCR4
CXCR4
CCR2 / D2
RLuc
vYFP

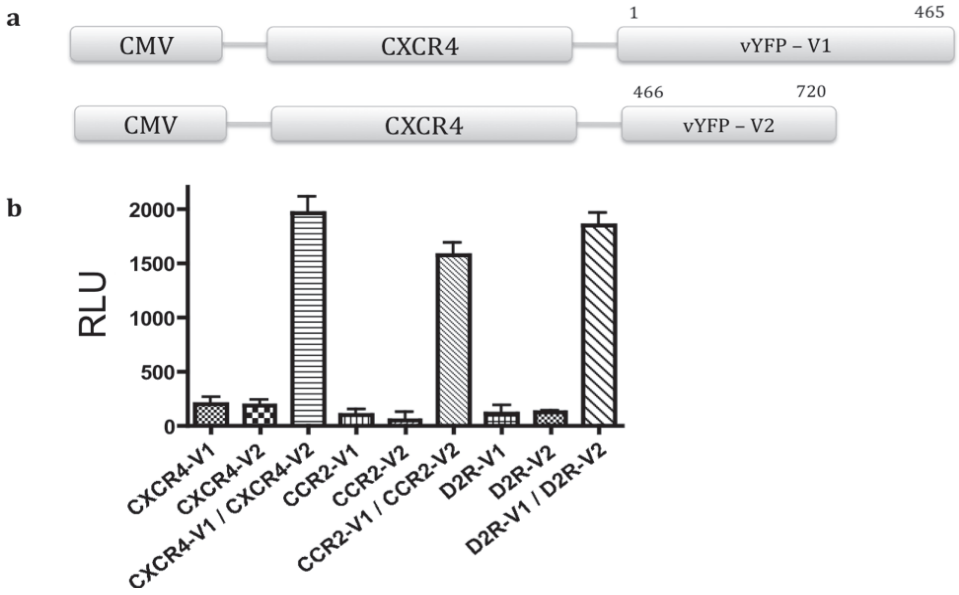

a
1
330
CMV
CXCR4
RLucII – PCA L1
331
936
CMV
CXCR4
RLucII – PCA L2


b
150000
100000
50000
0
RLU
CXCR4-L1
CXCR4-L2
CXCR4-L1 / CXCR4-L2

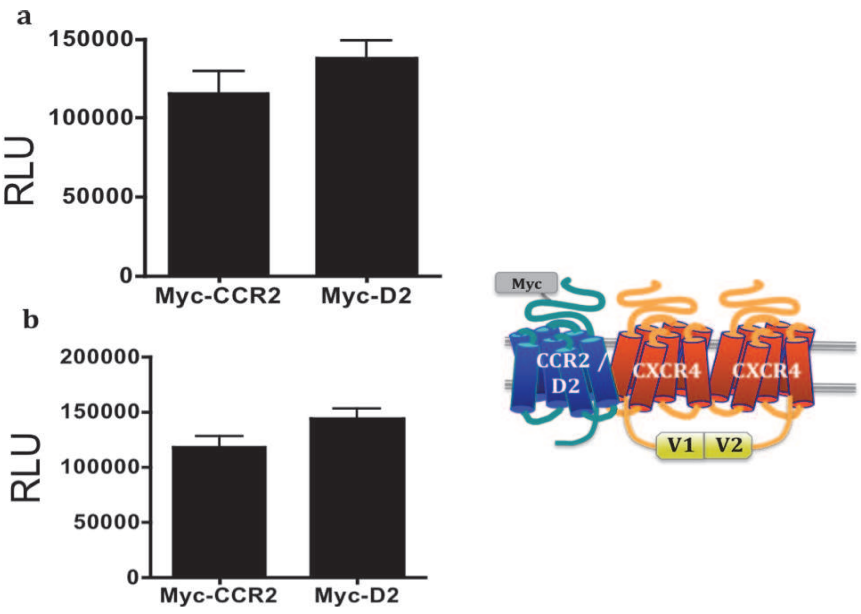
Supplementary Figure 3. Dimerisation specificity of CXCR4 using BiFC. a) Schematic representation of CXCR4 BiFC vYFP DNA fragments with the trouncation site indicated. b) Cells were transfected with either the CXCR4-, CCR2- or D2-V1 or -V2 plasmid alone, or with the V1/V2 pair, as indicated, and the fluorescence emmitted measured.by the two fragments alone and after reconstitution of CXCR4, CCR2 and D2 receptors. . RFU: relative fluorescence units.

Supplementary Figure 4. Cell surface expression of Myc-CCR2 and Myc-D2. Cells were transfected with CXCR4-V1/CXCR4-V2 pair with either Myc-CCR2 or Myc-D2. Cell surface expression of Myc-tagged receptors was assessed by ELISA using a mouse anti-Myc antibody $9^{E}10$ and a secondary rabbit anti-mouse antibody fused to horseradish peroxydase. Total luminescence emitted was counted 10 minutes after substrate addition using a luminometer, as decribed in Materials and Methods.

a) and b) Cell surface expression of Myc-tagged CCR2 and D2 in presence of cotransfected receptors depicted as assessed by ELISA. Myc receptors have been detected by mouse anti-Myc antibody $9^{E}10$ and a secondary rabbit antibody anti-mouse fused to horse radish peroxydase, then the total luminescence emitted was counted 10 minutes after substrate addition by a luminometer as decribed in protocol.

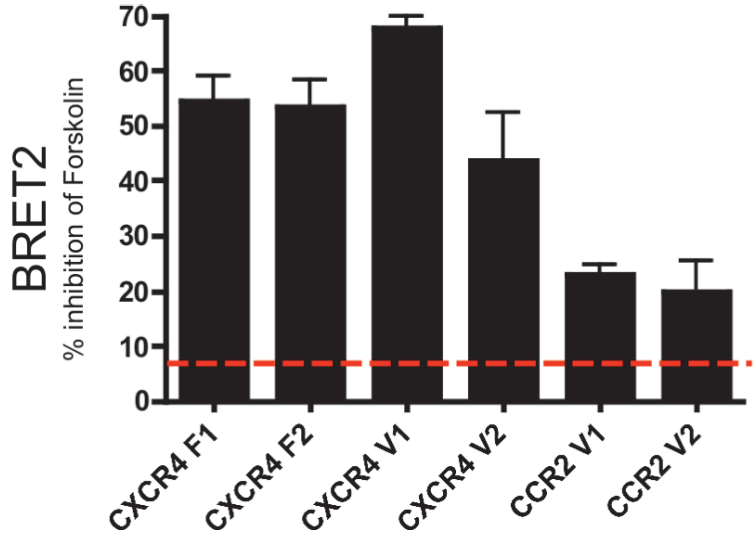


Supplementary figure 3



Supplementary figure 4

Supplementary Figure 5. Fonctionnal caracterisation of the BiLC and BiFC constructs generated.; Cells were transfected with the indicated PCA plasmids and their ability to inhibit the adenylate cyclise was measured after ligand stimulation using the cAMP BRET biosensor production generated by each receptor-fused PCA fragment was tested by RLucII-EPAC-GFP2 BRET assay. Results shows the percentage of forskolin inhibition and are presented has the inverse of BRET signal.


BRET2
% inhibition of Forskolin
70
60
50
40
30
20
10
0
CXCR4 F1
CXCR4 F2
CXCR4 V1
CXCR4 V2
CCR2 V1
CCR2 V2

Article 2

Site–spécific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling

Résumé

Suite à la liaison de l'agoniste, la désensibilisation des récepteurs est initiée par la phosphorylation de résidus serines / thréonines par les kinases des RCPG (GRK) qui permettent la liaison de la β-arrestine avec une haute affinité, découplant le récepteur de la protéine G pour mettre fin au signal. Cette étude démontre en utilisant la spectrométrie de masse et des anticorps phospho-spécifiques que le récepteur de chimiokines CXCR4 est phosphorylé sur plusieurs sérines de son extrémité C-terminale. Les sérines 324 et 325 seraient phosphorylées rapidement par la PKC et GRK6 alors que la sérine 339 serait phosphorylée spécifiquement par GRK6 dans des temps courts également. La sérine 330 est aussi phosphorylée par la GRK6 mais une cinétique plus lente. En utilisant des petites ARN interférents (siRNA) dirigés contre les GRK les plus exprimées (GRK2/3/5/6) et contre les deux arrestines, il a pu être démontré dans cette étude que GRK2, GRK6 et l'arrestine 3 désensibilisaient préférentiellement la voie du calcium alors que GRK3, GRK6 et l'arrestine 3 favoriseraient l'activation des MAPK ERK1/2. Enfin, GRK2 jouerait un rôle dans l'inhibition des MAPK ERK1/2.

Le but de cette collaboration a été de distinguer le rôle de la phosphorylation de certains résidus sur l'interaction directe des arrestines avec le récepteur CXCR4 en BRET (Figures 11A-D)

[Note au lecteur : les termes arrestine 2 et 3 seront employés à la place de β-arrestine 1 et 2 pour rester fidèle à la nomenclature employée dans l'article]

Site–spécific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling

John M. Busillo[1], Sylvain Armando[2], Rajarshi Sengupta[3], Olimpia Meucci[3], Michel Bouvier[2] and Jeffrey L. Benovic[1]

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University Philadelphia, PA 19107 (U.S.A.)[1], Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7 (Canada)[2] and Department of Pharmacology and Physiology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA 19102 (U.S.A.)[3]

Running head: CXCR4 phosphorylation and regulation

Address correspondence to: Jeffrey L. Benovic[redacted]y, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107.

ABSTRACT

The chemokine receptor CXCR4 is a widely expressed G protein-coupled receptor that has been implicated in a number of diseases including HIV, cancer, and WHIM syndrome, with the latter two involving dysregulation of CXCR4 signaling. To better understand the role of phosphorylation in regulating CXCR4 signaling, tandem mass spectrometry and phospho-specific antibodies were used to identify sites of agonist-promoted phosphorylation. These studies demonstrated that Ser-321, Ser-324, Ser-325, Ser-330, Ser-339 and two sites between Ser-346-352 were phosphorylated in HEK293 cells. We show that Ser-324/5 was rapidly phosphorylated by protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase 6 [GRK6] upon agonist treatment while Ser-339 was specifically and rapidly phosphorylated by GRK6. Ser-330 was also phosphorylated by GRK6, albeit with slower kinetics. Similar results were observed in human astroglia cells, where endogenous CXCR4 was rapidly phosphorylated on Ser-324/5 by protein kinase C following CXCL12 treatment while Ser-330 was slowly phosphorylated. Analysis of CXCR4 signaling in HEK293 cells revealed that calcium mobilization was primarily negatively regulated by GRK6 and arrestin3 while GRK3, GRK6, and arrestin2 played a primary role in positively regulating ERK1/2 activation. In contrast, GRK2 appeared to play a lesser but negative role in both calcium mobilization and ERK1/2 activation. Finally, we show that arrestin association with CXCR4 is primarily driven by the phosphorylation of far C-terminal residues on the receptor. These studies reveal that site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically

regulated by multiple kinases resulting in both positive and negative modulation of CXCR4 signaling.

INTRODUCTION

CXCR4 is a widely expressed chemokine receptor that is essential for development, hematopoiesis, organogenesis, and vascularization (1). CXCR4 also plays a prominent role in a number of diseases including WHIM syndrome (2), HIV-1 entry (3) and cancer progression and metastasis (4). Interestingly, WHIM syndrome is the direct result of C-terminal truncations of CXCR4 which result in enhanced receptor function (5). CXCR4 is also overexpressed in at least 23 different types of cancer (6) and accumulating evidence suggests that there is dysregulation of CXCR4 transcription, signaling and trafficking (1).

Protein phosphorylation is the most prevalent post-translational modification and plays a major role in regulating protein function (7, 8). Importantly, phosphorylation is one of the earliest events in regulating G protein-coupled receptor [GPCR] signaling, initiating a process known as desensitization (9, 10). Agonist-promoted desensitization is primarily mediated by members of the GPCR kinase [GRK] family, which specifically phosphorylate agonist-occupied GPCRs (9-11). This promotes the recruitment and high affinity binding of arrestins, which function to uncouple the receptor from G protein, target receptors for internalization, and promote G protein-independent signaling (12, 13). While the specific protein kinases that mediate phosphorylation of individual GPCRs have not been well defined, site-specific and tissue-specific phosphorylation of GPCRs likely have distinct effects on signaling (14).

CXCR4 is rapidly phosphorylated within its 45 amino acid serine/threonine-rich C-terminal tail upon activation. Previous studies have suggested a number of potential phosphorylation sites critical for agonist (CXCL12)- and PKC-mediated receptor internalization (15, 16) and degradation (17). In addition, GRK2 (16, 18, 19), GRK3 (20), GRK6 (21, 22), and PKC (16, 23) have been implicated in CXCR4 regulation, although the sites of phosphorylation, the kinases involved in the phosphorylation of specific sites, and the functional role of site-specific phosphorylation remain largely unknown.

In order to better understand the role of phosphorylation in regulating CXCR4 function, we sought to identify agonist-promoted sites of phosphorylation and the kinases that mediate site-specific phosphorylation. Using liquid chromatography tandem mass spectrometry [LC/MS/MS] and phospho-specific antibodies, we identified seven serine residues that are phosphorylated in response to CXCL12 stimulation. We show that phosphorylation of these sites occurs with distinct kinetics and kinase specificity: namely Ser-324/325 phosphorylation is rapid, transient and is primarily mediated by PKC and GRK6; Ser-330 phosphorylation is delayed and is mediated by GRK6; and Ser-339 is phosphorylated rapidly by GRK6. Finally, we show that GRK-mediated phosphorylation of CXCR4 has distinct effects on arrestin recruitment and conformation leading to differential effects on calcium mobilization and ERK1/2 activation following CXCR4 activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Cell culture and transfections. HEK293 cells (Microbix, Toronto, Canada) were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle's media [DMEM] with 10% fetal bovine serum and 25 mM HEPES, pH 7.4. Cells stably expressing CXCR4 were selected and maintained in complete DMEM supplemented with 0.8 mg/ml G418 and penicillin/streptomycin. HEK293 cells were plated in fresh complete DMEM 24 hr prior to RNAi transfection. Normal human astrocytes derived from neural precursor cells and isolated from 16-22 week embryos were purchased from ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA). Cells were cultured in Astrocyte Medium supplemented with fetal bovine serum (2%) and Astrocyte Growth Supplement provided by the vendor. As previously reported (24), these cells express functional CXCR4 and maintain an astroglial phenotype during the entire culture period, as assessed by GFAP staining. Cells were used for 2-3 passages and serum starved for 24 hr before experimental treatments. All siRNAs were synthesized by Dharmacon (Lafayette, CO) with the ON-TARGET plus modification. Four separate siRNAs were reconstituted and pooled at a final concentration of 15 pmol/μl. GRKs were targeted against the following sense strands: GRK2 – *5' GGGACGUGUUCCAGAAAUU 3'; 5' GCUCGCAUCCCUUCUCGAA 3'; 5' GGAAUCAAGUUACUGGACA 3'; 5' GCAAUAAGUUCACACGGUU 3'*; GRK3 – *5' GGAGUGUGAUGCAGAAGUA 3'; 5' GAGGAUACCAAAGGGAUUA 3'; 5'*

GGGAAGGACUGUAUUAUGC 3'; 5' GAACACGUACAAAGUCAUU 3'; GRK5 – *5'CCAACACGGUCUUGCUGAA 3'; 5' GGGAGAACCAUUCCACGAA 3'; CAAACCAUGUCAGCUCGAA 3'; 5' GAUUAUGGCCACAUUAGGAUU 3';* GRK6 – *5'GGUGAAGAAUGAACGGUAC 3'; 5' GAGCUUGGCCUACGCCUAU 3'; GCACGUAACGCAGAAUUUU 3'; 5' CGCCAAGAUUGCUGUGGAA 3'*. PKCδ was targeted against the following sense strands: *5' CCAUGAGUUUAUCGCCACC 3'; 5' CAGCACAGAGCGUGGGAAA 3'*. The arrestin and PKCα siRNAs have been previously described (25, 26). The PKC siRNAs were reconstituted individually at 60 pmol/μl. Prior to transfection, 300 pmol of each were combined for a total of 600 pmol/transfection. Non-targeting siRNA pooled control modified with the ON-TARGET plus modification was used for all experiments. HEK293 cells, ~65 to 70% confluent, were transfected with 600 pmol of siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in OPTI-MEM (Invitrogen) per the manufacturer's instructions. Cells were maintained in low-serum media for 4 hr, at which point an equal volume of 2X complete media (20% FBS and 25 mM HEPES) was added. Cells were split 48 hours post-transfection for assay the following day.

Site-specific mutagenesis was carried out using the Quick change site directed mutagenesis kit (Stratagene) per the manufacturer's guidelines. All mutations were verified by sequencing.

Purification of Flag CXCR4. Purification of Flag-tagged CXCR4 was performed as previously described for the b_2AR (27) with minor modifications. Cells grown to ~90% confluency in five 15-cm plates were washed twice with phosphate buffered saline [PBS]. Cells were then incubated in serum free DMEM media [SFM] for 6 hr, the media was aspirated, and replaced with fresh SFM containing 50 nM CXCL12 for 10 min. Cells were scrapped into 10 ml of hypotonic lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM $CaCl_2$, 10 mM NaF, and one Complete Protease inhibitor tablet (EDTA-free)) and lysed by 10 strokes in a Dounce homogenizer (tight pestle). Membranes were pelleted by centrifugation at 40,000 x *g* for 20 min at 4°C. Pellets were resuspended in 10 ml of Buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% dodecyl maltoside [DDM], 2.5 mM $CaCl_2$, and one Complete protease inhibitor tablet (EDTA-free)) and homogenized by 20 strokes in a Dounce homogenizer. Cellular debris

was cleared by centrifugation at 40,000 x *g* for 20 min at 4°C. The resulting supernatant was passed over an M1 anti-flag affinity (Sigma-Aldrich, St Louis MO) column (0.4 ml resin/10 ml of lysate, flow rate of 5 ml/hr) equilibrated in Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% DDM, 2.5 mM $CaCl_2$) at room temperature. The column was washed once with 5 ml of Buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1% DDM, 2.5 mM $CaCl_2$) at a rate of 10 ml/hr followed by an additional wash with 5 ml of Buffer B. Bound receptor was then eluted from the column in Buffer D (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% DDM, 200 μM Flag peptide, 1 μM AMD 3100, 10 mM EDTA) in 1 ml fractions and immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Fractions containing CXCR4 (by Western blot) were concentrated using Microcon ultracell YM-10 concentrators (Millipore Cooperation, Billerica, MA). Purified CXCR4 was electrophoresed on a 4-20% SDS-Glycine gradient gel (Invitrogen, Carlsbad CA), stained with Coomassie blue, de-stained, excised and shipped on ice for LC/MS/MS analysis.

LC/MS/MS procedure. Gel pieces were transferred to siliconized tubes, washed and destained overnight in 200 μl of 50% methanol. The gel pieces were dehydrated in acetonitrile and then rehydrated in 30 μl of 10 mM dithiothreitol [DTT] in 0.1 M ammonium bicarbonate and incubated at room temperature for 30 min. The DTT solution was removed and the sample was alkylated in 30 μl of 50 mM iodoacetamide in 0.1 M ammonium bicarbonate at room temperature for 30 min. The gel pieces were dehydrated in 100 μl of acetonitrile, rehydrated in 100 μl of 0.1 M ammonium bicarbonate, dehydrated in 100 μl of acetonitrile, completely dried by vacuum centrifugation and then rehydrated in 20 μl of 50 mM ammonium bicarbonate containing 20 ng/μl Lys-C or chymotrypsin and incubated overnight at 37°C. Peptides were extracted from the polyacrylamide in two 30 μl aliquots of 50% acetonitrile/5% formic acid and the extracts were combined and evaporated to 15 μl for MS analysis.

The LC/MS system consisted of a Thermo Electron LTQ-FT mass spectrometer system with a Protana nanospray ion source interfaced to a self-packed 8 cm x 75 mm id Phenomenex Jupiter 10 mm C18 reversed-phase capillary column. Extract (1-5 μl) was injected and peptides eluted from the column using an acetonitrile/0.1 M acetic acid gradient at a flow rate of 0.25 μl/min. The nanospray ion source was operated at 2.8 kV. The digest was analyzed using the

double play capability of the instrument acquiring full scan mass spectra (ICR; 100K resolution) to determine peptide molecular weights and five product ion spectra (ion trap) to determine amino acid sequence in sequential scans. This mode of analysis produces approximately 1500 CAD spectra of ions ranging in abundance over several orders of magnitude. The data were analyzed by database searching using the Sequest search algorithm against CXCR4. Putative phosphorylated peptides were confirmed by manual analysis.

Generation of polyclonal antibodies specific for pS324/5 and pS330. Polyclonal antibodies specific for pS324/5 and pS330 were generated by Open Biosystems (Huntsville, AL). Briefly, peptides corresponding to phosphorylated CXCR4 at Ser-324/5 (C-Ahx-RG(pS)(pS)LKIL where Ahx is amino hexonic acid) and Ser-330 (CLKIL(pS)KGKRGGH) were synthesized, coupled to hemocyanin and used to immunize rabbits following a standard immunization protocol. Crude sera from each rabbit was collected at days 28, 56 and 72 following primary immunization and tested for immuno-reactivity. Antibody was purified from pooled bulk sera (days 56 and 72) from animal E5199 (pS324/5) and E5198 (pS330) using the immunizing peptide, concentrated to 1 mg/ml, and aliquots were stored at –80°C. Antibody specificity was evaluated by preincubating 10 μg of purified antibody with vehicle (PBS), 10 μg of the immunizing peptide or 10 μg of the non-phosphorylated peptide.

Calcium mobilization and ERK1/2 activation. Calcium mobilization was performed as previously described (25). For analyzing ERK1/2 activation, cells were plated into 6-well plates 24 hr prior to stimulation. Confluent cells were washed twice with PBS and maintained in 1 ml of SFM for 6 hr at 37°C prior to stimulation. Following stimulation, media was aspirated on ice and cells were lysed by the addition of 300 μl of 2x SDS sample buffer and stored at –80°C until processed. Lysates were thawed on ice, sonicated for 10 sec (10% amplitude) and allowed to sit at room temperature for 30 min prior to electrophoresis. Equal volumes were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, blocked with ODYSSEY® blocking buffer (Li-Cor® Biosciences) and blotted overnight with a mixture of anti-phospho-p42/44 (Cell Signaling Technologies, Boston MA) and anti-ERK2 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). The following day, blots were washed extensively with Tris Buffered Saline containing 0.1% Tween-20 [TBS-T],

incubated with a mixture of goat anti-rabbit Alexa® Fluorophore 680 conjugated (Molecular Probes) and goat anti-mouse IRDye 800 conjugated secondary (Rockland Immunochemicals) antibodies (1:5000) for 1 hr at room temperature. Blots were washed extensively with TBS-T and visualized using the ODYSSEY® infrared imaging system (Li-Cor® Biosciences).

Detection of pS324/5, pS330 and pS339. HEK293 cells stably expressing Flag CXCR4 were stimulated and processed as described for ERK1/2 activation. An equal volume of cell lysate (Flag CXCR4) or 20 μg of whole cell extract (astroglia) was separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blocked for 1 hr in 0.25% gelatin. Blots were incubated overnight at 4°C with a mixture of anti-CXCR4 (BD Bioscience) and anti-pS324/5, anti-pS330, or anti-pS339 primary antibodies. Blots were extensively washed with TBS-T and incubated with a mixture of goat anti-rabbit Alexa® Fluorophore 680 conjugated (Molecular Probes) and goat anti-rat IRDye 800 conjugated secondary (Rockland Immunochemicals) antibodies for 1 hr at room temperature. Blots were developed as described above for phospho-ERK. Phospho-CXCR4 was then normalized to total CXCR4 and is represented as percent maximum. For assays with PKC inhibition, cells were pretreated with vehicle (DMSO) or appropriate inhibitor for 30 min prior to stimulation with CXCL12.

Electrophoretic mobility shift assay. An equal volume of cell lysate was separated by 10% SDS-PAGE for 1 hr 40 min at ~135V, transferred to nitrocellulose and blocked for 1 hr in 5% milk in TBS-T. Blots were subsequently probed for CXCR4 as described above for phospho-CXCR4.

BRET Assay. For BRET studies, HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and streptomycin, all from Wisent. Twenty four hr before transfection, cells were seeded at a density of 500,000 cells per well in 6-well dishes. Transient transfections were performed using the linear polyethylenimine (Mw 25000, Polysciences, Warrington, PA) method with a DNA: polyethylenimine ratio of 2:7. Twenty ng of CXCR4-*R*LucII, 120 ng of GRK6SA CXCR4-

*R*LucII, or 90 ng of 5Atail CXCR4-*R*LucII were co-transfected with either 500 ng of GFP2-arrestin2 or GFP2-arrestin3. The total amount of DNA transfected in each well was adjusted to 2 μg with salmon sperm DNA. After overnight incubation, transfection medium was replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium for 3 hr to allow cell recovery. Transfected cells were then detached, seeded in pre-treated Poly-L-ornithine hydrobromide (Sigma Aldrich, P3655) 96-well white plates at 100,000 cells per well and left in culture for an additional 24 hr before being processed for BRET assay.

The expression level of the energy acceptor (GFP2) tagged proteins was measured as total fluorescence using a FlexStationII (Molecular Device) with an excitation filter at 395 nm and an emission filter at 510 nm. The expression level of the energy donor (*R*LucII) tagged protein was measured using a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) in the presence of 5 μM coelenterazine 400A (Biotium, Hayward, CA) after 5 min incubation.

For BRET measurements, cells were washed once 36 to 48 hr after transfection with phosphate buffered saline and coelenterazine 400A was added to a final concentration of 5 μM in PBS 5 min before reading. Readings were then collected using a multidetector plate reader MITHRAS LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) allowing the sequential integration of the signals detected in the 480 (±) 20 nm and 530 (±) 20 nm windows for luciferase and GFP2 light emissions, respectively. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the GFP2-arrestin over the light intensity emitted by the Receptor-*R*LucII. The values were corrected by subtracting the background BRET signal detected when the Receptor-*R*LucII construct was expressed alone. To assess the effects of ligand, SDF1 was added at 100 nM just before reading.

Statistical Analysis. All data are represented as the mean ± standard error of the mean [S.E.M.]. Data were analyzed using a two-tailed student's t-test with significance set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Phospho-site mapping of CXCR4 by mass spectrometry. CXCR4 is rapidly phosphorylated and internalized following agonist-activation (16, 23, 28). Truncation of the C-terminal tail of CXCR4, which contains 15 serine and 3 threonine residues, eliminates agonist-promoted phosphorylation, attenuates internalization, and enhances receptor activity (23, 28). Since alanine scanning mutagenesis suggested that multiple regions of the C-tail may be phosphorylated following CXCL12 stimulation (16), we decided to use mass spectrometry to better define the specific sites phosphorylated in CXCR4. We initially made a cell line stably expressing Flag-tagged CXCR4 to enable rapid purification of the receptor, as previously demonstrated for the β_2-adrenergic receptor (b_2AR) (27). HEK293 cells were chosen as a model cell because they express CXCR4 endogenously, though at very low levels (~20 fmol/mg membrane protein). A clonally selected HEK293 cell line expressing Flag-tagged CXCR4 at ~0.5 pmol/mg (termed Flag CXCR4 cells) was chosen for further study. CXCL12 stimulation of endogenous CXCR4 in HEK293 cells resulted in robust calcium mobilization (Figure 1A) and ERK1/2 activation (Figure 1B), although, due to low expression of endogenous CXCR4, we were unable to detect CXCL12-mediated inhibition of cAMP production or activation of p38 or AKT (data not shown). Stable-expression of CXCR4 did not enhance CXCL12-mediated calcium mobilization (Figure 1A) but did lead to an ~2.5 fold increase in activation of ERK1/2 (Figure 1B). In addition, as an indirect measure of receptor phosphorylation, we looked at the ability of CXCL12 to induce an electrophoretic mobility shift of CXCR4 on SDS-PAGE. Stimulation of either HEK293 cells (Figure 1C) or Flag CXCR4 cells (Figure 1D) resulted in a rapid retardation of electrophoretic mobility, consistent with receptor phosphorylation. Thus, the Flag CXCR4 cells appear to be a good model to further characterize CXCR4 phosphorylation.

Mass spectrometry has become a valuable tool for identifying amino acids that are post-translationally modified (29), a strategy recently employed for the b_2AR (27). Since phosphorylation adds ~80 daltons [Da] to the molecular mass of a peptide, peptides with changes of 80 Da (or multiples thereof) from the theoretical mass can be identified, trapped and subsequently fragmented by MS/MS to provide site-specific information on phosphorylation (29). To identify sites of phosphorylation on CXCR4, Flag CXCR4 cells were treated with CXCL12 for 10 min and the receptor was then affinity purified on an anti-Flag column (Figure 2A). This procedure resulted in ~80% recovery of the receptor and yielded ~0.5 mg of purified

CXCR4 per preparation (Figure 2B). Duplicate samples of purified CXCR4 were then digested with either Lys-C or chymotrypsin and the resulting peptides were subjected to LC/MS/MS. This identified peptides containing 38 of the 45 C-terminal residues of CXCR4 including residues 310-328 and 334-352, and several of the peptides were phosphorylated (Table 1). Figure 2C shows a representative mass spectrum of a peptide (Thr-318 to Leu-328) obtained from a chymotryptic digest, which contains five potential phosphorylation sites (Thr-318, Ser-319, Ser-321, Ser-324, and Ser-325). The peak occurring with a mass ratio of ~600 demonstrates that this peptide has two phosphates attached (M-$(H_3PO_4)_2$). The loss of phosphates upon fragmentation was apparent when Ser-324 and Ser-325 were present in the fragment (see peaks b9-$(H_3PO_4)_2$ and [b10-$(H_3PO_4)_2$]$^{2+}$) but not in a peptide containing Thr-318, Ser-319 and Ser-321 (peak b4), demonstrating that both Ser-324 and Ser-325 are phosphorylated. These results were confirmed from two separate experiments as well as with peptides derived from Lys-C digestion (Table 1). Since peptides containing Ser-325 phosphorylation alone were also observed, we speculate that Ser-325 is phosphorylated before Ser-324 although we were unable to generate a pS325-specific antibody to directly test this. Overall, these studies identified six sites of phosphorylation following a 10 min stimulation with CXCL12: Ser-321, Ser-324, Ser-325, one residue from Ser-338 to Ser-341, one residue from Ser-346 to Ser-348, and either Ser-351 or Ser-352 (Figure 2D). The specific sites of phosphorylation that occur from Ser-338 to Ser-352 were not able to be specifically determined by LC/MS/MS due to the serine-rich nature of this region.

Protein kinase C is primarily responsible for phosphorylation of Ser-324/5. Previous mutagenesis studies have identified Ser-324/5 as critical for CXCL12-induced internalization (16) and degradation (17) as well as PMA-promoted internalization (16, 23). To further characterize Ser-324/5 phosphorylation, we generated a phospho-specific antibody to evaluate the kinetics of phosphorylation and kinase-specificity for these residues. A 10 min stimulation with CXCL12 resulted in robust phosphorylation of Ser-324/5 that was blocked by pre-incubation with the immunizing phospho-peptide but not with vehicle or unphosphorylated peptide (Figure 3A). Flag CXCR4 cells were then stimulated for various times with CXCL12 and cell lysates were electrophoresed and blotted with anti-pS324/5 to assess the kinetics of phosphorylation. Phosphorylation of Ser-324/5 rapidly increased peaking at ~4-fold over basal

within 5-10 min and returned to near basal levels within 60 min (Figure 3B). Furthermore, the increase in pS324/5 immuno-reactivity paralleled the observed reduction in electrophoretic mobility of CXCR4 following stimulation with CXCL12 (Figures 1D and 3B).

CXCR4, like other chemokine receptors, primarily couples to the Gi family of heterotrimeric G proteins (1). In order to determine if G protein activation was involved in receptor phosphorylation, cells were pretreated with pertussis toxin prior to CXCL12 stimulation. Pertussis toxin pretreatment significantly attenuated both the rate and extent of Ser-324/5 phosphorylation (Figure 3C). This suggests the possibility that activation of second messenger dependent kinases such as PKC are largely responsible for phosphorylation of these residues. Indeed, the primary amino acid sequence of CXCR4 reveals that both Ser-324 and Ser-325 fall within a PKC consensus motif (RGSSLK). To initially address the role of PKC in agonist-promoted phosphorylation of Ser-324/5, cells were pretreated with the broad-spectrum PKC inhibitor Bisindolylmaleimide I [Bis I] or the negative control Bisindolylmaleimide V [Bis V] (30) prior to CXCL12 stimulation. Bis I treatment led to a significant reduction in basal phosphorylation as well as CXCL12-promoted phosphorylation of Ser-324/5 (Figure 4A).

Since Bis I inhibits conventional and novel PKC isoforms, we attempted to better define the PKC subtype(s) involved in Ser-324/5 phosphorylation by pretreating cells with either Gö 6976, which inhibits the conventional PKC isoforms (α, β_I, and β_{II}) (31) or rottlerin, which is reported to inhibit PKCδ (32). Treatment with rottlerin, but not with Gö 6976, led to a significant reduction of Ser-324/5 phosphorylation (Figure 4B). However, since rottlerin can have off-target effects (33), we attempted to confirm the role of PKCδ in CXCR4 phosphorylation using siRNA treatment. PKCδ levels could be effectively reduced in Flag CXCR4 cells by siRNA treatment and this resulted in a partial decrease in Ser-324/5 phosphorylation (Figure 4C). In contrast, knock down of PKCα had no effect on Ser-324/5 phosphorylation (Figure 4C). Taken together, these data demonstrate that PKC plays a major role in phosphorylating Ser-324/5 following CXCL12 stimulation. The significant effect of Bis I pretreatment coupled with the fact that knock down of PKCδ only partially decreased phosphorylation, suggests that PKCδ as well as additional PKC isoforms likely mediate CXCR4 phosphorylation.

GRK6 contributes to Ser-324/5 phosphorylation. As some phosphorylation of Ser-324/5 is still evident following pertussis toxin treatment or PKC inhibition, we hypothesized that GRKs also contribute to phosphorylation of these residues. The GRKs consist of seven members, four of which (GRK2, 3, 5, and 6) are expressed in HEK293 cells (25,34). Since there are no specific GRK inhibitors available, we assessed the effect of individual GRK knock down on Ser-324/5 phosphorylation. While efficient and specific knock down of each of the individual GRKs expressed in HEK293 cells was achieved (Figure 5A), only GRK6 knock down had a significant effect on Ser-324/5 phosphorylation (Figure 5B). Since our results suggest that both GRK6 and PKC contribute to Ser-324/5 phosphorylation, we also evaluated the effect of PKC inhibition and GRK6 knock down. While PKC inhibition or GRK6 knock down alone resulted in an ~50% or ~40% reduction in phosphorylation, respectively, the combination resulted in an almost complete loss of Ser-324/5 phosphorylation (Figure 5C). These data demonstrate that both PKC and GRK6 are needed for maximal agonist-promoted phosphorylation of Ser-324/5 following CXCL12 stimulation.

Ser-330 and Ser-339 are phosphorylated by GRK6. Previous studies have demonstrated a prominent role of Ser-330 in regulating CXCL12-promoted degradation (17) while Ser-339 contributes to receptor internalization (15, 16). Although a peptide containing Ser-330 was not observed in our mass spectrometry analysis, we generated and characterized a phospho-specific antibody to this site. In addition, a phospho-specific antibody has been generated against Ser-339 (35) and phosphorylation within this region was also detected by mass spectrometry (Figure 2D). As shown in Figure 6A, both Ser-330 and Ser-339 undergo agonist-promoted phosphorylation, albeit with different kinetics. Phosphorylation of Ser-330 was relatively slow peaking at ~20 min, whereas phosphorylation of Ser-339 was very rapid peaking at ~2 min (Figure 6A). Interestingly, despite the kinetic differences, we found that both Ser-330 and Ser-339 were primarily phosphorylated by GRK6 (Figures 6B and C).

Overall, we found that GRK6 phosphorylates multiple sites within the C terminal tail of CXCR4 including Ser-324/5, Ser-330 and Ser-339 while GRK2, 3, and 5 do not contribute to CXCR4 phosphorylation at these sites. Additional studies demonstrate that PKC inhibition had no effect on CXCL12-promoted phosphorylation of Ser-330 and Ser-339 (data not shown),

demonstrating that phosphorylation of these residues is completely GRK6-dependent in response to CXCL12.

Protein kinase C is responsible for Ser-324/5 phosphorylation in human astrocytes. To further validate Ser-324/5 and Ser-330 as phosphorylation sites, we also examined human astroglia, normal primary cells that express CXCR4 endogenously (24). Ser-324/5 was found to be rapidly phosphorylated following CXCL12 treatment and PKC inhibition effectively attenuated phosphorylation (Figure 7A). Ser-330 was also phosphorylated in astroglia, albeit more slowly. Interestingly, PKC inhibition significantly enhanced the basal phosphorylation of Ser-330 and eliminated agonist-promoted phosphorylation (Figure 8B). These results suggest that PKC may negatively regulate the basal phosphorylation of Ser-330, possibly by regulating the activity of another protein kinase or a phosphatase. Taken together, these studies demonstrate that the kinetics of CXCR4 phosphorylation in HEK293 and astroglia are comparable and that PKC plays a major role in the agonist-dependent phosphorylation of Ser-324/5.

GRKs differentially regulate CXCR4 signaling in HEK293 cells. Phosphorylation of GPCRs is one of the earliest mechanisms of regulation, initiating the process of desensitization (9). Recent evidence suggests that differential phosphorylation of GPCRs can have specific but disparate effects on receptor regulation (24, 34, 36, 37). Since CXCR4 activation in HEK293 cells leads to calcium mobilization (Figure 1A) and activation of ERK1/2 (Figure 1B), we next evaluated the functional role of GRKs in regulating CXCR4-mediated signaling. Knock down of GRK2 or GRK6, but not GRK3 or GRK5, led to a significant increase in the peak calcium transient observed following CXCL12 stimulation of endogenous CXCR4 in HEK293 cells (Figure 8A). Interestingly, knock down of GRK2 led to an ~30% increase in ERK1/2 activation while knock down of GRK3 or GRK6 led to an ~40% reduction in ERK1/2 activation (Figures 8B and C). In contrast, inhibition of PKC by Bis I had no effect on activation of ERK1/2 following CXCL12 activation (data not shown).

We also evaluated whether the stable over-expression of CXCR4 altered GRK-mediated regulation. Similar to endogenous CXCR4, knock down of either GRK2 or GRK6 in the Flag CXCR4 cells enhanced calcium mobilization, although GRK6 had the larger effect (Figure 9A).

Similarly, knock down of GRK2 enhanced while knock down of GRK3 or GRK6 decreased activation of ERK1/2 (Figures 9B and C). Thus, stable over-expression of CXCR4 in HEK293 cells did not alter the signaling or regulation of CXCR4. Our data suggest that phosphorylation of CXCR4 by GRK6 and possibly GRK2 uncouples the receptor from activation of Gi, decreasing calcium mobilization. In contrast, GRK3 and GRK6-mediated phosphorylation of CXCR4 positively regulates activation of ERK1/2.

GRK3, but not GRK2, is selectively recruited to CXCR4 following activation. Due to the serine-rich nature of the distal C-terminal tail, we were not able to identify the specific residues phosphorylated following receptor activation. However, based on the acidic nature of the amino acid sequence of this region, we predict that either GRK2 or GRK3 promote phosphorylation of the two serines between amino acids 346 and 352 (Figure 2) (10). Therefore, we next determined if either GRK2 or GRK3 are selectively recruited to CXCR4 following receptor action by co-immunoprecipitation. Endogenous GRK3 was robustly recruited to CXCR4 following SDF stimulation while no association was detected for GRK2 (Supplemental Figure 1). This shows that GRK3 is specifically recruited to CXCR4 and suggests that GRK3 likely mediates the phosphorylation of the two serines between amino acids 346 and 352.

Arrestins differentially regulate signaling following CXCR4 activation. Agonist-dependent phosphorylation of many GPCRs leads to the recruitment of the non-visual arrestins, arrestin2 and arrestin3 (also termed β-arrestin1 and β-arrestin2, respectively), which effectively uncouples the receptor from heterotrimeric G proteins as well as targeting the receptor for internalization (13). Recent evidence has highlighted the ability of arrestins to nucleate signaling events in addition to their classical role in desensitization (12). Therefore, we next examined the effect of siRNA-mediated knock down of arrestin2 and 3 on CXCR4 signaling in HEK293 cells. Knock down of arrestin3 led to a significant increase, whereas arrestin 2 had only a modest effect, in the peak calcium transient observed following CXCL12 stimulation of endogenous (Figure 10A) or overexpressed CXCR4 (Figure 10B). Conversely, knock down of arrestin2 led to a significant reduction in ERK1/2 activation following CXCL12 stimulation of endogenous (Figure 10C) or overexpressed (Figure 10D) CXCR4, while knock down of arrestin3 had lesser

effects. These results reveal that both arrestins contribute to regulating CXCR4 signaling although arrestin3 appears to play the primary role in desensitization of calcium mobilization while arrestin2 plays the primary role in activation of ERK1/2 signaling.

Site-specific phosphorylation of CXCR4 differentially regulates the arrestin recruitment. The observed decrease in ERK activation following GRK3 or GRK6 knock down could arise from either the inability to form a stable CXCR4-arrestin2 complex (38, 39) or an altered conformation of arrestin2 (34, 36) that does not allow for full activation of ERK1/2. To distinguish between these possibilities and further delineate the functional role of site-specific phosphorylation of CXCR4 in arrestin binding, we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) studies between luciferase-tagged CXCR4 and GFP-tagged arrestin2 and 3.

SDF stimulation results in a time-dependent increase in the BRET ratio observed between CXCR4 and arrestin2 (Figure 11A) or arrestin3 (Figure 11B). Interestingly, mutation of the last five serine residues in CXCR4 (5A Tail), to mimic loss of GRK3-mediated phosphorylation, abolished the recruitment of arrestin2 (Figure 11C) and significantly attenuated arrestin3 recruitment (Figure 11D). In striking contrast, mutation of the GRK6 sites in CXCR4 (Ser324/5, Ser330, and Ser339; GRK6SA) resulted in an apparent increase in the BRET ratio observed between CXCR4 and arrestin2 or 3 (Figures 11C and D). This suggests that phosphorylation of the GRK6 sites either inhibits arrestin binding to CXCR4 or, more likely, promotes a conformational change in arrestin when it binds to CXCR4. Taken together, these results reveal that site-specific phosphorylation of CXCR4 has distinct effects on not only the recruitment of arrestins but also and the conformation that these proteins adopt. These processes work together to dynamically modulate CXCR4-mediated signaling.

DISCUSSION

Phosphorylation and arrestin recruitment have long been appreciated as critical steps in the process of GPCR desensitization (9, 10). More recently, a newly appreciated role in initiating G protein-independent signaling pathways has emerged for both the GRKs and arrestins (40). Studies using the vasopressin and angiotensin receptors have enabled the

elucidation of a model where GRK2/3 negatively regulate arrestin-dependent signaling while GRK5/6 play a positive role in signaling (34, 36). Since these initial reports, similar phenomena have been observed for a number of GPCRs, including the β_2-adrenergic receptor and the follicle-stimulating hormone receptor (41, 42), suggesting that this model applies to many GPCRs.

Taking into consideration the large diversity of the GPCR superfamily, characterizing the mechanisms involved in receptor regulation under "normal" physiological conditions will add significantly to our understanding of receptor signaling as well as receptor dysregulation in disease. CXCR4 has emerged as a prominent GPCR due to its reported role in cancer progression and metastasis (4) and recent studies have provided evidence for the dysregulation of CXCR4 in cancer cells (43, 44). Given the wealth of knowledge on the role of CXCR4-mediated signaling in cancer (45), it is surprising that the regulation of CXCR4 function is not better understood. In this report, we characterize site-specific phosphorylation of CXCR4 and provide evidence that kinase-specific phosphorylation has distinct effects on CXCR4 signaling.

With few exceptions, the specific sites and functional role of GPCR phosphorylation is largely unknown. In order to determine the functional role of site-specific phosphorylation, the sites phosphorylated and the kinases involved need to be identified. Since mutagenesis and metabolic labeling studies have suggested that multiple regions of the C terminal tail of CXCR4 may be phosphorylated (16), we used mass spectrometry and phospho-specific antibodies to define specific sites of phosphorylation. Using these approaches we found that CXCL12 promotes the phosphorylation of 7 serines in the C terminal tail (Figure 2D), although we cannot rule out the presence of additional sites. We confirmed previous studies suggesting that Ser-324 and Ser-325 are phosphorylated (15, 16) as well as one study showing that Ser-339 is phosphorylated (35) (Figure 3C and D). In addition, we found that Ser-321 is phosphorylated, a site that has not been previously implicated in CXCR4 regulation. Finally, we demonstrated that Ser-330 is also phosphorylated in response to CXCL12 (Figure 6A).

Phospho-specific antibodies have provided a powerful tool to enable characterization of phosphorylation kinetics for a number of GPCRs (46-48). Here, we successfully used phospho-specific antibodies against Ser-324/5, Ser-330 and Ser-339 and found that phosphorylation at these sites occurs with disparate kinetics, peaking at 5-10 min, ~20 min, and ~2 min following

CXCL12 stimulation, respectively. Based on these results, we hypothesize that phosphorylation at these sites would have distinct effects on desensitization, signaling, and/or trafficking following CXCR4 activation. In this regard, previous studies have suggested that Ser-324/5 and Ser-330 play an important role in CXCR4 degradation (17) while CXCR4 recycles to the plasma membrane with varying efficiencies in different cell lines (49-52). These findings suggest cell type differences in Ser-324/5 or Ser-330 phosphorylation may regulate differential CXCR4 sorting. These phospho-specific antibodies should enable a more in-depth analysis of CXCR4 phosphorylation in various tissues and cells.

To address if site-specific phosphorylation can differentially dictate the regulation of CXCR4 signaling, we evaluated the role of site- and kinase-specific phosphorylation in CXCR4-mediated signaling. We provide novel evidence for PKC in selectively phosphorylating Ser-324/5 following CXCL12 stimulation in HEK293 cells and human astroglia (Figures 4 and 7) with no effect on Ser-330 or Ser-339 in HEK293 cells (data not shown). Previously, PKC has been thought to be primarily involved in heterologous desensitization of CXCR4, downstream of a number of receptors (1). Interestingly, Ser-324 and Ser-325 have been shown to play a prominent role in PKC-mediated internalization of CXCR4 (15, 16), although there have been conflicting reports for the role of these residues in CXCL12-mediated internalization. For example, mutation of Ser-324/5 to alanine had no effect on internalization in Mv-1-Lu cells (15) but effectively attenuated internalization in HEK293 cells (16). Since Ser-324/5 is robustly phosphorylated following CXCL12 stimulation in HEK293 cells, cell type dependent differences in trafficking may be attributed to differences in phosphorylation or in subsequent protein/protein interactions. Despite this robust phosphorylation, PKC inhibition had no effect on CXCR4 activation of ERK1/2 (data not shown). Based on the critical role of Ser-324/5 in receptor degradation (17), it is reasonable to hypothesize that PKC-mediated phosphorylation drives receptor degradation. In fact, phosphorylation of these residues is required for the interaction of AIP4 with CXCR4 and subsequent ubiquitination (53).

We have found that GRK6 accounts for the majority of CXCR4 phosphorylation, contributing to Ser-324/5 phosphorylation and being principally responsible for Ser-330 and Ser-339 phosphorylation (Figures 5 and 6). While no GRK-specific phosphorylation motifs have been identified, GRK2 and 3 prefer acidic residues N terminal to the phosphorylation site while GRK5 and 6 prefer basic residues (10). Consistent with our GRK6 results, there are basic

residues located N terminally to Ser-324/5, Ser-330 and Ser-339 (Figure 2D). Previous studies have shown that the deletion of GRK6 in a mouse had marked effects on the activity of CXCR4, leading to enhanced function and a lack of desensitization (21, 22). Surprisingly, loss of GRK6 had different effects on CXCL12-mediated chemotaxis in neutrophils and T cells, suggesting that the regulation of CXCR4 function by phosphorylation may be cell type dependent (21, 22). While these previous studies did not evaluate signaling, our work has shown that loss of GRK6 significantly increased calcium mobilization while reducing ERK1/2 activation. Finally, mutation of the identified GRK6 phosphorylation sites to alanine resulted in an apparent increase in arrestin recruitment (Figure 11C and D). However, as BRET is dependent on the proximity of the donor and acceptor tags (53) and there was no change in the timing of arrestin recruitment (Figure 11), we propose that loss of GRK6 results in arrestin2 and 3 adopting a conformation that is unable to effectively serve as a platform for ERK activation.

Two residues at the extreme C terminus of CXCR4 (one between Ser-346-348 and either Ser-351 or Ser-352) are also phosphorylated in response to CXCL12 stimulation (Figure 2D). Based on the acidotropic nature of these serines, we postulated that these residues are phosphorylated by GRK2 and/or GRK3 (Figure 2D). Accordingly, we have found that GRK3 is specifically recruited to CXCR4 following receptor activation (Supplemental Figure 1). Interestingly, recent studies suggest that GRK3 phosphorylates the far C-terminal region of CXCR4 (20). Over-expression of GRK3 enhanced internalization of wild type CXCR4 but not a C-terminally truncated CXCR4 lacking the last 15 amino acids (which contains 10 serines and threonines). Since previous work has demonstrated that Ser-338 is not phosphorylated in response to CXCL12 (35) and we have shown that Ser-339 is phosphorylated by GRK6 (Figure 6C), these effects could be explained by GRK3-mediated phosphorylation of these far C-terminal residues in response to CXCL12 stimulation. Interestingly, knock down of GRK3 had no effect on calcium mobilization but significantly decreased ERK1/2 activation (Figures 8 and 9). Mutation of the last five serine residues to alanine decreased, but did not eliminate, arrestin3 recruitment to CXCR4 suggesting this was sufficient for receptor desensitization. However, GRK3-mediated phosphorylation of C-terminal residues acts in concert with GRK6-mediated phosphorylation to participate in ERK1/2 activation through altering the conformation of activated arrestin (Figure 11).

Interestingly, we found that GRK2 negatively regulates CXCR4-mediated activation of both calcium flux and ERK1/2 (Figures 8 and 9). Previous over-expression studies showed that GRK2 enhances CXCR4 internalization (16, 18) and negatively regulates CXCL12-mediated ERK activation downstream of the receptor in HEK293 cells, possibly through interaction with MEK (19). Based on the fact that we did not see GRK2 association with CXCR4, we hypothesize that the observed effects of GRK2 knock down occur downstream of receptor activation. This could include interaction with free Gβγ (55, 56), resulting in inhibition of Gβγ-mediated activation of PLC-β (57) and the observed increase in calcium mobilization when GRK2 levels are reduced. In addition, GRK2 inhibition of MEK would result in enhanced ERK1/2 activation when GRK2 levels are reduced (19).

The positive role of GRK3 and GRK6 on ERK1/2 activation prompted us to evaluate the role of arrestins in CXCR4 signaling. Previous studies have suggested that arrestin3 is involved in desensitization, internalization, and activation of p38 and ERK1/2 (16, 18, 21, 58) whereas arrestin2 is involved in sorting CXCR4 to the lysosomes for degradation (59). Similar to studies on the angiotensin and vasopressin receptors (31, 60), we found that arrestin2 and arrestin3 have different effects on CXCR4 signaling. Our results suggest that arrestin3 plays a primary role in desensitizing G protein activation (i.e., inhibiting calcium mobilization), a pathway that appears partially dependent on GRK6 phosphorylation of CXCR4. Conversely, arrestin2 plays a positive role in ERK1/2 activation and appears to require phosphorylation of the receptor by both GRK3 and GRK6. This pattern of arrestin-mediated activation of ERK1/2 is somewhat unique since most GPCRs either require both arrestins (12) or arrestin3 (34, 60) for ERK activation although there is one report that PAR1 selectively utilizes arrestin2 (61). This is the first demonstration that GRK2/3 and GRK5/6 cooperate in terms of signaling. However, in line with previous reports (62), our results also suggest that GRK3 and GRK6-mediated phosphorylation of CXCR4 are required for the strong recruitment of arrestin3 to the receptor.

In summary, our results support a model where GRK3 and GRK6-mediated phosphorylation leads to recruitment of arrestin3 (Figure 12B). This serves to uncouple CXCR4 from activation of Gi thereby regulating calcium release. In contrast, the GRK3- and GRK6-mediated phosphorylation of CXCR4 promotes interaction with arrestin2 and results in full activation of ERK1/2 (Figure 12C). GRK2, on the other hand, likely attenuates calcium release

and activation of ERK1/2 through its interaction with Gβγ and MEK, respectively (Figure 12B). These results provide a foundation to better understand how CXCR4 is regulated and identify distinct regulatory molecules that can be targeted to modulate CXCR4 signaling in disease.

REFERENCES

Busillo, J.M. and Benovic, J.L. (2007) *Biochim Biophys Acta* 1768, 952-963

Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E. and Diaz, G.A. (2003) *Nat Genet* 34, 70-74.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. and Berger, E.A. (1996) *Science* 272, 872-877.

Zlotnik, A. (2006) *Contrib Microbiol* 13, 191-199.

Diaz, G.A. and Gulino, A.V. (2005) *Curr Allergy Asthma Rep* 5, 350-355.

Balkwill, F. (2004) *Semin Cancer Biol* 14, 171-179.

Cohen, P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci* 17, 408-413.

Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) *Trends Biochem Sci* 27, 514-520.

Krupnick, J.G. and Benovic, J.L. (1998) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.

Pitcher, J.A., Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J. (1998) *Annu Rev Biochem* 67, 653-692.

Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (2004) *Annu Rev Neurosci* 27, 107-144.

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

Moore, C.A., Milano, S.K. and Benovic, J.L. (2007) *Annu Rev Physiol* 69, 451-482.

Tobin, A.B., Butcher, A.J. and Kong, K.C. (2008) *Trends Pharmacol Sci* 29, 413-420.

Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A. and Marsh, M. (1998) *J Cell Sci* 111 (Pt 18), 2819-2830.

Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A., and Benovic, J.L. (1999) *J Biol Chem* 274, 31076-31086.

Marchese, A. and Benovic, J.L. (2001) *J Biol Chem* 276, 45509-45512

Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X. and Pei, G. (2000) *J Biol Chem* 275, 2479-2485.

Jimenez-Sainz, M.C., Murga, C., Kavelaars, A., Jurado-Pueyo, M., Krakstad, B.F., Heijnen, C.J., Mayor, F., Jr. and Aragay, A.M. (2006) *Mol Biol Cell* 17, 25-31.

Balabanian, K., Levoye, A., Klemm, L., Lagane, B., Hermine, O., Harriague, J., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F. and Bachelerie, F. (2008) *J Clin Invest* 118, 1074-1084.

Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J. and Patel, D.D. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7478-7483.

Vroon, A., Heijnen, C.J., Raatgever, R., Touw, I.P., Ploemacher, R.E., Premont, R.T. and Kavelaars, A. (2004) *J Leukoc Biol* 75, 698-704.

Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P.J., Tran, T., Brass, L.F., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M.A., Wells, T.N., Hoxie, J.A. and Marsh, M. (1997) *J Cell Biol* 139, 651-664.

Khan, M.Z., Brandimarti, R., Patel, J.P., Huynh, N., Wang, J., Huang, Z., Fatatis, A., and Meucci, O. (2004) *AIDS Research and Human Retroviruses* 20, 1063-71.

Luo, J., Busillo, J.M. and Benovic, J.L. (2008) *Mol Pharmacol* 74, 338-347.

Oliva, J.L., Caino, M.C., Senderowicz, A.M. and Kazanietz, M.G. (2008) *J Biol Chem* 283, 5466-5476.

Trester-Zedlitz, M., Burlingame, A., Kobilka, B. and von Zastrow, M. (2005) *Biochemistry* 44, 6133-6143.

Haribabu, B., Richardson, R.M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S.C., Horuk, R., Ali, H. and Snyderman, R. (1997) *J Biol Chem* 272, 28726-28731.

Carr, S.A., Annan, R.S. and Huddleston, M.J. (2005) *Methods Enzymol* 405, 82-115.

Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. and et al. (1991) *J Biol Chem* 266, 15771-15781.

Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D. and Schachtele, C. (1993) *J Biol Chem* 268, 9194-9197.

Gschwendt, M., Muller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. and Marks, F. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* 199, 93-98.

Soltoff, S.P. (2007) *Trends Pharmacol Sci* 28, 453-458.

Ren, X.R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W. and Lefkowitz, R.J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1448-1453.

Woerner, B.M., Warrington, N.M., Kung, A.L., Perry, A. and Rubin, J.B. (2005) *Cancer Res* 65, 11392-11399.

Kim, J., Ahn, S., Ren, X.R., Whalen, E.J., Reiter, E., Wei, H. and Lefkowitz, R.J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1442-1447.

Torrecilla, I., Spragg, E.J., Poulin, B., McWilliams, P.J., Mistry, S.C., Blaukat, A., and Tobin, A.B. (2007) *J Cell Biol* 177, 127-137.

Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Luttrell, L.M. (2003) *J Biol Chem* 278, 6258-6267.

Jafri, F., El-Shewy, H.M., Lee, M.H., Kelly, M., Luttrell, D.K. and Luttrell, L.M. (2006) *J Biol Chem* 281, 19346-19357.

Reiter, E. and Lefkowitz. R.J. (2006) *Trends Endocrinol Metab* 17, 159-165

Shenoy, S.K., Drate, M.T., Nelson, C.D., Houtz, D.A., Xiao, K., Madabushi, S., Retier, E., Premont, R.T., Lichtarge, O., and Lefkowitz, R.J. (2006) *J Biol Chem* 281, 1261-1273

Kara E., Crépieux, P., Gauthier, C., Martinat N., Piketty, V., Guillou, F., and Reiter E. (2006) *Mol Endocrinol* 20, 3014-3026

Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D. and Hung, M.C. (2004) *Cancer Cell* 6, 459-469.

Slagsvold, T., Marchese, A., Brech, A. and Stenmark, H. (2006) *Embo J* 25, 3738-3749.

Kucia, M., Reca, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J. and Ratajczak, M.Z. (2005) *Stem Cells* 23, 879-894.

Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V.K. and Oppermann, M. (2003) *J Biol Chem* 278, 2190-2198.

Schulz, S., Mayer, D., Pfeiffer, M., Stumm, R., Koch, T. and Hollt, V. (2004) *Embo J* 23, 3282-3289.

Tran, T.M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R.H. and Clark, R.B. (2004) *Mol Pharmacol* 65, 196-206.

Amara, A., Gall, S.L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J.L. and Arenzana-Seisdedos, F. (1997) *J Exp Med* 186, 139-146.

Tarasova, N.I., Stauber, R.H. and Michejda, C.J. (1998) Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273, 15883-15886.

Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H. and Benovic, J.L. (2003) *Dev Cell* 5, 709-722.

Venkatesan, S., Rose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M. and Foley, J.F. (2003) *Mol Biol Cell* 14, 3305-3324.

Bhandari, D., Robia, S.L., and Marchese A. (2009) *Mol Biol Cell* 20, 1324-1329.

Pfleger, K.D., Dalrymple M.B., Dromey J.R., and Eidne K.A. (2007) *Biochem Soc Trans.* 35 (Pt 4): 764-766.

Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1992) *Science* 257, 1264-1267.

Carman, C.V., Barak, L.S., Chen, C., Liu-Chen, L.Y., Onorato, J.J., Kennedy, S.P., Caron, M.G. and Benovic, J.L. (2000) *J Biol Chem* 275, 10443-10452.

Camps, M., Hou, C., Sidiropoulos, D., Stock, J.B., Jakobs, K.H. and Gierschik, P. (1992) *Eur J Biochem* 206, 821-831.

Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L. and Pei, G. (2002) *J Biol Chem* 277, 49212-49219.

Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J.L. and Marchese, A. (2007) *J Biol Chem* 282, 36971-36979.

Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2004) *J Biol Chem* 279, 35518-35525.

Kuo, F.T., Lu, T.L., and Fu, H.W. (2006) *Cell Signal* 18, 1914-1923.

Violin, J.D., Ren, X.R., and Lefkowitz, R.J. (2006) *J Biol Chem* 281, 20577-20588.

FOOTNOTES

This work was supported in part by National Institutes of Health grants GM44944, GM47417 and CA129626 to JLB, DA15014 and DA19808 to OM and by Pennsylvania Department of Health Grant AB-0301. JMB was supported in part by a predoctoral fellowship from the American Heart Association. We would like to thank Drs. Nicholas Sherman and Kristina T. Nelson from the W.M. Keck Biomedical Mass Spectrometry Laboratory and the University of Virginia Biomedical Research Facility for helpful discussions and mass spectrometric analysis of CXCR4. The W.M. Keck Biomedical Mass Spectrometry Laboratory and The University of Virginia Biomedical Research Facility are funded by a grant from the University of Virginia Pratt Committee. We also thank Dr. Joshua Rubin for kindly providing the antibody specific for phosphoSer-339, Dr. Jiansong Luo for help with some of the calcium imaging studies, and Dr. Marcelo Kazanietz for discussion and reagents for knock down of PKC expression.

The abbreviations used are: BRET, bioluminescence resonance energy transfer; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; GRK, GPCR kinase; LC/MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; PKC, protein kinase C.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Establishing and characterizing HEK293 cells that stably express CXCR4. A) HEK293 cells or cells stably expressing Flag CXCR4 (Flag CXCR4 cells) were loaded with the ratiometric calcium indicator Fura-2/AM prior to stimulation with CXCL12 (100 nM). The change in intracellular calcium was calculated by monitoring the change in fluorescence of Fura-2/AM. Shown is a representative trace of calcium mobilization from three independent experiments. B) Following a 6 hr serum starvation, HEK293 cells or Flag CXCR4 cells were stimulated with CXCL12 for the times indicated. Shown in a representative Western blot from three independent experiments. CXCL12-promoted retardation of electrophoretic mobility of endogenous CXCR4 (C) or Flag tagged CXCR4 (D). Following a 6 hr serum starvation, cells were stimulated with 100 nM CXCL12 for the indicated time. Crude membranes were prepared and 50 μg of solubilized protein (endogenous) or equal volume of whole cell lysate (Flag CXCR4) was separated by 10% SDS-PAGE. Shown is a representative Western blot from four independent experiments.

Figure 1

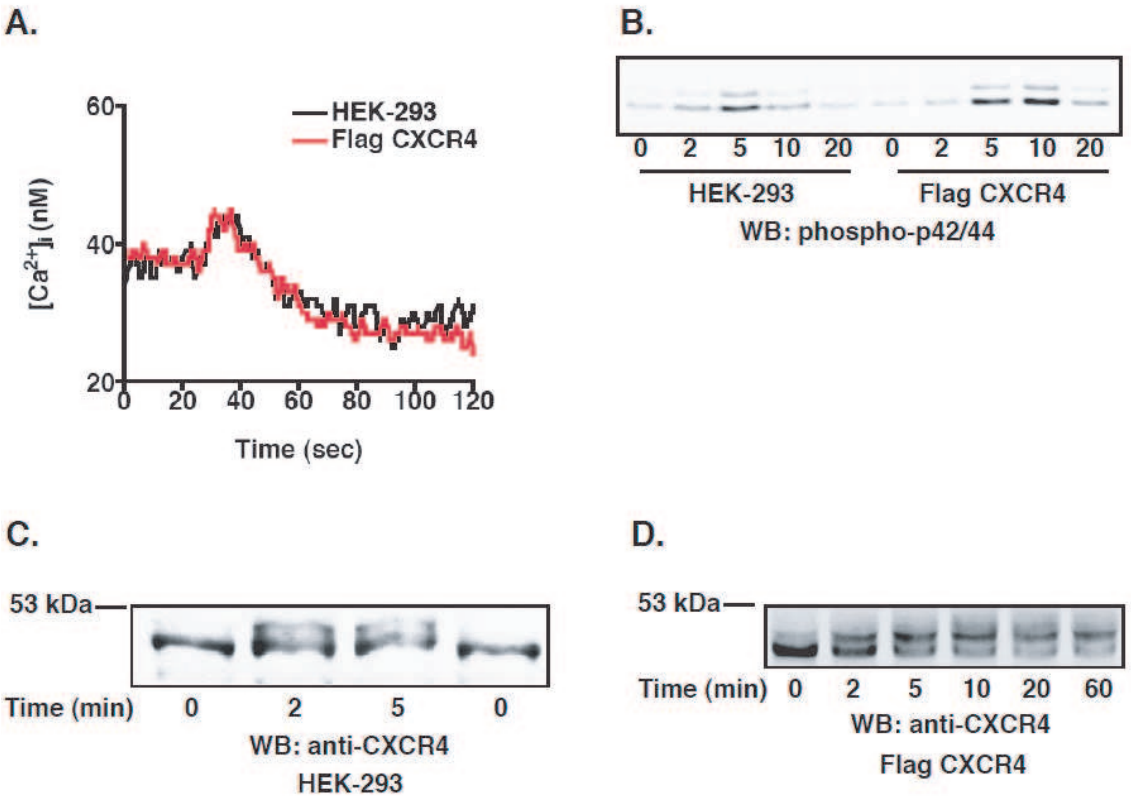

A.
60
40
20
HEK-293
Flag CXCR4
[Ca2+]i (nM)
0 20 40 60 80 100 120
Time (sec)
B.
0 2 5 10 20 0 2 5 10 20
HEK-293
Flag CXCR4
WB: phospho-p42/44
C.
53 kDa
Time (min) 0 2 5 0
WB: anti-CXCR4
HEK-293
D.
53 kDa
Time (min) 0 2 5 10 20 60
WB: anti-CXCR4
Flag CXCR4

Figure 2. Purification and mass spectrometry analysis of CXCR4. A) Flag CXCR4 was purified from five 15-cm plates following a 10 min stimulation with 50 nM CXCL12. The bulk of the receptor (~80%) elutes in fractions 2 and 3 and is highly purified as shown by Coomassie blue staining (B). C) Shown is a representative mass spectrum of the peptide Thr-318 to Leu-328 following a chymotrypsin digest demonstrating that CXCR4 is phosphorylated on Ser-324 and Ser-325. D) Amino acid sequence of the C terminal tail of CXCR4. Residues highlighted in red are those that are predicted to be phosphorylated by mass spectrometry. Brackets under Ser-338-Ser-341, Ser-346-Ser-348, and Ser-351/Ser-352 indicate that one residue in each cluster is phosphorylated, though the exact residue was not identified by mass spectrometry.

Figure 2

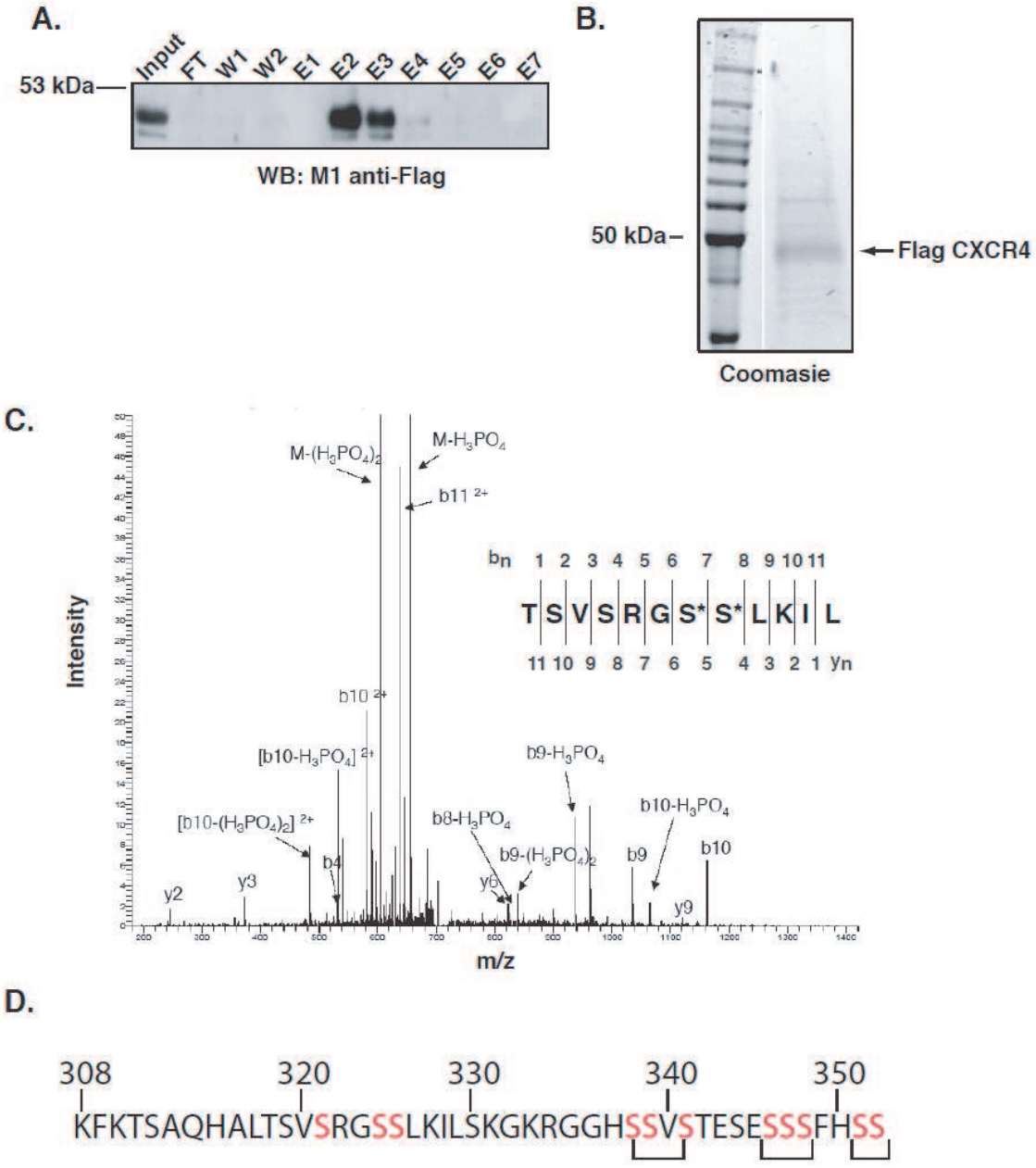

A.
53 kDa
Input
FT
W1
W2
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
WB: M1 anti-Flag
B.
50 kDa
Flag CXCR4
Coomasie
C.
Intensity
m/z
M-(H3PO4)2
M-H3PO4
b11 2+
bn 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
T S V S R G S* S* L K I L
11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 yn
b10 2+
[b10-H3PO4] 2+
b9-H3PO4
[b10-(H3PO4)2] 2+
b8-H3PO4
b10-H3PO4
b9-(H3PO4)2
b9
b10
b4
y6
y2
y3
y9
D.
308
320
330
340
350
KFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSFHSS

Figure 3. Characterization and pertussis toxin sensitivity of anti-pSer-324/5 (pS324/5). A) Shown is a representative Western blot demonstrating the specificity of the pS324/5 antibody. 10 μg of purified antibody was incubated for 10 min with vehicle (PBS), 10 μg of peptide (C-Ahx-RGSSLKIL) or 10 μg of phospho-peptide (C-Ahx-RG(pS)(pS)LKIL) prior to overnight incubation with the nitrocellulose blots. B) Cells stably expressing Flag CXCR4 were stimulated at the time points indicated with 100 nM CXCL12. Lysates were processed and separated to visualize the agonist promoted gel shift of CXCR4. Blots were incubated overnight with 1:1000 dilution of crude pS324/5 antibody. pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as fold increase over basal (± S.E.M., n=4). C) Cells stably expressing Flag CXCR4 were treated overnight with vehicle (PBS) or pertussis toxin (100 ng/ml) prior to stimulation with 100 nM CXCL12. Left panel: representative Western blot using purified anti-pS324/5. Right panel: pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as percent maximum of vehicle treated cells (± S.E.M., n=3; *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$).

Figure 3

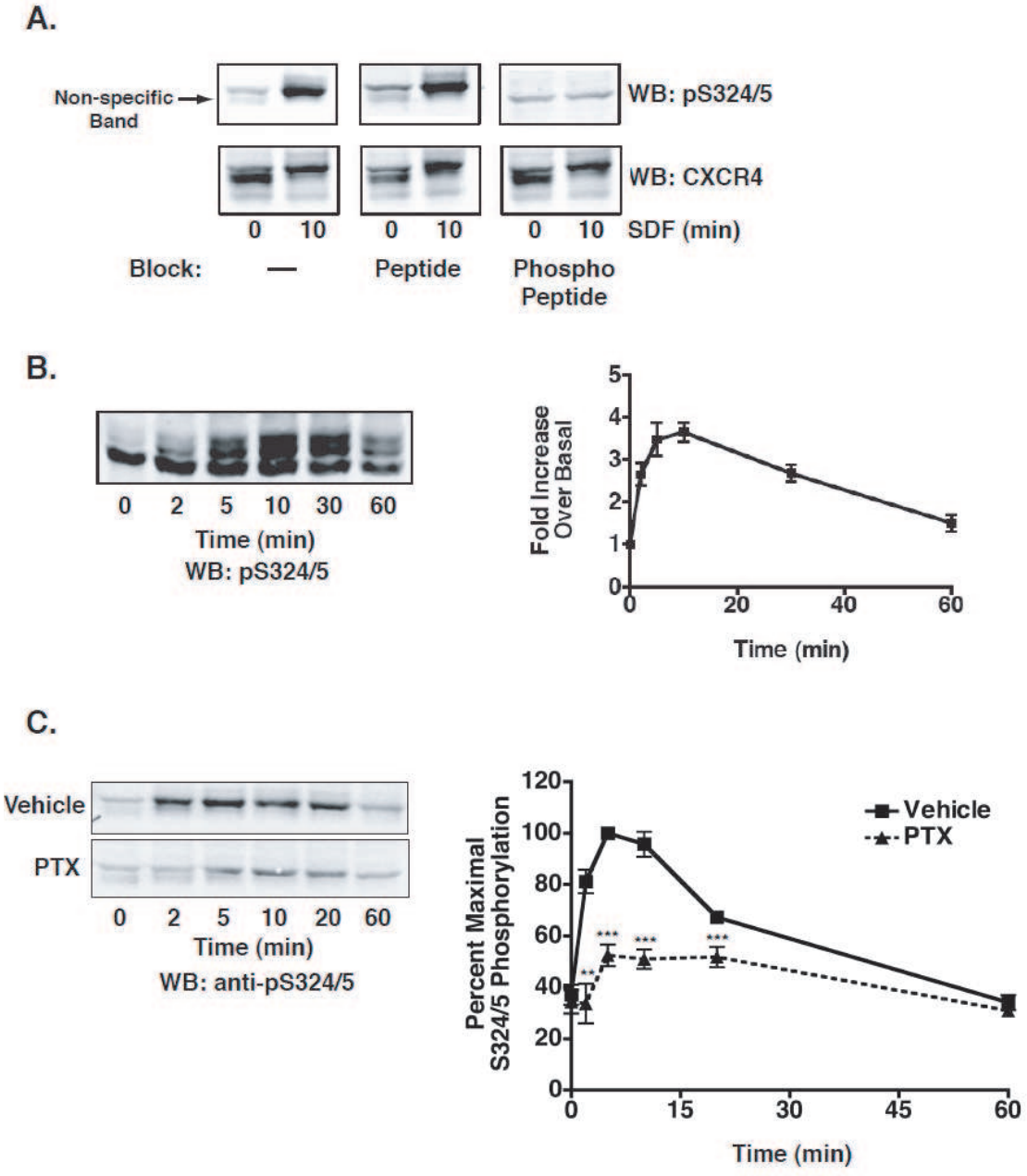

A.
Non-specific Band
WB: pS324/5
WB: CXCR4
0 10 0 10 0 10 SDF (min)
Block: — Peptide Phospho Peptide
B.
0 2 5 10 30 60
Time (min)
WB: pS324/5
Fold Increase Over Basal
Time (min)
C.
Vehicle
PTX
0 2 5 10 20 60
Time (min)
WB: anti-pS324/5
Percent Maximal S324/5 Phosphorylation
Vehicle
PTX
Time (min)

Figure 4. PKC is primarily responsible for Ser-324/5 phosphorylation following CXCL12 stimulation. A) Cells stably expressing Flag CXCR4 were serum starved for 6 hr. 30 min prior to CXCL12 stimulation, cells were pretreated with 2.5 μM Bis I or Bis V. Left panel: representative Western blot using crude anti-pS324/5 antibody. Blots were processed as to visualize the gel shift. Right panel: pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as presented as fold increase over basal (Bis V) (± S.E.M., n=4). B) To better define the PKC isoforms responsible for CXCR4 phosphorylation, cells were pretreated with vehicle (DMSO), 1 μM Gö 6976, or 5 μM Rottlerin for 30 min prior to stimulation with CXCL12. Left panel: Representative Western blot using purified anti-pS324/5 antibody. Right panel: pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as presented as fold increase over basal (± S.E.M., n=4). C) Cells were treated with PKC-specific siRNAs. Left panel: lysates were prepared 72 hr post-transfection and blotted for PKCα and PKCδ as indicated. Shown is representative Western blot demonstrating efficiency and specificity of PKCα and PKCδ knock down. Right panel: 72 hr post-transfection, cells were serum starved for 6 hr prior to stimulation with CXCL12 (± S.E.M., n=4; *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$).

Figure 4

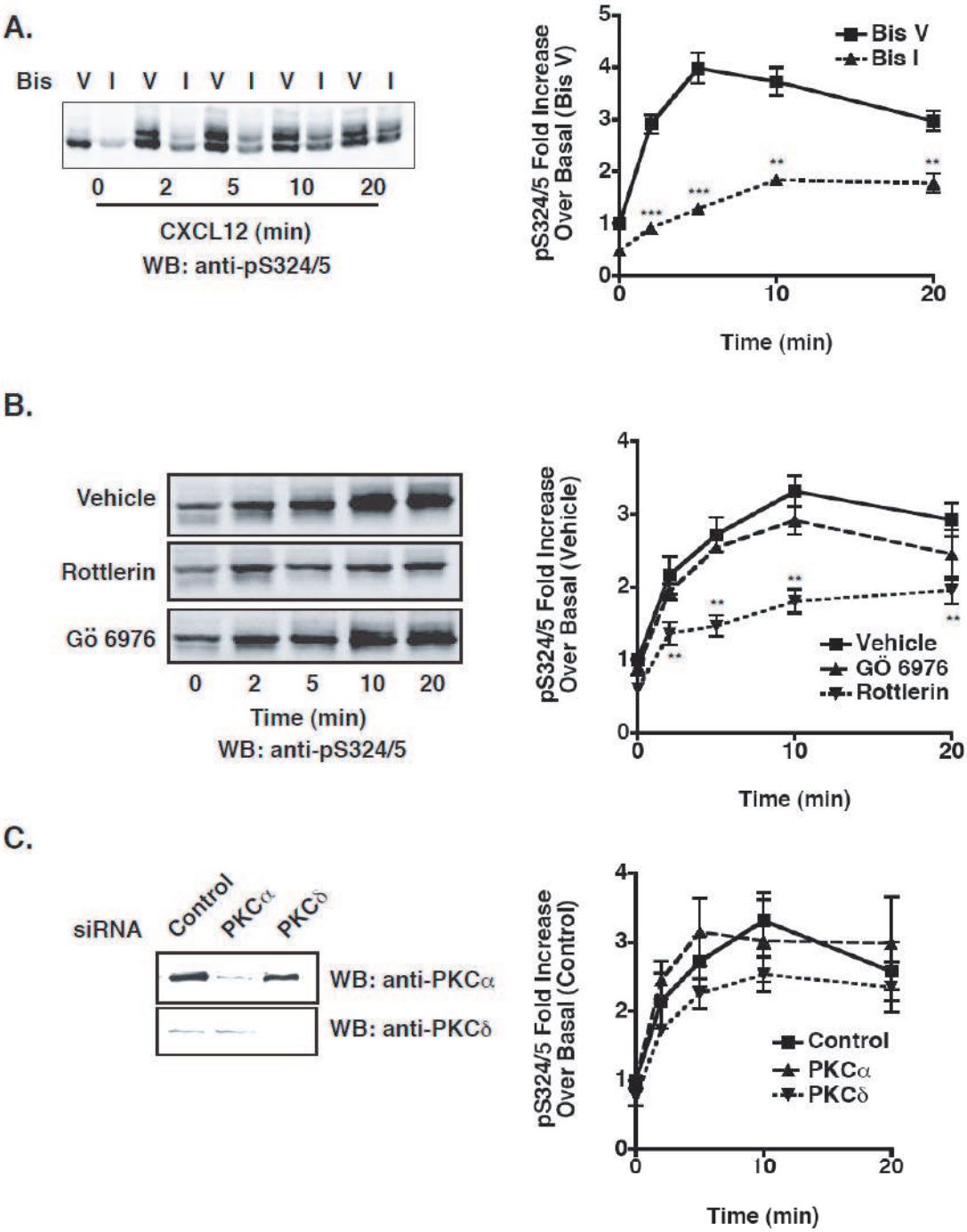

A.
Bis V I V I V I V I V I
0 2 5 10 20
CXCL12 (min)
WB: anti-pS324/5
pS324/5 Fold Increase Over Basal (Bis V)
Bis V
Bis I
Time (min)
B.
Vehicle
Rottlerin
Gö 6976
0 2 5 10 20
Time (min)
WB: anti-pS324/5
pS324/5 Fold Increase Over Basal (Vehicle)
Vehicle
GÖ 6976
Rottlerin
Time (min)
C.
siRNA
Control
PKCα
PKCδ
WB: anti-PKCα
WB: anti-PKCδ
pS324/5 Fold Increase Over Basal (Control)
Control
PKCα
PKCδ
Time (min)

Figure 5. GRK6 contributes to Ser-324/5 phosphorylation following CXCL12 stimulation. A) Representative Western blot demonstrating specific and efficient knock down of GRKs endogenously expressed in HEK293 cells 72 hr post-transfection. B) Knock down of GRK6, but not GRK2, GRK3 or GRK5 led to a significant reduction in phosphorylation of Ser-324/5. Left panel: representative Western blot using purified anti-pS324/5. Right panel: comparison of pS324/5 phosphorylation following a 5 min stimulation with CXCL12. pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as percent of control at 5 min (± S.E.M., n=4). C) GRK6 knock down and PKC inhibition almost completely abolishes phosphorylation of Ser-324/5. Cells transfected with GRK6 siRNA were pretreated with 2.5 μM Bis I or Bis V 30 min prior to stimulation with CXCL12. Left panel: representative Western blot using purified anti-pS324/5. Right panel: pS324/5 was normalized to total CXCR4 and data is presented as presented as fold increase over basal in control/Bis V treated cells (± S.E.M., n=3; *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001).

Figure 5

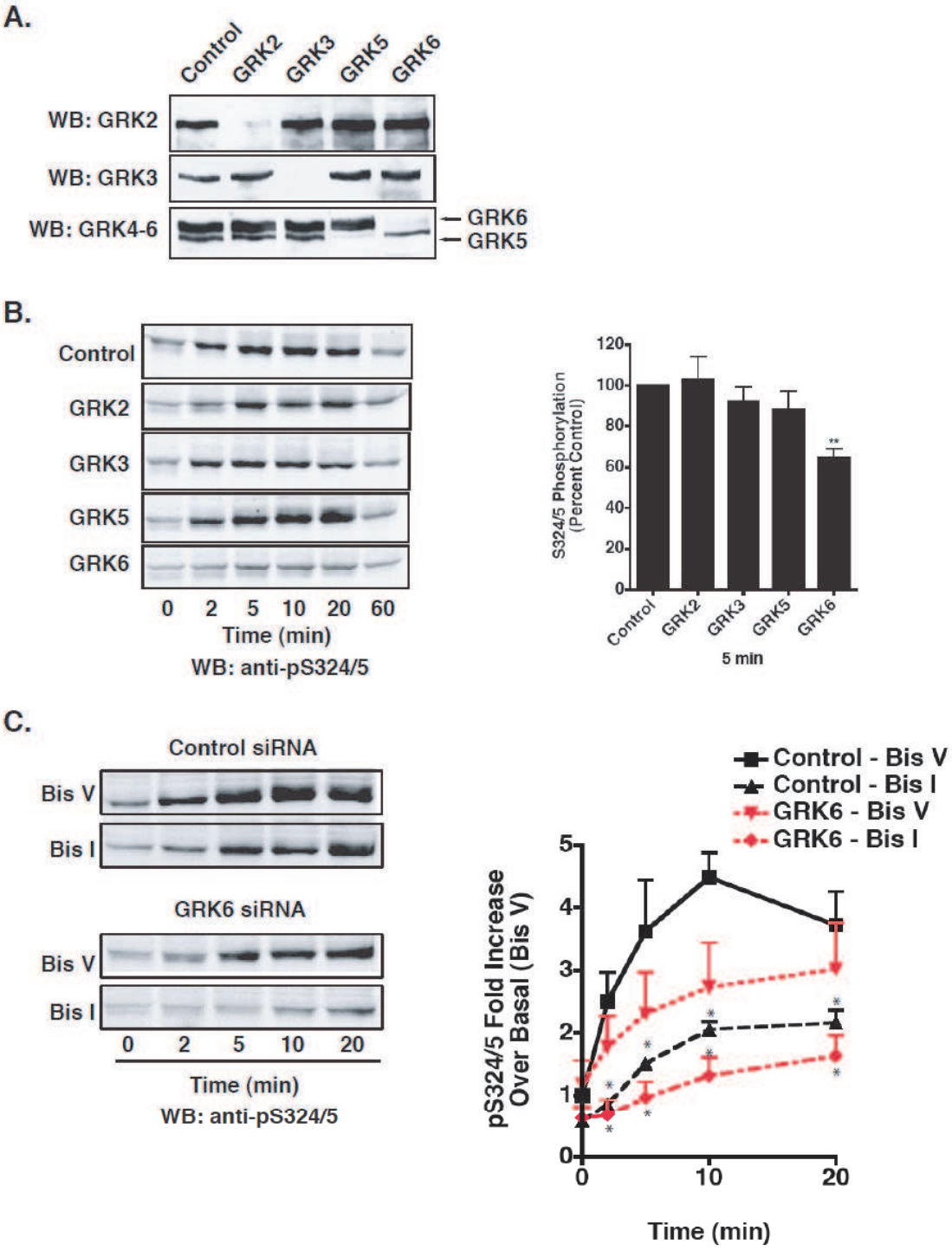

A.
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
WB: GRK2
WB: GRK3
WB: GRK4-6
GRK6
GRK5
B.
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
0 2 5 10 20 60
Time (min)
WB: anti-pS324/5
S324/5 Phosphorylation (Percent Control)
120
100
80
60
40
20
0
**
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
5 min
C.
Control siRNA
Bis V
Bis I
GRK6 siRNA
Bis V
Bis I
0 2 5 10 20
Time (min)
WB: anti-pS324/5
Control - Bis V
Control - Bis I
GRK6 - Bis V
GRK6 - Bis I
pS324/5 Fold Increase Over Basal (Bis V)
5
4
3
2
1
0
0
10
20
Time (min)

Figure 6. Ser-330 and Ser-339 are GRK6 substrates. A) Cells expressing Flag CXCR4 were serum starved for 6 hr prior to stimulation with 100 nM CXCL12 for times indicated. An equal volume of lysate was separated by SDS-PAGE and blotted with purified anti-pS330 (top left panel) or anti-pS339 (bottom left panel). pS330 blots were processed in order to visualize gel shift of CXCR4. Right panel: pS330 or pS339 blotting was normalized to total CXCR4 and data presented as fold increase over basal (± S.E.M., n=4). B) 72 hr post-transfection, an equal volume of cell lysate was separated to visualize the gel shift of CXCR4 and blotted using purified anti-pS330. Shown are representative Western blots of four separate experiments. C) 72 hr post-transfection, an equal volume of cell lysate was separated by SDS-PAGE and blotted using anti-pS339. Shown are representative Western blots from four separate experiments.

Figure 6

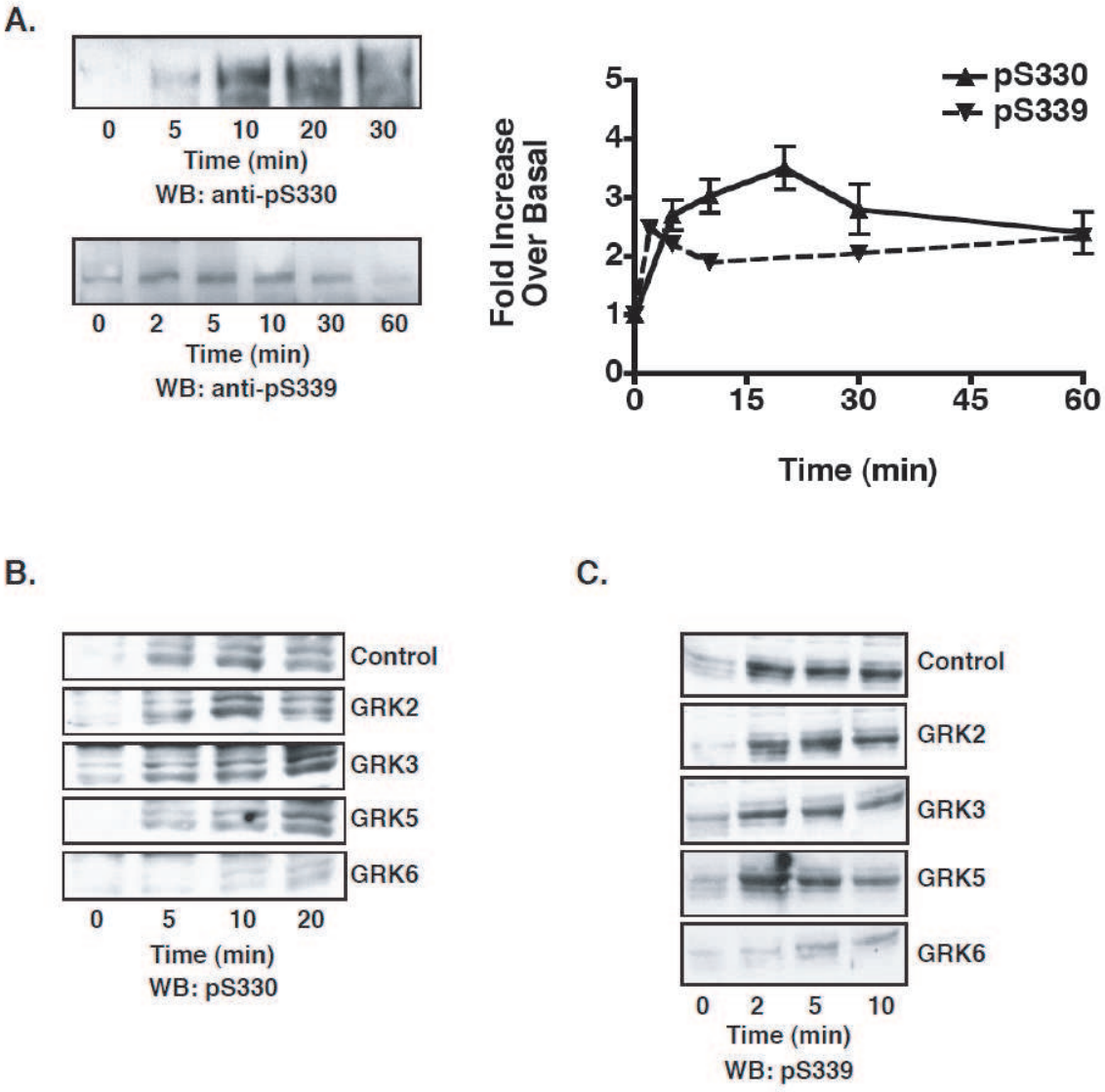

A.
0 5 10 20 30
Time (min)
WB: anti-pS330
0 2 5 10 30 60
Time (min)
WB: anti-pS339
pS330
pS339
Fold Increase Over Basal
0 1 2 3 4 5
0 15 30 45 60
Time (min)
B.
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
0 5 10 20
Time (min)
WB: pS330
C.
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
0 2 5 10
Time (min)
WB: pS339

Figure 7. PKC is responsible for Ser-324/5 phosphorylation in human astroglia cells. A) Human astroglia were serum starved for 24 hr. 30 min prior to CXCL12 stimulation (20 nM), cells were pretreated with 2.5 μM Bis I or were left untreated. Left panel: 20 μg of whole cell lysate was separated by SDS-PAGE and blotted for pS324/5. Right panel: pS324/5 was normalized to actin levels and data presented as fold increase over control (± S.E.M., n=3). B) Human astroglia were serum starved for 24 hr. 30 min prior to CXCL12 stimulation (20 nM), cells were pretreated with 2.5 μM Bis I or were left untreated. Left panel: 20 μg of whole cell lysate was separated by SDS-PAGE and blotted for pS330. Right panel: pS330 was normalized to actin levels and data presented as fold increase over control (± S.E.M., n=3).

Figure 7

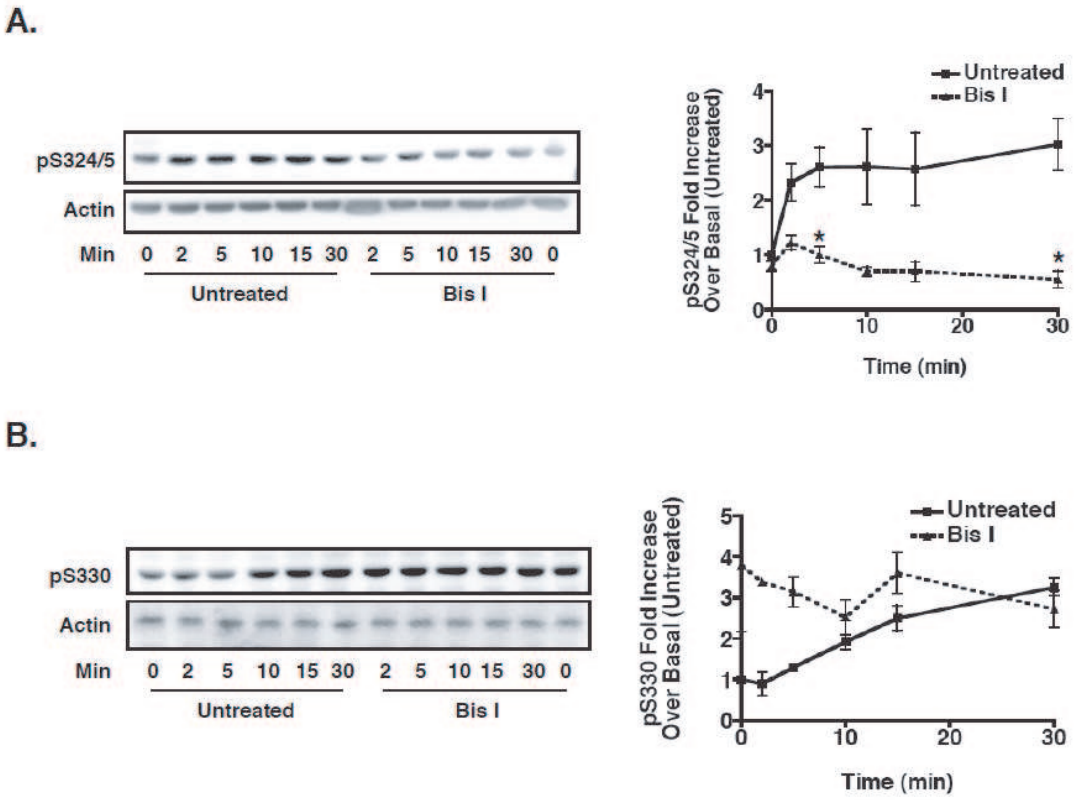

A.
pS324/5
Actin
Min 0 2 5 10 15 30 2 5 10 15 30 0
Untreated
Bis I
Untreated
Bis I
pS324/5 Fold Increase Over Basal (Untreated)
Time (min)
B.
pS330
Actin
Min 0 2 5 10 15 30 2 5 10 15 30 0
Untreated
Bis I
Untreated
Bis I
pS330 Fold Increase Over Basal (Untreated)
Time (min)

Figure 8. GRKs differentially regulate signaling following activation of endogenous CXCR4 in HEK293 cells. A) HEK293 cells were loaded with the ratiometric calcium indicator Fura-2A/M 72 hr after siRNA transfection. Cells were stimulated with 100 nM CXCL12 and changes in intracellular calcium were calculated from changes in fluorescence. Left panel: shown is a representative trace from six separate experiments. Right panel: mean (± S.E.M.) increase in peak calcium transient calculated from six separate experiments. B) Effect of GRK knock down on CXCL12-mediated activation of ERK1/2. 72 hr post-transfection, cells were serum starved for 6 hr prior to stimulation with CXCL12 (100 nM). Shown is a representative Western blot from five independent experiments. C) Left panel: pERK2 was normalized to total ERK2 and data are presented as percent maximal ERK2 activation as compared to control (± S.E.M., n=4). Right panel: comparison of maximal ERK2 activation (5 min) following stimulation with CXCL12 (100 nM) (± S.E.M., n=4; *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$).

Figure 8

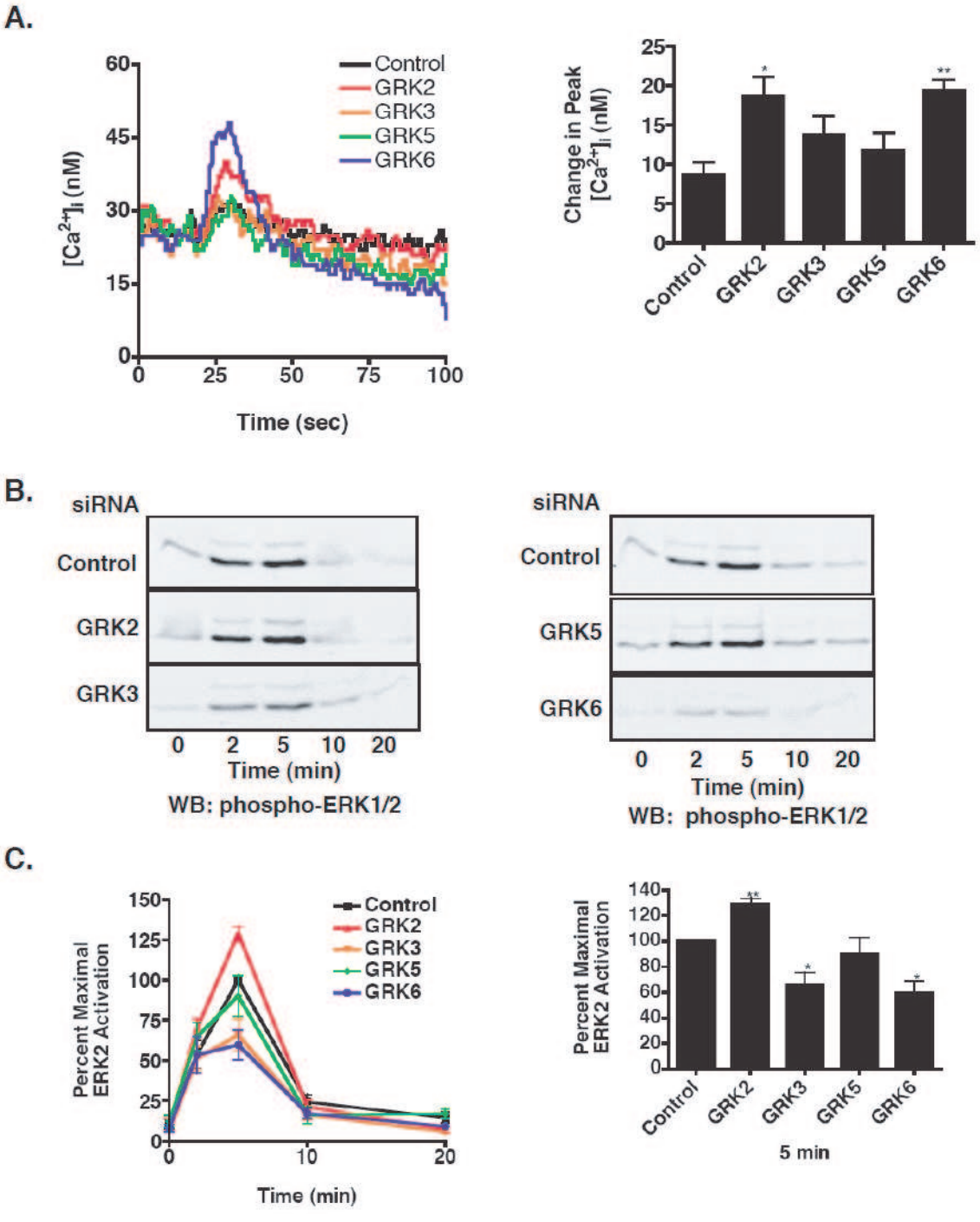

A.
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
[Ca2+]i (nM)
Time (sec)
Change in Peak [Ca2+]i (nM)
B.
siRNA
Control
GRK2
GRK3
Time (min)
WB: phospho-ERK1/2
GRK5
GRK6
C.
Percent Maximal ERK2 Activation
5 min

Figure 9. Differential GRK-mediated regulation is conserved in Flag CXCR4 cells. Cells expressing Flag CXCR4 were analyzed for calcium flux (A) and ERK1/2 activation (B and C) exactly as described in the legend to Figure 8.

Figure 9

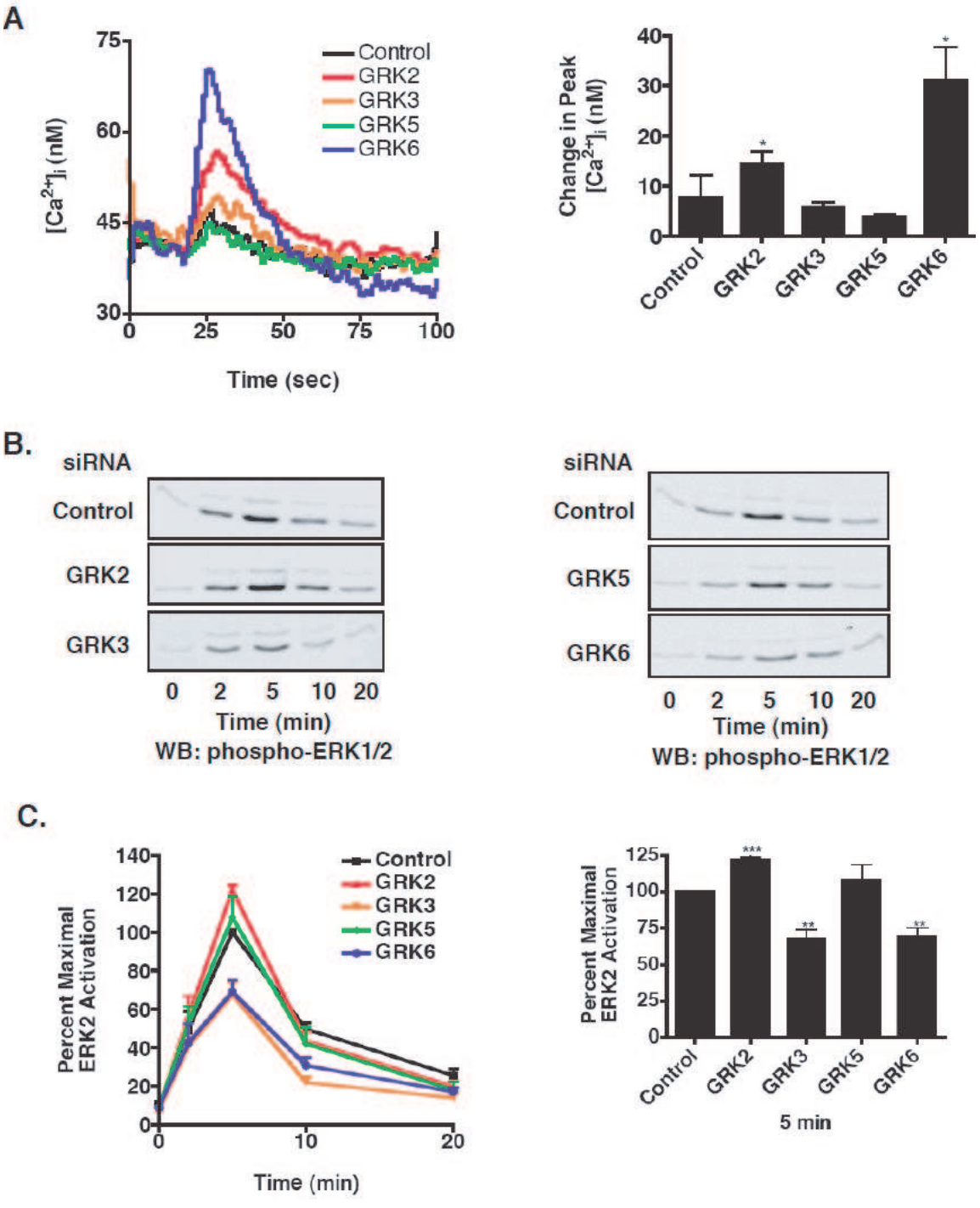

A
75
60
45
30
[Ca2+]i (nM)
0
25
50
75
100
Time (sec)
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
Change in Peak [Ca2+]i (nM)
40
30
20
10
0
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
B.
siRNA
Control
GRK2
GRK3
0 2 5 10 20
Time (min)
WB: phospho-ERK1/2
siRNA
Control
GRK5
GRK6
0 2 5 10 20
Time (min)
WB: phospho-ERK1/2
C.
Percent Maximal ERK2 Activation
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
Time (min)
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
Percent Maximal ERK2 Activation
125
100
75
50
25
0
***
**
**
Control
GRK2
GRK3
GRK5
GRK6
5 min

Figure 10. Non-visual arrestins differentially regulate CXCR4-mediated signaling. A) Mean (± S.E.M.) increase in peak calcium transient following stimulation of endogenous CXCR4 calculated from seven separate experiments. B) Mean (± S.E.M.) increase in peak calcium transient following stimulation of Flag CXCR4 calculated from three separate experiments. C and D) Effect of arrestin knock down on ERK1/2 activation following activation of HEK293 (C) or Flag CXCR4 (D) cells. 72 hr post-transfection, cells were serum starved for 6 hr prior to stimulation with CXCL12 (100 nM). Left panels: shown are representative Western blots from seven (C) and four (D) separate experiments. Right panels: pERK2 was normalized to total ERK2 and data is presented as percent maximal ERK2 activation as compared to control (± S.E.M.; *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$).

Figure 10

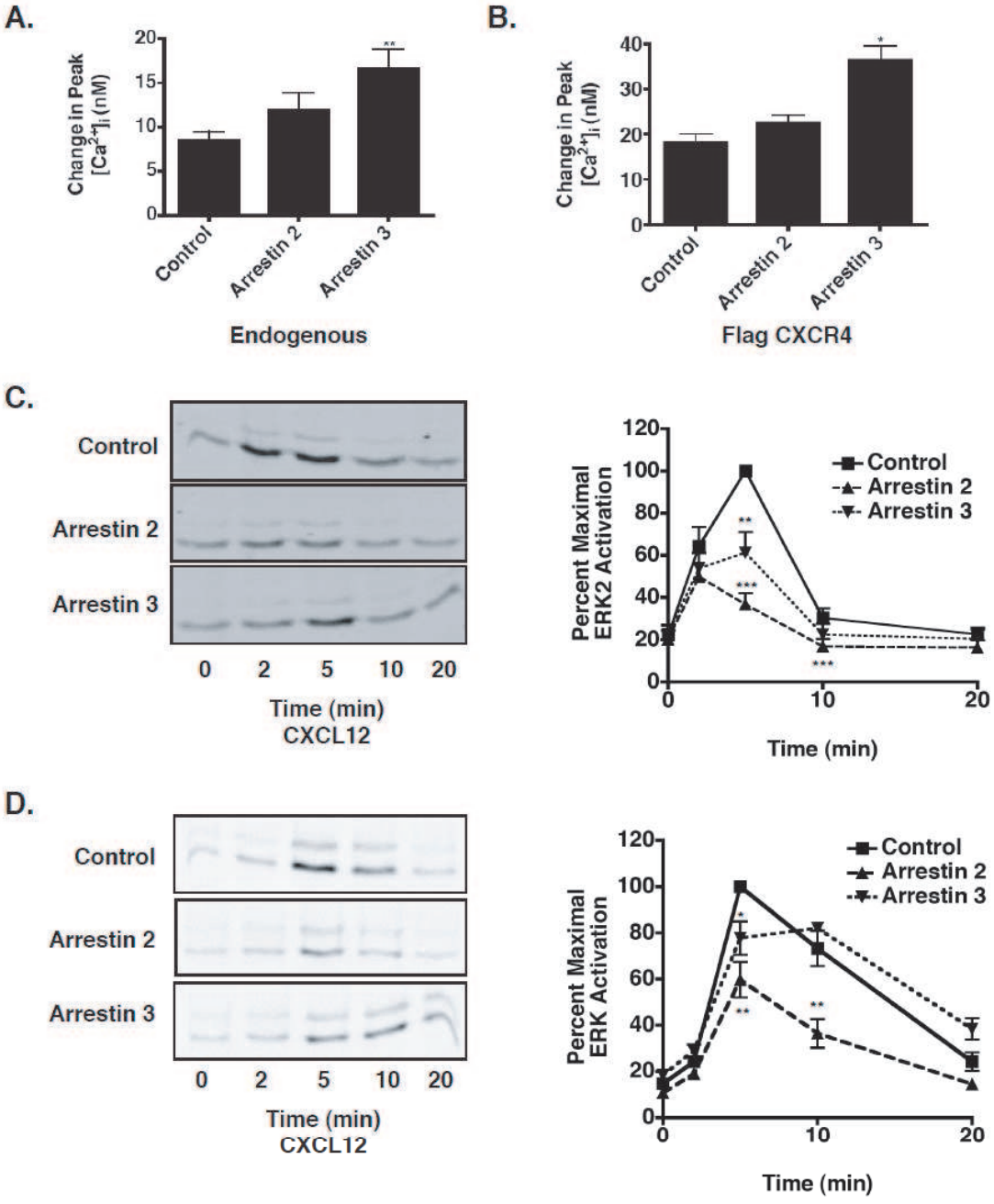

A.
Change in Peak [Ca2+]i (nM)
20
15
10
5
0
**
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
Endogenous
B.
Change in Peak [Ca2+]i (nM)
40
30
20
10
0
*
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
Flag CXCR4
C.
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
0 2 5 10 20
Time (min)
CXCL12
Percent Maximal ERK2 Activation
120
100
80
60
40
20
0
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
**
***
***
0
10
20
Time (min)
D.
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
0 2 5 10 20
Time (min)
CXCL12
Percent Maximal ERK Activation
120
100
80
60
40
20
0
Control
Arrestin 2
Arrestin 3
*
**
**
0
10
20
Time (min)

Figure 11. Phosphorylation of CXCR4 differentially regulates the recruitment and conformation of the non-visual arrestins. A BRET assay was performed to determine if CXCR4 is able to recruit the non-visual arrestins following activation. HEK-293T cells were transiently transfected with wild type (WT) RlucII-tagged CXCR4 and either GFP-tagged arrestin2 or arrestin3. SDF-stimulation results in the recruitment of both arrestin2 (A) and arrestin3 (B). Interestingly, alanine substitution of the proposed GRK3 sites (5A Tail) eliminates arrestin2 recruitment (C) and significantly decreases that of arrestin3 (D). In contrast, alanine substitution of the identified GRK6 sites (GRK6SA) results in an increase in the BRET ratio observed, suggesting an altered conformation of the arrestins (C and D).

Figure 11

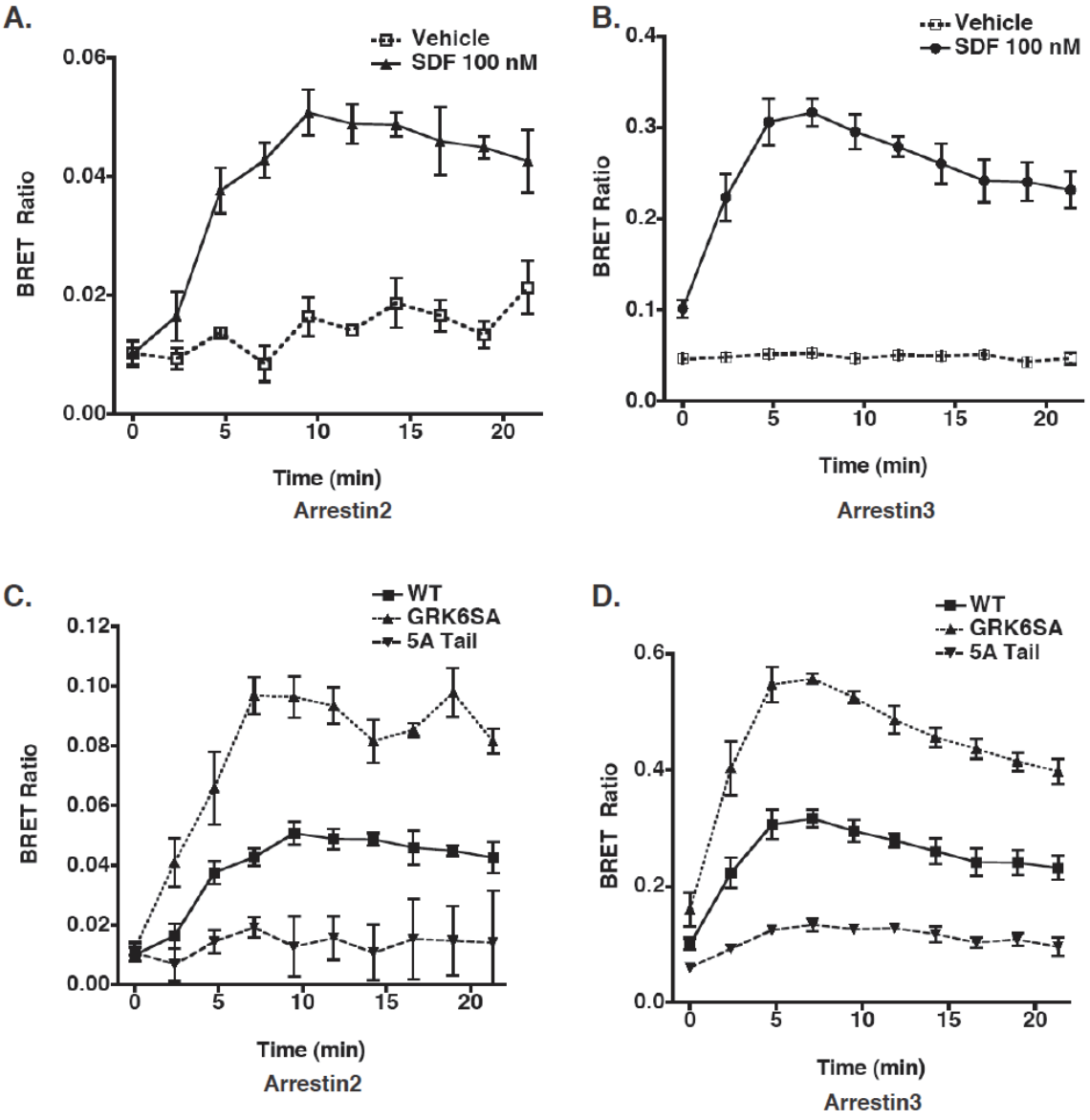
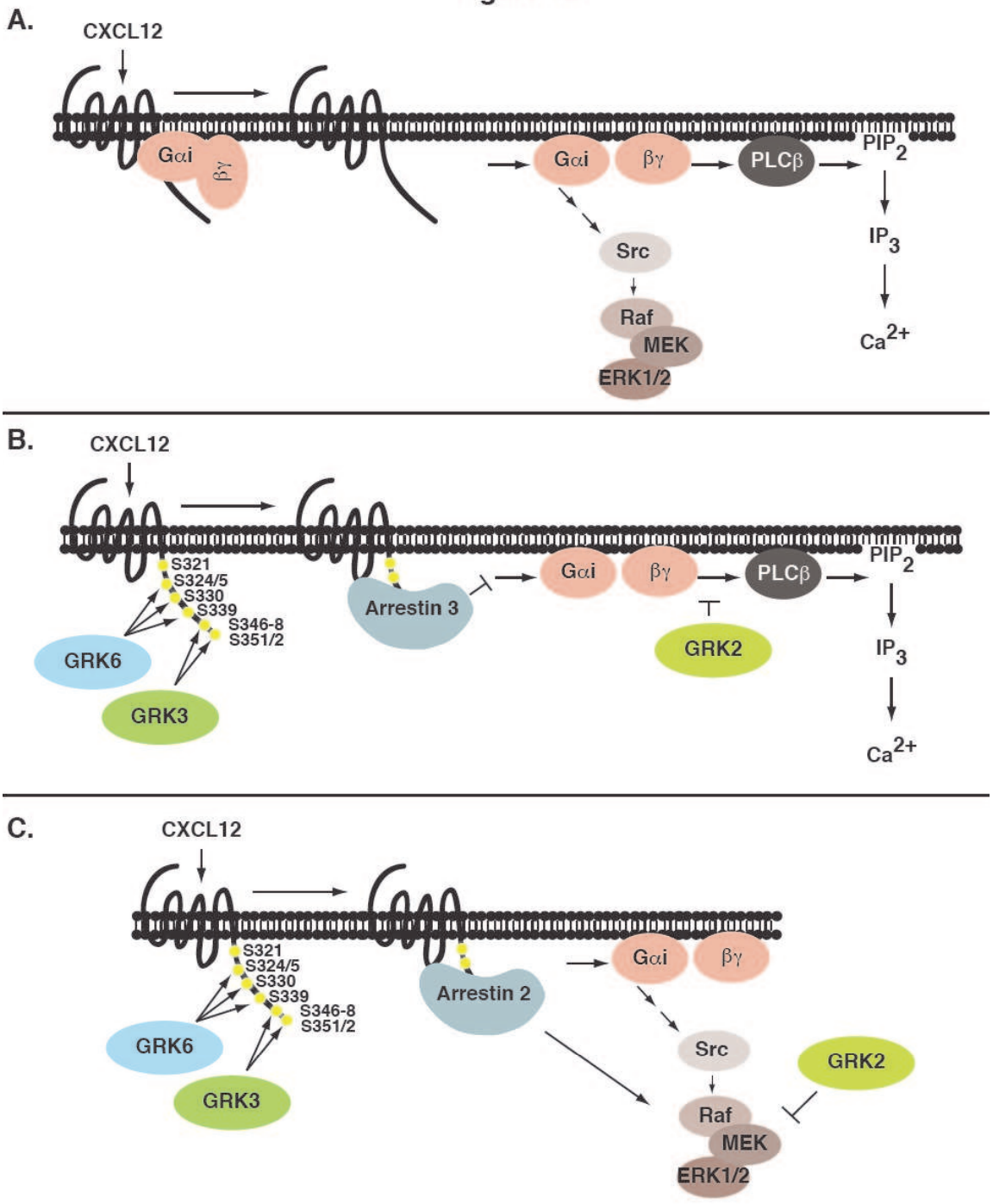

A.
Vehicle
SDF 100 nM
BRET Ratio
0.06
0.04
0.02
0.00
0
5
10
15
20
Time (min)
Arrestin2
B.
Vehicle
SDF 100 nM
BRET Ratio
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
5
10
15
20
Time (min)
Arrestin3
C.
WT
GRK6SA
5A Tail
BRET Ratio
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
5
10
15
20
Time (min)
Arrestin2
D.
WT
GRK6SA
5A Tail
BRET Ratio
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
Time (min)
Arrestin3

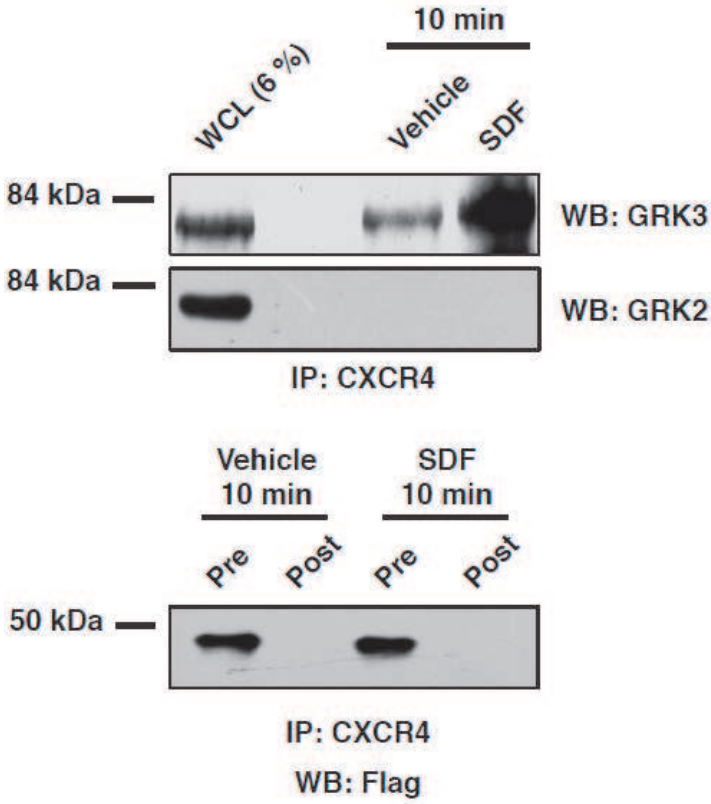
Figure 12. Regulation of CXCR4 activity and signaling. A) Upon ligand binding, CXCR4 activates a number of signaling cascades resulting in calcium release from intracellular stores and phosphorylation of ERK1/2. B) Phosphorylation of CXCR4 by GRK6 (Ser324/5, Ser330, and Ser339) and GRK3 (a residue between Ser-346-S348, and either Ser-351 or Ser-352) results in the recruitment of arrestin3 to CXCR4, thereby attenuating G protein activation and calcium release. GRK2 also attenuates G protein activation and calcium release most likely by regulating Gβγ activation of PLCb. C) Phosphorylation of CXCR4 by GRK6 (Ser324/5, Ser330, and Ser339) and GRK3 (a residue between Ser-346-S348, and either Ser-351 or Ser-352) results in a conformation of arrestin2 that allows for full activation of ERK1/2. In contrast, GRK2 inhibits ERK1/2 by regulating the activity of MEK.

Figure 12


A.
CXCL12
Gαi
βγ
Gαi
βγ
PLCβ
PIP2
IP3
Ca2+
Src
Raf
MEK
ERK1/2
B.
CXCL12
S321
S324/5
S330
S339
S346-8
S351/2
GRK6
GRK3
Arrestin 3
Gαi
βγ
PLCβ
PIP2
GRK2
IP3
Ca2+
C.
CXCL12
S321
S324/5
S330
S339
S346-8
S351/2
GRK6
GRK3
Arrestin 2
Gαi
βγ
Src
GRK2
Raf
MEK
ERK1/2

Supplemental Figure 1. GRK3 is selectively recruited to activated CXCR4. Following a 2 hr serum starve, cells stably expressing Flag-tagged CXCR4 were stimulated either vehicle (SFM with 0.1% BSA) or 100 nM SDF for 10 min. Following crosslinking with dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP), WCL were prepared and CXCR4 complexes were immunoprecipitated (IP) overnight, rocking at 4°C. The following morning, 20 μL of Protein A/G beads were added and allowed to rock for an additional 2 hr at 4°C. Immune complexes were washed extensively, separated by 10% SDS-PAGE and blotted to determine co-IP of GRK2 and 3 (upper panel) or anti-Flag to determine the efficiency of CXCR4 IP (lower panel).

Supplemental Figure 1



Article 3

A Synthetic Biology Approach Reveals a $G\alpha_{13}$-Rho Signaling Axis Driving CXCR4-mediated Breast Cancer Metastasis

Le cancer du sein est l'affection maligne non cutanée la plus repandue chez les femmes (Jemal et al., 2009). Les cancers des cellules basales « basal like » qui représentent 15% environ des cancers du sein sont souvent diagnostiqués « triples négatifs » car ils n'expriment pas les récepteurs de oestrogènes, les oncogènes HER2/Neu, ni les récepteurs de la progestérone (Cheang et al., 2008; Perou et al., 2000), ce qui les rends résistants aux traitements actuels. Il est rapporté que la formation de métastases à partir des cancers « basal like » serait la plus grande cause de mortalité de cette maladie (Christofori, 2006); 90% des décès imputables aux cancers du sein résulteraient des métastases dans des organes secondaires (Gupta and Massague, 2006). Il est désormais connu que le phénomène de métastases implique très souvent la surexpression du récepteur de chimiokines CXCR4 par les cellules du cancer du sein, avec en parallèle la libération de SDF-1 par les organes secondaires (Dorsam and Gutkind, 2007). L'interférence avec CXCR4 dans un but thérapeutique a dû être abandonnée dans de nombreux cas des molécules comme le Plerixafor mobilisaient également les cellules souches hématopoïétiques. L'étude des voies de signalisation impliquées spécifiquement dans la migration des cellules cancéreuses revêt donc une importance majeure. Dans cet article, la combinaison de multiples stratégies dont la suppression de gène, l'utilisation de drogues, l'analyse de BRET, la vidéomicroscopie et l'approche de biologie synthétique (récepteurs activés seulement par un ligand synthétique RASSL) ont permis de déterminer que la migration des cellules cancéreuses initiée par CXCR4 nécessitait strictement l'activation de Rho par $G\alpha_{13}$. L'inhibition de l'axe de signalisation CXCR4-Gα13-Rho est donc proposé comme cible thérapeutique contre les métastases des cancers du sein.

Le but de cette collaboration était que nous validions l'interaction directe entre CXCR4 et Gα13 en BRET (figures 4 G/H/I/J, et supplémentaires 2B/C)

A Synthetic Biology Approach Reveals a Ga_{13}-Rho Signaling Axis Driving CXCR4-mediated Breast Cancer Metastasis

Hiroshi Yagi[1], Wenfu Tan[1,2], Sylvain Armando[3], Panomwat Amomphimoltham[4], May Samaan[1], Roberto Weigert[4], Alfredo A. Molinolo[1], Michel Bouvier[3], and J. Silvio Gutkind[1*]

[1]Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20852, USA

[2]Current Address: School of Medicine, Fudan University, Shanghai, China

[3]Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, and Groupe de Recherche Universitaire sur le Medicament, Universite de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

[4]Intracellular Membrane Trafficking Unit, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD 20852, USA

SUMMARY

The migration of CXCR4 expressing tumor cells in response to gradients of chemokine SDF-1/CXCL12 has been implicated in lymphatic and organ-specific metastasis in some of the most prevalent human malignancies, including breast, prostate, and lung cancer. By the use of multiple experimental strategies, including gene knock down, pharmacological tools, bioluminescence resonance energy transfer (BRET), and reengineering G protein-regulated signaling networks using G protein coupled receptors activated by artificial ligands (RASSLs) and chimeric G proteins, we show here that CXCR4-mediated chemotaxis and transendothelial migration of metastatic basal-like breast cancer cells strictly requires the activation of G proteins of the $G\alpha_{12/13}$ family, also known as the *GEP* oncogene, and the consequent activation of the small GTPase Rho. Furthermore, we provide evidence that interfering with the CXCR4-$G\alpha_{13}$-Rho signaling axis prevents the

spontaneous metastasis of basal-like breast cancer cells, thus exposing new therapeutic targets for metastasis prevention in breast cancer.

INTRODUCTION

Approximately one in eight women will develop breast cancer during her lifetime, making breast cancer the most common noncutaneous malignancy among females (Jemal et al., 2009). About 75% of these breast cancers are estrogen-receptor-positive, and high-level expression of the HER2/Neu oncogene occurs in ~30% of the breast cancers (reviewed in (Weigelt and Reis-Filho, 2009). Breast cancers have been recently classified in five distinct classes, luminal A, luminal B, HER2 overexpressing, basal-like, and normal-like, with HER2-overexpressing and basal-like breast cancers having the poorest prognosis and patient outcome (Sorlie et al., 2001; Weigelt and Reis-Filho, 2009). The recent success of therapeutic approaches aimed at interfering with HER2/Neu and estrogen receptor function have contributed to a dramatic reduction in breast cancer mortality. However, ~15% of breast cancers are basal-like, which are often diagnosed as triple-negative as they lack expression of estrogen receptors, HER2/Neu, and progesterone receptors, and hence they do not respond to their targeted therapies (Gluz et al., 2009; Sorlie et al., 2001; Weigelt and Reis-Filho, 2009). Ultimately, 90% of breast cancer deaths may stem from the metastatic spread of basal-like triple negative breast cancers, and from hormone receptor or HER2/Neu positive breast cancers exhibiting intrinsic or acquired treatment resistance (Fidler, 2003; Gluz et al., 2009; Gupta and Massague, 2006; Weigelt and Reis-Filho, 2009). Thus, elucidating the mechanisms by which breast cancer cells spread from their primary sites to distant organs is an area of intense investigation, as it may provide new therapeutic targets to prevent breast cancer metastasis.

Breast cancers metastasize preferentially to the bone marrow, lungs, liver, and brain, and defined gene expression programs may endow breast cancer cells with the ability to infiltrate and eventually succeed in colonizing each of these specific target organs (reviewed in (Nguyen et al., 2009). This organ-specific metastasis often involves the

aberrant expression of G-protein linked chemokine receptors in cancer cells concomitant with the release of chemokines from secondary organs (reviewed in (Dorsam and Gutkind, 2007; Karnoub and Weinberg, 2006). The chemokines family direct the migration of leukocytes to sites of inflammation and trafficking of hematopoietic stem cells, lymphocytes, and dendritic cells between the blood and primary and secondary lymphoid organs (reviewed in (Balkwill, 2004a). Thus, tumor cells may gain, and thus be selected for the ability to co-opt this potent pro-migratory activity of chemokines and their G protein coupled receptors (GPCRs) to metastasize to regional and distant organs.

CXCR4 is the chemokine receptor most often implicated in breast cancer metastasis (Muller et al., 2001). Increased expression of CXCR4 is associated with enhanced metastatic potential of breast cancers, and organs that are the most frequent sites of metastasis including the lymph node, lung, bone marrow, and liver, express CXCL12/SDF-1, the only known ligand for CXCR4 (Balkwill, 2004a; Muller et al., 2001). Exciting new findings indicate that inhibiting CXCR4 function by blocking antibodies and small molecule inhibitors can all prevent the metastatic spread of breast cancer cells to their target tissues in multiple experimental metastasis models (Liang et al., 2005; Muller et al., 2001; Richert et al., 2009; Smith et al., 2004). However, blockade of CXCR4 with AMD3100 (Plerixafor®), an antagonist of CXCR4, leads to mobilization of hematopoietic stem cells (HSC) from the bone marrow to the peripheral blood, which has hampered the exploration of CXCR4 blockers as an adjuvant for breast cancer therapy (Epstein, 2004). Nonetheless, the possibility still exists that CXCR4 may deploy different signaling properties in metastatic breast cancer cells, which could be exploited for the development of new anti-metastatic treatment options. Indeed, we show here that although CXCR4 is known to couple to pertussis toxin (PTX)-sensitive heterotrimeric proteins of the $G\alpha_i$ family, CXCR4-mediated chemotaxis and transendothelial migration of metastatic basal-like triple-negative breast cancer cells cannot be prevented PTX. Instead, by the use of multiple experimental strategies, including gene knock down, pharmacological tools, bioluminescence resonance energy transfer (BRET), videomicroscopy, and synthetic biology approaches, we show here that CXCR4-initiated cell migration in these cancer cells

strictly requires the activation of Rho through heterotrimeric G proteins of the $G\alpha_{12/13}$ family, also known as the *GEP* oncogene. Furthermore, we provide evidence that interfering with the CXCR4-$G\alpha_{13}$-Rho signaling axis prevents the spontaneous metastasis of breast cancer cells, thus exposing new potential therapeutic targets for metastasis prevention in breast cancer.

RESULTS

SDF-1 induces the migration of metastatic breast cancer cells through CXCR4

The expression of CXCR4 has been implicated in organ-specific breast cancer metastasis (Muller et al., 2001); reviewed in (Dorsam and Gutkind, 2007; Nguyen et al., 2009), and elevated CXCR4 expression often correlates with the poor prognosis of breast cancer patients (Figures S1A and S1B). To begin investigating how CXCR4 promotes the migration of breast cancer cells, we took advantage of the availability of a representative panel of human mammary gland cell lines, including normal and non-metastatic and metastatic breast tumor cells, which are classified as luminal or basal-like cell origin based on their gene expression signatures (Neve et al., 2006). Basal-like breast cancer cells are in general more motile in response to serum (Neve et al., 2006), but only those cell lines harboring metastatic potential, MDA-MB-231, a basal-like cell line that represents one of the most widely utilized human breast cancer cell model, and the more recently developed SUM-159 cells (Valastyan et al., 2009) migrated towards a gradient of SDF-1, while most cancer cells migrated in response to EGF as an internal control (Figure 1A). Thus, the ability to respond to SDF-1 appears to correlate with the metastatic behavior of breast cancer cells. The only exemption was MCF-7, a luminal/ductal-derived breast cancer cell that does not metastasize *in vivo* but migrates in response to SDF-1, albeit less than metastatic cells. Both MDA-MB-231 and SUM-159 cells migrated efficiently towards SDF-1 (Figures 1B and S1C). SDF-1 also promoted the invasion of MDA-MB-231 cells into collagen gels (Figure 1C), and the specific CXCR4 inhibitor AMD3100 prevented the SDF-1 induced cell migration in a dose-dependent manner without affecting the migratory

response to EGF as a negative control (Figure S1D). Similar results were observed in SUM-159 cells (not shown), supporting that SDF-1 can induce the migration of invasive basal-like breast cancer cells by acting on CXCR4.

SDF-1/ CXCR4 interaction mediates transendothelial breast cancer cell migration *in vitro*

Experimental breast cancer metastasis studies in which cancer cells are seeded in the general circulation by intravenous or intracardiac injection, have revealed that interfering with CXCR4 function by the use of CXCR4-targeted therapies can all prevent breast cancer metastasis *in vivo* (Liang et al., 2005; Muller et al., 2001; Richert et al., 2009; Smith et al., 2004; Tamamura et al., 2003). However, to metastasize to distant organs, cancer cells must first invade the surrounding tissues and enter the circulation. To explore the possibility that CXCR4 may play a role in these early events thereby enabling the metastatic spread of breast cancer cells, we began by stably limiting the expression of CXCR4 by lentiviral-mediated RNA-interfering approaches (Figure 1D). CXCR4 knock down resulted in a reduction in the ability of SDF-1 to promote cell migration without affecting the response to EGF in MDA-MB-231 cells (Figure 1E). We then investigated the passage of cancer cells through endothelial monolayers using *in vitro* intravasation models (Figure 1F). While SDF-1 did not disrupt the endothelial barrier function, it induced the migration of MDA-MB-231 cells through both vascular (VEC) and lymphatic (LEC) endothelial monolayers, which was inhibited by AMD3100 or by knocking down CXCR4 in breast cancer cells (Figures 1G, 1H, S1E and S1F).

Knock down of CXCR4 suppresses spontaneous breast cancer metastasis *in vivo*

To investigate whether CXCR4 contributes to the initial steps in breast cancer metastasis *in vivo*, we took advantage of recently developed animal models consisting in the orthotopic implantation of breast cancer cells into the mammary fat pad of female immunocompromised mice, which then spontaneously metastasize to lymph nodes and

secondary organs (Dadiani et al., 2006). Aligned with prior reports (Dadiani et al., 2006), MDA-MB-231 injected into mammary fat pad of SCID/NOD mice grew at the primary site and developed metastases in multiple distant sites, including locoregional and distant lymph nodes, lung and liver approximately 40 days post-injection (Figures 1I-1K). The metastatic lesions underwent histopathological examination and their total weight was measured for each mouse (Figures 1J and 1L). Tumor cells were observed within lymphatic vessels (Figure 1K), and 30% of the mice displayed multiple metastatic lesions in the lungs (Dadiani et al., 2006). Knock down of CXCR4 in MDA-MB-231 cells did not affect the growth of the primary tumors (Figures S1G and S1H). However, it resulted in a remarkable and significant inhibition of their metastatic spread (Figure 1L), with no mice displaying cancerous lesions in the lung ($p<0.05$), further supporting the critical role of CXCR4 function at the early steps in breast cancer metastasis.

Activation of $G\alpha_i$ is not strictly necessary or sufficient to promote the migration of metastatic breast cancer cells: Use of a synthetic biological approach

CXCR4, as other chemokine receptors, is known to couple to Pertussis toxin (PTX) sensitive $G\alpha_i$ subunits of heterotrimeric G proteins (Dutt et al., 1998). As expected, treatment of MDA-MB-231 cells with PTX resulted in a decrease of phosphorylation of Akt and ERK1/2 induced by SDF-1, a typical response that is dependent on $G\alpha_i$, without affecting the activation of these kinases by EGF as a negative control (Figure 2A). Similarly, PTX prevented the chemotactic response of a typical non-metastatic luminal breast cancer cells, MCF-7, towards SDF-1, reflecting the contribution of $G\alpha_i$ in these cells (Figure 2B). However, PTX treatment of MDA-MB-231 and SUM-159 cells had limited impact on SDF-1-induced cell migration (Figure 2B). Similarly, the transendothelial migration of MDA-MB-231 cells promoted by SDF-1 was not blocked by PTX (Figures 2C and 2D), thus raising the possibility that G proteins in addition to, or other than, $G\alpha_i$ may participate in the biological response mediated by CXCR4 in these metastatic breast cancer cells. To investigate further the role of $G\alpha_i$ signaling in breast cancer cell migration, we

utilized a synthetic biology approach aimed at reconstituting G protein-regulated networks by the stable expression of a mutant $G\alpha_i$-coupled GPCR, termed G_i RASSL (receptors activated solely by synthetic ligands), which has lost the ability to respond to its natural ligand, but gained the ability to respond to a pharmacologically inert compound, clozapine-N-oxide (CNO) (reviewed in (Conklin et al., 2008) (Figure 2E and 2F). As a control, CNO induced the phosphorylation of Akt in MDA-MB-231 cells expressing G_i RASSL in a PTX sensitive fashion but not in parental cells (Figure 2G and 2H), supporting that G_i RASSL signals though $G\alpha_i$ in response to CNO in MDA-MB-231 cells. However, CNO failed to induce cell migration in multiple experiments using mass cultures of G_i RASSL-expressing MDA-MB-231 cells as well as in sorted cell populations expressing high levels of this GPCR (Figure 2I). Similar results were observed in highly expressing HEK-293T cells and other metastatic breast cancer cells, SUM-159 (see below, Figures 5D and 5G). Collectively, these data suggest that G_i activity may not be sufficient, or strictly necessary to induce cell migration mediated by CXCR4 in metastatic breast cancer cells, thus raising the possibility that other signaling pathway regulated by CXCR4 may contribute to breast cancer cell migration.

Activation of Rho is an integral component of the migratory pathway by which SDF-1 promotes cell migration through CXCR4 in breast cancer cells

The three prototypical members of Rho family proteins, Rho, Rac and Cdc42, have all been linked to cell movement (Bar-Sagi and Hall, 2000). Thus, we investigated whether these Ras-related GTPases are involved in the CXCR4 mediated migration of aggressive metastatic breast cancer cells. SDF-1 induced the rapid activation of Rho, reaching a maximum at ~5 min, in both MDA-MB-231 and SUM-159 cells (Figure 3A), but did not induce Rac or Cdc42 activation, both of which displayed elevated GTP-bound levels even prior SDF-1 stimulation (data not shown). Knock down of CXCR4 expression in MDA-MB-231 cells resulted in a reduction in the ability of SDF-1 to promote Akt and Rho activation (Figure 3B). However, the activation of Rho stimulated by SDF-1 was not inhibited by PTX (Figure 3C), supporting that G_i and its $G\alpha$ subunit, $G\alpha_i$, are not involved in Rho activation mediated by CXCR4. Instead, we noticed that PTX treatment elevated the

basal levels of active Rho in both metastatic breast cancer cells, suggesting that, as previously reported (Rosenfeldt et al., 2006), a G_i-dependent mechanism may restrain Rho activation, a possibility that warrants further investigation. To address whether Rho activation is in turn involved in the migration of MDA-MB-231 cells in response to SDF-1, we used both transfection of siRNA targeting RhoA and treatment with C3 toxin that ADP ribosylates and inhibits Rho function (Kikuchi et al., 1988). The knock down of RhoA expression in MDA-MB-231 cells resulted in a decrease of cell migration induced by SDF-1 (Figures 3D and 3E). Similarly, treatment with C3 toxin inhibited the migration of MDA-MB-231 cells toward wells containing SDF-1 (Figure 3F). To further confirm the role of RhoA activity in SDF-1-induced cell migration, we used a retro-inhibition approach consisting in the use of a C3 toxin-resistant form of RhoA (RhoA I41). Expression of RhoA I41, but not RhoA wt, reversed the inhibitory activity of C3 toxin on cell migration stimulated by SDF-1 (Figure 3G). Together, these data demonstrated that SDF-1 can induce Rho activation through CXCR4 independently on G_i, and that in turn, RhoA contributes to cell migration when promoted by SDF-1 in breast cancer cells.

$G\alpha_{12/13}$ is involved in SDF-1-induced breast cancer cell migration *in vitro*

Among the four G protein α subunit subfamilies, we and others have shown that members of the $G\alpha_{12/13}$ and $G\alpha_q$ families of G proteins can activate the small GTPase RhoA (Chikumi et al., 2002; Worzfeld et al., 2008). In this regard, $G\alpha_{12/13}$, also known as the *GEP* oncogene (Xu et al., 1993; Xu et al., 1994), is highly expressed in breast cancer cells and tissues (Gutkind et al., 1998; Kelly et al., 2006) and correlates with metastatic potential (Kelly et al., 2006) and poor prognosis (Figure S2A). $G\alpha_{12/13}$ promotes the activation of Rho by binding to the RGS domain of RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) (Fukuhara et al., 2001). Expression of a chimeric molecule encoding GFP fused to the RGS domain of PDZ-RhoGEF, which behaves as a dominant negative mutant for $G\alpha_{12/13}$, inhibited both Rho activation and migration promoted by SDF-1 in MDA-MB-231 cells (Figures 3H-3L), thus suggesting the contribution of the $G\alpha_{12/13}$-Rho signaling axis in CXCR4-mediated cell migration in breast cancer cells.

Knock down of $G\alpha_{12/13}$ inhibits the migration of human breast cancer cells *in vitro* and their metastatic potential *in vivo*

$G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ are highly expressed in breast cancer-derived cell lines when compared to normal and non-tumorgenic mammary epithelial cells (Figure 4A). Of interest, in metastatic breast cancer cells expression of $G\alpha_{13}$ is dominant, with the expression of $G\alpha_{12}$ lower than that in non-metastatic cell lines. To address the direct role of $G\alpha_{12/13}$ in the migration of MDA-MB-231 cells, we next knocked down $G\alpha_{12/13}$ by expressing shRNAs targeting $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ stably in MDA-MB-231 cells (Figure 4B). The activation of Rho and migration of MDA-MB-231 cells promoted by SDF-1 were both blocked by knock down of $G\alpha_{12/13}$ (Figure 4C and 4D). Of interest, $G\alpha_{13}$ appears to play a more prominent role as knock down of $G\alpha_{13}$ was sufficient to prevent breast cancer cell migration in response to SDF-1, consistent with its higher level of expression in these cells. Taken together, our data suggest that in addition to $G\alpha_i$, CXCR4 can couple to $G\alpha_{13,}$ and possibly to $G\alpha_{12}$ in cells expressing higher levels of this $G\alpha_{13}$ family member, and that Rho activation through $G\alpha_{12/13}$ might in turn be involved in cell migration induced by SDF-1. Furthermore, using the spontaneous metastasis model of breast cancer, we observed that the knock down of $G\alpha_{12/13}$ in MDA-MB-231 cells resulted in a remarkable and significant inhibition of their metastatic spread, despite the similar size of the primary tumor (Figure 4E), supporting that $G\alpha_{12/13}$ and CXCR4 may play a pivotal role in metastatic spread of human breast cancer cells *in vivo*.

CXCR4 couples to $G\alpha_{13}$

While we have recently observed that CXCR4 may require heterotrimeric G proteins of the $G_{12/13}$ family to promote chemotaxis in leukemic T cells, whether this is due to a direct effect of CXCR4 on $G_{12/13}$ is unclear, as emerging evidence support a broad impact of $G_{12/13}$ in immune cell function (Herroeder et al., 2009; Tan et al., 2006). Based on our emerging results, we decided to focus on $G\alpha_{13}$, and used BRET-based approaches to

explore whether CXCR4 can interact directly with $G\alpha_{13}$ and whether this protein-protein interaction is regulated upon ligand binding in living cells (Figure 4G) (Gales et al., 2005). CXCR4 was fused to GFP2 at its C-terminus, while $G\alpha_{13}$ was fused to *Renilla* luciferase II. (*R*lucII). Figure 4H shows a BRET titration curve indicating that $G\alpha_{13}$ interacts specifically with CXCR4. Stimulation with SDF-1 promoted a significant decrease in the BRET between CXCR4 and $G\alpha_{13}$ indicating that receptor activation leads to the functional engagement of $G\alpha_{13}$ resulting in a conformational reorganization of the receptor-G protein complex (Figure 4I) (Gales et al., 2005). In contrast activation of a related chemokine receptor, CCR2, by its cognate agonist MCP-1, did not affect the marginal BRET signal detected between CCR2 and $G\alpha_{13}$, indicating that CXCR4 but not CCR2 could selectively engage $G\alpha_{13}$ (Figure 4I). Yet, both CXCR4 and CCR2 engaged $G\alpha_{i1}$ as revealed by the observed agonist-promoted changes in BRET between the two receptors and $G\alpha_{i1}$ (Figure 4J). To further validate the engagement of $G\alpha_{13}$ by CXCR4, we monitored the CXCR4-promoted conformational rearrangement of the G_{13} heterotrimer by measuring the BRET between $G\alpha_{13}$-GFP and $G\gamma_7$-Rluc (Figure S2B). As shown in Figure S2C, SDF-1 promoted an increase in BRET indicative of $G\alpha_{13}$ activation in cells expressing CXCR4.

Activation of $G\alpha_{13}$ is required to enhance breast cancer cell migration: A synthetic biology approach

To investigate whether $G\alpha_{13}$ contributes to directional cell migration in breast cancer cells, we reconstructed its initiated signaling pathway by promoting the coupling of $G\alpha_{13}$ to G_i RASSL. For this synthetic biology approach, we employed $G\alpha_{13i5}$, a chimera of $G\alpha_i$ and $G\alpha_{13}$ in which the C-terminal 5 amino acids of $G\alpha_{13}$ were replaced by the corresponding sequences of $G\alpha_i$. This strategy enabled us to re-wire $G\alpha_{13}$ to enable its activation by $G\alpha_i$-coupled receptors (Figure 5A), thereby engineering a GPCR-$G\alpha_{13}$ coupled system that can be readily activated by an artificial ligand. Firstly, the functional activity of this reconstituted chimeric system was tested in HEK-293T cells by examining its ability to promote Rho activation (Figures 5B and 5C). The stimulation of G_i RASSL by CNO

activated ERK1/2 but not Rho in HEK-293T cells expressing only this GPCR, but when $G\alpha_{13i5}$ was co-expressed with G_i RASSL, CNO potently promoted both Rho and ERK1/2 activation (Figure 5C). Of interest, only HEK-293T cells expressing both G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ migrated toward wells containing various concentration of CNO (Figure 5D), indicating that $G\alpha_{13}$ activity in addition to $G\alpha_i$ results in an increased migration of HEK-293T cells. Next, we engineered MDA-MB-231 cells stably expressing G_i RASSL with or without $G\alpha_{13i5}$ (Figure 5E). CNO stimulated Akt activation in cells expressing G_i RASSL, but this response was reduced in cells expressing both G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ (Figure 5F), suggesting that whereas G_i can signal to Akt, $G\alpha_{13}$ may either limit the activation of G_i, or that this G protein α subunit may stimulate molecular events preventing Akt activation. These possibilities are under current investigation. Expression of G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ was sufficient to activate Rho in response to CNO (Figures 5F and S3A). Remarkably, co-expression of G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ was necessary and sufficient to promote the migration MDA-MB-231 and SUM-159 cells in response to CNO in Boyden chambers, collagen gel invasion assays, and in *in vitro* transendothelial migration assays (Figures 5G, 5H, 6G, 6H, S3B and S3C). Taken together, these findings based on a synthetic biology approach using RASSLs and chimeric $G\alpha_{13}$ proteins and those obtained by interfering with CXCR4 and $G\alpha_{13}$ function provide evidence that coupling to $G\alpha_{13}$ activity is required to stimulate the migratory and invasive properties of metastatic breast cancer cells.

Interfering with the CXCR4-$G\alpha_{13}$-Rho signaling axis may provide novel molecular targeted therapy for breast cancer metastasis

Based on these observations, we next asked whether the CXCR4/$G\alpha_{13}$/Rho signaling route may represent a suitable therapeutic target for preventing breast cancer metastasis. We focused our attention on Rho kinase (ROCK), which acts downstream of Rho. ROCK promotes the accumulation of phospho-myosin light chain (pMLC) by phosphorylating MLC and by inhibiting MLC phosphatase, thereby promoting cell

migration by regulating acto-myosin contraction (Amano et al., 1996), a process that may contribute to transcellular tumor invasion (Itoh et al., 1999). Of interest, fasudil, a molecule related to the highly specific ROCK inhibitors, Y27632, has been approved by FDA for its clinical use in cardiovascular diseases including vascular spasm in the brain and pulmonary hypertension (reviewed in (Rikitake and Liao, 2005)). In MDA-MB-231 cells, SDF-1 stimulated the accumulation of pMLC, which was diminished by knock down of RhoA (Figures 6A and B), as well as by the inhibition of ROCK by fasudil (Figure 6C). Aligned with these results, SDF-1 induced the blebbing of MDA-MB-231 cells, a typical ROCK-initiated event, and this response was inhibited by fasudil (Movie S1). Furthermore, CNO induced MLC phosphorylation MDA-MB-231 cells expressing both G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ but not G_i RASSL alone, and this activation was blocked by pretreatment with fasudil (Figure 6D). Fasudil also prevented the chemotaxis and transendothelial migration of MDA-MB-231 cells promoted by SDF-1, and by CNO in G_i RASSL-$G\alpha_{13i5}$ expressing cells (Figures 6E-6H and S4A-S4F). These findings prompted us to examine the therapeutic effect of fasudil on the spontaneous breast cancer metastasis model. As shown in Figure 6I, the metastatic spread of MDA-MB-231 was dramatically prevented in fasudil-treated group, while having a limited and not significant impact on the growth of the primary breast cancer-derived tumor (Figure 6J). Taken together, the ability to interfere with CXCR4 activation of $G\alpha_{13}$ and its initiated Rho-dependent signaling route may represent a potentially effective molecular targeted therapeutic approach for preventing breast cancer metastasis.

DISCUSSION

The presence of invaded lymph nodes is the single best prognostic marker of poor clinical outcome in breast cancer, and 90% of breast cancer deaths occur as a consequence of metastatic disease (de Boer et al., 2009; Fidler, 2003). Hence, the molecular mechanisms underlying the process of breast cancer metastasis has received considerable attention over the past few decades (Gupta and Massague, 2006). In this regard, an emerging view is that

a number of chemokines and cytokines released by the tumor cells and the tumor stroma provide a microenviroment permissive of tumor growth and its metastatic spread. In this context, numerous chemokines and their GPRCs have been implicated in intercellular communication between the tumor cells and the tumor associated fibroblasts and the multiple immune- and inflammatory-cells that constitute the complex tumor microenvironment (Dorsam and Gutkind, 2007; Karnoub and Weinberg, 2006; Orimo et al., 2005). Tumor cells also gain the ability to migrate in response to chemokine gradients, hence facilitating tumor cell dissemination via the lymphatic system and vascular circulation (Balkwill, 2004a). Among them, the interaction between CXCR4 and SDF-1/CXCL12 has been implicated in organ-specific metastasis in several cancers such as breast, prostate and lung cancer (Dorsam and Gutkind, 2007; Zlotnik, 2008). Here, we show that the ability of CXCR4 to guide the migration of breast cancer cells strictly requires the coupling of this chemokine receptor to $G\alpha_{13,}$ which is over-expressed in metastatic breast cancer cells and the consequent activation of the Rho signaling axis. Indeed, by reengineering G protein-regulated signaling networks in breast cancer cells using GPCRs activated by artificial ligands and chimeric G proteins, we obtained direct evidence that the activation of $G\alpha_{13}$ is necessary and sufficient to stimulate Rho thereby promoting the migration of breast cancer cells. These findings provide new opportunities to halt breast cancer metastasis by interfering with the CXCR4-$G\alpha_{13}$-Rho signaling axis and their critical downstream targets. Thus, the elucidation of the mechanisms by which CXCR4 function in breast cancer cells may help expose novel molecular targets for metastasis-preventive strategies.

CXCR4, as most chemokine receptors, is known to act by coupling to G proteins of the $G\alpha_i$ family (Dutt et al., 1998). In this regard, while some GPCRs exhibit a strict G-protein coupling specificity, many GPCRs exhibit a more promiscuous coupling ability, which may be dependent on the expression levels of GPCRs and G protein α subunits (reviewed in (Dorsam and Gutkind, 2007). In this context, most metastatic breast cancer cells exhibit a marked overexpression of CXCR4 and $G\alpha_{13}$, and emerging information suggests that high expression levels of CXCR4 and $G\alpha_{13}$, or its related $G\alpha_{12,}$ correlate with

increased metastatic potential and thus poor prognosis of breast cancer patients. On the other hand, the coupling of CXCR4 to $G\alpha_{13}$ may also contribute to the overall acquisition of the epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like features that characterize the most aggressive and metastatic breast cancers (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Indeed, in addition to promoting cell migration, the heterotrimeric $G\alpha_{12/13}$ proteins can activate transcription factors controlling the expression of metalloproteases such as MMP-2 and MMP-9 thus enabling tissue invasion (reviewed in (Dorsam and Gutkind, 2007), enhance motility by regulating cell-extracellular matrix adhesion through integrins (Gong et al.), and decrease the rigidity of cell-cell contacts by reducing the stability of homophilic E-cadherin interactions (Meigs et al., 2001), among others. Thus, while most physiological processes controlled by CXCR4 may involve the activation of G proteins of the G_i family and their signaling cascades, we can hypothesize that metastatic breast cancers cells may be selected for their ability to overexpress and thus link CXCR4 to $G\alpha_{13}$, thereby gaining increased capacity to migrate towards SDF-1/CXCL12 that is released at low levels by the secondary target organs, while contributing to the overall adquisition of a more motile and pro-invasive phenotype.

Of interest, the levels of CXCR4 may be controlled by the hypoxic environment often observed in solid tumors due to the stabilization of the hypoxia-inducible factor (HIF), which stimulates the CXCR4 promoter (Staller et al., 2003), or by the activation status of HER2/Neu and their downstream pathways, which limit the degradation of CXCR4 (Li et al., 2004). Thus, preventing the aberrant expression of CXCR4 may represent one of the mechanisms by which currently available cancer treatments may reduce breast cancer metastasis. CXCR4 also appears to be highly expressed in breast cancer tumor initiating cells or cancer stem cells (Hwang-Verslues et al., 2009), suggesting that the primary tumor mass may include a particular subpopulation of cancerous cells overexpressing CXCR4 with increased tumor-regenerating potential. Thus, we can speculate that among these tumor stem cells, those overexpressing $G\alpha_{13}$ may represent the potential metastasis stem cells, which may be already pre-existing within the tumor mass. Alternatively, it is also possible that the CXCR4 expressing cancer stem cells that acquire

the ability to overexpress $G\alpha_{13}$ may be selected by their capacity to give rise to cancer cells gaining competence to migrate, intravasate, and ultimately infiltrate and colonize the lymph nodes and secondary organs, thereby compromising patient survival.

While CXCR4 inhibitors, such as AMD3100, Plerixafor®, represent obvious candidates for adjuvant therapy preventing breast cancer metastasis, their side effects have hampered their clinical use in the metastasis prevention setting (Epstein, 2004), albeit recently approved by the FDA for the mobilization of bone marrow-derived hematopoietic stem cells for autologous HSC transplantation. In this regard, $G\alpha_i$ activation is required for SDF-1/CXCR4-mediated retention of hematopoietic progenitors within the bone marrow niche (Papayannopoulou et al., 2003), supporting that long-term inhibition of CXCR4 signaling through $G\alpha_i$ may not be clinically feasible in breast cancer patients. However, perturbing CXCR4 coupling to the $G\alpha_{13}$ family or inhibiting its downstream targets may provide a novel approach for metastasis prevention. Indeed, we show that fasudil, which is currently used in the clinic for vasospasm following subarachnoid hemorrhage and pulmonary hypertension, blocks CXCR4 and $G\alpha_{13}$-promoted cell migration and prevents spontaneous breast cancer metastasis. In this regard, hematopoietic stem cell mobilization is not a side effect caused by fasudil, suggesting that the CXCR4-$G\alpha_{13}$-Rho pathway is dispensable for the retention of progenitor cells in their niche. Similarly, multiple widely used cholesterol-lowering statins can block Rho function (Demierre et al., 2005) without considerable side effects. Thus, our emerging results suggest that fasudil and statins could be considered for evaluation as preventive agents for breast cancer metastasis.

On the other hand, the recent availability of structural information of many GPCRs documenting that the active form of this family of receptors may adopt multiple conformations (Ratnala and Kobilka, 2009; Rosenbaum et al., 2009) that could selectively engage distinct downstream signaling pathways may provide new avenues to selectively target subsets of CXCR4 signaling activities underlying highly metastatic cancers. There is now ample evidence indicating that different ligands can preferentially activate or inhibit subsets of the G-protein-linked signaling pathways engaged by a given GPCR, and even some GPCR ligands can selectively inhibit one pathway while activating another through

the same receptor (reviewed in (Galandrin et al., 2007). Such pathway selective regulators could represent a path forward for targeting CXCR4 metastatic activity. SDF-1/CXCL12 is the sole agonist for CXCR4, thus SDF-1/CXCL12 is expected to deploy the full repertoire of signaling activity of CXCR4 upon binding to its cognate receptor. While most of the physiological functions of CXCR4 involve the activation of $G\alpha_i$, the finding that the contribution of CXCR4 to breast cancer metastasis requires it coupling to the $G\alpha_{13}$ family of G protein α subunits supports the potential clinical benefit of developing GPCR antagonists or negative allosteric regulators that may specifically prevent the activation of the $G\alpha_{12/13}$-Rho pathway by CXCR4. Indeed, considering that GPCRs are the target directly or indirectly of more than 60% of the current therapeutic agents in the market, we can envision that the development of novel signaling-selective GPCR antagonists may represent a unique opportunity to control the pathological functions of GPCRs while restricting the side effects cause by disrupting their multiple physiological roles. In particular, our present study provided a strong rationale for the future development and evaluation of $G\alpha_{12/13}$-Rho selective CXCR4 inhibitors as part of the emerging armamentarium of mechanism-based metastasis preventive therapies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

184-A1 and MCF-12A normal mammary epithelial cell lines, MCF-10-2A non-tunorigenic mammary epithelial cell line, MCF-7, T-47D, BT-474, BT-549 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines and human epithelial kidney 293-T cells were purchased from ATCC. SUM-149 and SUM-159 human breast cancer cell lines (Flanagan et al., 1999; Valastyan et al., 2009) were purchased from Asterand. Neonatal human dermal lymphatic microvascular endothelial cells were purchased from Lonza. Immortalized human vascular endothelial cells were described previously (Edgell et al., 1983). Cell lines were cultured according to manufacturers' instructions.

Transfections

Nonsilencing control RNA sequence and RhoA silencing RNA sequence (Qiagen) were transfected using the Hiperfect reagent (Qiagen).

Reagents and Antibodies

Recombinant human stromal cell-derived factor 1 alpha, EGF, biotin–conjugated mouse monoclonal anti-CXCR4 antibody and anti-mouse IgG2B isotype antibody were purchased from R&D Systems. Rabbit polyclonal anti-phospho ERK1/2, phospho Akt, Akt, phosphor myosin light chain 2, myosin light chain 2 and GAPDH antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal anti- ERK1/2, Rho, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, α-tubulin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal anti-Rac1 and Cdc42 antibodies were purchased from BD Biosciences. Mouse anti-GFP and HA antibodies were purchased from Covance. AMD3100 octahydrochloride, Clozapine N oxide and Y-27632 dihydrochloride monohydrate were purchased from Sigma. Exoenzyme C3 and pertussis toxin were purchased from List Biological Laboratories. Fasudil was purchased from LC Laboratories.

Plasmid Constructs

Expression vectors for $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{13i5}$, PAK-N, RhoA, RhoA I41 and GFP fused to the RGS domain of PDZ-RhoGEF (GFP-RGS) have been described previously (Basile et al., 2004; Crespo et al., 1994; Fukuhara et al., 2000; Marinissen et al., 2004; Montaner et al., 2004). Expression vector for Gi RASSL was kindly provided by Brian Roth (Armbruster et al., 2007). Lentiviral vector for CXCR4 shRNA, $G\alpha_{12}$ shRNA and $G\alpha_{13}$ shRNA have been described previously (Tan et al., 2006).

Lentivirus Production and Infection

Letniviral stocks were prepared and titrated using 293T cells as the packaging cells as previously reported (Basile et al., 2004). Breast cancer cells were incubated with viral supernatants for 16 h. After that, the cells were returned to normal growth medium. Infected cells were selected with 1 μg/ml puromycin.

Cell Migration Assay

Migration assays were performed using 48-well Boyden chamber with 8μm pore size polyvinyl pyrrolidone-free polycarbonate membrane (NeuroProbe). The membranes were coated with 10μg/ml fibronectin (Gibco) for 16 h. After serum starvation for 16 h, cells were added to the upper chamber and chemoattractant was added to the lower chamber in serum-free DMEM. After incubation for 6 h at 37°C, cells on the upper membrane were removed with a cotton swab and cells on the lower surface were fixed in 100% methanol and stained with Hematoxylin and Eosin. Images were taken of the entire lower surface of the wells, and number of migrated cells were counted (4 wells per conditions). In general, all experiments were repeated at least 3-4 times with similar results.

Collagen Gel Invasion Assay

Collagen gel invasion assay was carried out using collagen type I solution. Briefly, 500μl of collagen gel at the concentration of 2 mg/ml was set within a 12 mm diameter, 0.4μm pore filter transwell (Corning). Then 2 x 10^5 cells in serum-free DMEM were seeded on the collagen gel, and 1ml of DMEM supplemented with chemoattractant was applied underneath the filter. After incubation for 24 h at 37°C, collagen gel was fixed with 4% paraformaldehyde and confocal Z slices were collected from each gel.

Transendothelial Migration Assay

Immortalized human vascular endothelial cells or neonatal human dermal lymphatic microvascular endothelial cells ($1x10^5$) were seeded onto a 6.5 mm diameter, 8μm pore filter transwell (Corning) coated with 10μg/ml of collagen type I and then incubated with complete growth medium for 4 days. The tightness of endothelial barrier was tested by *in vitro* permeability assay as described previously (Gavard and Gutkind, 2006). Indeed, SDF-1 did not promote the permeability of fluorescent dextran under conditions in which the passage of this tracer in response to multiple vascular permeability factors is readily detectable (Gavard and Gutkind, 2006). Breast cancer cells stably expressing GFP or RFP (2×10^5) in serum-free DMEM were seeded on upper chamber and DMEM supplemented with chemoattractant was applied on lower chamber. After incubation for 24 h at 37°C inserts were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. Cells on the upper membrane were removed with a cotton swab and then membranes were mounted on microscope slides. Pictures from 4 inserts per condition were taken, and the number of transmigrated cells was counted.

Flow Cytometric Analysis

Cells were harvested and washed three times with phosphate-buffered saline.Following incubation with biotin-conjugated anti-CXCR4 antibody or isotype control antibody for 60 min at room temperature, the cells were treated with streptavidin-phycoerythrin-conjugated IgG (Vector Laboratories) for 30 min at room temperature and analyzed with a BD Biosciences flow cytometer.

Immunofluorescence

The following antibodies were used for tissue immunofluorescence; goat polyclonal anti-LYVE 1; 1:200 (Abcam), polyclonal rabbit anti-cytokeratin, wide spectrum screening; 1:500 (Dako). Unstained 5μm paraffin sections were dewaxed, hydrated through graded alcohols and distilled water, and washed three times with PBS. Antigens were retrieved

using 10 mmol/L citric acid in a microwave for 20 min. The slides were allowed to cool for 30 min at room temperature, rinsed twice with PBS, and immersed in 3% hydrogen peroxide in PBS for 10 min to quench the endogenous peroxidase. The sections were then sequentially washed in distilled water and PBS and incubated in blocking solution (2.5% bovine serum albumin in PBS) for 30 min at room temperature. Excess solution was discarded and the primary antibody was applied diluted in blocking solution at 4°C overnight. After three washes in PBS, sections were incubated with fluorescein-conjugated secondary antibodies (1:100) for 1 h at room temperature in blocking buffer. Slides were then washed with PBS and mounted with Vectashield (Vector Laboratories).

Immunocytochemistry

MDA-MB-231 cells infected with control or HA-tagged GiRASSL lentivirus were seeded on the coverslips coated with 10 µg/ml of fibronectin. After 24 h of incubation, cells were washed with ice-cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. After washing three times with PBS, cells were incubated with 10% FBS in PBS for 30 min. Fixed cells were incubated with the primary antibody (anti-HA; 1: 150) for 1 h, followed by a 45 min incubation with the secondary antibody (goat anti-mouse Alexa Fluor 488; Invitrogen). Coverslips were then mounted onto glass slides.

Immunoblot Analysis

Cells were lysed at 4 °C in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) supplemented with protease inhibitors (0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin and leupeptin). Equal amounts of proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P; Millipore). The membranes were then incubated with the appropriate antibodies.

Rho GTPase Pull Down Assay

Rho activity in cultured cells was assessed by a modified method described elsewhere. Briefly, after serum starvation for 16 h, cells were treated as indicated and lysed at 4°C in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM EGTA, 40mM β-glycerophosphate, 20mM MgCl2, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM dithiothreitol, 10 μg/mL aprotinin, 10 μg/mL leupeptin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Lysates were incubated with glutathione S-transferase (GST)–rhotekin–Rho binding domain previously bound to glutathione-Sepharose beads and washed 3 times with lysis buffer. Associated GTP-bound forms of Rho, Rac1 or Cdc42 were released with protein loading buffer and analyzed by Western blot analysis using polyclonal antibody against RhoA.

Spontaneous Breast Cancer Metastasis model in SCID mouse

All animal studies were carried out according to National Institutes of Health-approved protocols, in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The spontaneous metastasis model of breast cancer cells was based on prior described studies (Dadiani et al., 2006), as described in detail in Supplemental Methods. In brief, severe combined immunedeficient (SCID/NOD) mice were injected into mammary fat pad with wild type MDA-MB-231 cells (2×10^6) or their indicated mass culture derivatives. Mice were sacrificed at 40 days after injection and organs were collected for histological analysis. For Fasudil experiments, Fasudil or equal volume of PBS was administered through intraperitoneal injections at a dose of 20 mg/kg per day.

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assay

For BRET studies, HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and

streptomycin, all from Wisent. Fourty eight hours before transfection, cells were seeded in pre-treated Poly-L-ornithine hydrobromide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 96-well white plates at a density of 100,000 cells per well. Transient transfections were performed using the linear polyethylenimine (Mw 25000, Polysciences, Warrington, PA) method, with a DNA:polyethylenimine ratio of 2:7. Thirty ng of $G\alpha_{13}$*R*LucII were co-transfected with either an increasing amount of CXCR4-GFP2, ranging from 20ng to 800ng, or with soluble GFP2, ranging from 1ng to 100ng (for control), to perform the titration curves.

The effect of ligands between receptors and $G\alpha_{13}$/$G\alpha_i$ was assessed at maximal BRET values for each of the conditions, with 30ng of either $G\alpha_{13}$*R*LucII or $G\alpha_{i91}$Luc and 800ng of either CXCR4-FP* or 800ng CCR2-FP . SDF1 and MCP1 were added at a final concentration of 200nM, 10 min before reading.

The ligand-induced effect between Gα13 and Gγ7 was done by cotransfecting 200ng of non-tagged CXCR4 receptor with 30ng of $G\alpha_{13}$*R*LucII and 500ng of Gγ7-GFP10. SDF1 was added at a final concentration of 500nM, 10 min before reading.

The expression level of the GFP2 and venus tagged energy acceptor proteins were measured as total fluorescence using a FlexStationII (Molecular Device) with excitation filters at 400 or 485 nm and emission filters at 510 or 538nm, respectively. The expression level of the energy donor (*R*Luc and *R*LucII) tagged proteins were measured using a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) in the presence of 5 μM coelenterazine 400A or coelenterazine h (Biotium, Hayward, CA) for BRET2 or BRET1, respectively, after 5 min incubation.

For BRET measurements, cells were washed once 48 hr after transfection with phosphate buffered saline and coelenterazine 400A or coelenterazine h was added to a final concentration of 5 μM in PBS 5 min before BRET 2 or BRET1 reading, respectively. Readings were then collected using a MITHRAS LB940 multidetector plate reader, allowing the sequential integration of the signals detected in the 480 (±) 20 nm and 530 (±) 20 nm windows for the donor and acceptor light emissions, respectively. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the acceptor over

the light intensity emitted by the donor. The values were corrected by subtracting the background BRET signal detected when the donor construct was expressed alone.

Live Cell Imaging

Live cell imaging was performed using an inverted Zeiss LSM 510 confocal microscopes with samples contained in glass-bottomed MatTek dishes.

Statistical analysis

Statistical analysis of migration assay, transendothelial migration assay and the weight of primary tumors or metastases was performed by unpaired t-test. Asterisks denote statistic significance (NS, $P > 0.05$; *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; and ***$P < 0.001$).

Acknowledgements

This research was supported by the Intramural Research Program of the NIH, NIDCR.

References

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). The Journal of biological chemistry *271*, 20246-20249.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer *4*, 540-550.

Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. Cell *103*, 227-238.

Chikumi, H., Vazquez-Prado, J., Servitja, J.M., Miyazaki, H., and Gutkind, J.S. (2002). Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. The Journal of biological chemistry *277*, 27130-27134.

Conklin, B.R., Hsiao, E.C., Claeysen, S., Dumuis, A., Srinivasan, S., Forsayeth, J.R., Guettier, J.M., Chang, W.C., Pei, Y., McCarthy, K.D*., et al.* (2008). Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. Nature methods *5*, 673-678.

Dadiani, M., Kalchenko, V., Yosepovich, A., Margalit, R., Hassid, Y., Degani, H., and Seger, D. (2006). Real-time imaging of lymphogenic metastasis in orthotopic human breast cancer. Cancer research *66*, 8037-8041.

de Boer, M., van Deurzen, C.H., van Dijck, J.A., Borm, G.F., van Diest, P.J., Adang, E.M., Nortier, J.W., Rutgers, E.J., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M.B*., et al.* (2009). Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. The New England journal of medicine *361*, 653-663.

Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., and Lippman, S.M. (2005). Statins and cancer prevention. Nat Rev Cancer *5*, 930-942.

Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer *7*, 79-94.

Dutt, P., Wang, J.F., and Groopman, J.E. (1998). Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. J Immunol *161*, 3652-3658.

Epstein, R.J. (2004). The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. Nat Rev Cancer *4*, 901-909.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer *3*, 453-458.

Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J.S. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? Oncogene *20*, 1661-1668.

Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., and Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. Trends in pharmacological sciences *28*, 423-430.

Gales, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T.E., and Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. Nature methods *2*, 177-184.

Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. Ann Oncol *20*, 1913-1927.

Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., and Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIbbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. Science (New York, NY *327*, 340-343.

Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. Cell *127*, 679-695.

Gutkind, J.S., Coso, O.A., and Xu, N. (1998). G12 and G13 a subunits of heterotrimeric G proteins: A novel family of oncogenes. In G Proteins, Receptors, and Disease, S.A. M., ed. (Totowa, NJ, Humana Press), pp. 101-117.

Herroeder, S., Reichardt, P., Sassmann, A., Zimmermann, B., Jaeneke, D., Hoeckner, J., Hollmann, M.W., Fischer, K.D., Vogt, S., Grosse, R.*, et al.* (2009). Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. Immunity *30*, 708-720.

Hwang-Verslues, W.W., Kuo, W.H., Chang, P.H., Pan, C.C., Wang, H.H., Tsai, S.T., Jeng, Y.M., Shew, J.Y., Kung, J.T., Chen, C.H.*, et al.* (2009). Multiple lineages of

human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. PloS one *4*, e8377.

Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. Nature medicine *5*, 221-225.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009. CA: a cancer journal for clinicians *59*, 225-249.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2006). Chemokine networks and breast cancer metastasis. Breast disease *26*, 75-85.

Kelly, P., Moeller, B.J., Juneja, J., Booden, M.A., Der, C.J., Daaka, Y., Dewhirst, M.W., Fields, T.A., and Casey, P.J. (2006). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 8173-8178.

Kikuchi, A., Yamamoto, K., Fujita, T., and Takai, Y. (1988). ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1. The Journal of biological chemistry *263*, 16303-16308.

Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D.*, et al.* (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. Cancer cell *6*, 459-469.

Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M.M., Williams, L., and Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. Cancer research *65*, 967-971.

Meigs, T.E., Fields, T.A., McKee, D.D., and Casey, P.J. (2001). Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 519-524.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N.*, et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature *410*, 50-56.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F.*, et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer cell *10*, 515-527.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer *9*, 274-284.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell *121*, 335-348.

Papayannopoulou, T., Priestley, G.V., Bonig, H., and Nakamoto, B. (2003). The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. Blood *101*, 4739-4747.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer *9*, 265-273.

Ratnala, V.R., and Kobilka, B. (2009). Understanding the ligand-receptor-G protein ternary complex for GPCR drug discovery. Methods in molecular biology (Clifton, NJ *552*, 67-77.

Richert, M.M., Vaidya, K.S., Mills, C.N., Wong, D., Korz, W., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2009). Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. Oncology reports *21*, 761-767.

Rikitake, Y., and Liao, J.K. (2005). ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. Expert review of cardiovascular therapy *3*, 441-451.

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature *459*, 356-363.

Rosenfeldt, H., Castellone, M.D., Randazzo, P.A., and Gutkind, J.S. (2006). Rac inhibits thrombin-induced Rho activation: evidence of a Pak-dependent GTPase crosstalk. Journal of molecular signaling *1*, 8.

Smith, M.C., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer research *64*, 8604-8612.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S*., et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10869-10874.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E.J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature *425*, 307-311.

Tamamura, H., Hori, A., Kanzaki, N., Hiramatsu, K., Mizumoto, M., Nakashima, H., Yamamoto, N., Otaka, A., and Fujii, N. (2003). T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. FEBS letters *550*, 79-83.

Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. The Journal of biological chemistry *281*, 39542-39549.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871-890.

Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. Cell *137*, 1032-1046.

Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol *6*, 718-730.

Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. Trends in pharmacological sciences *29*, 582-589.

Xu, N., Bradley, L., Ambdukar, I., and Gutkind, J.S. (1993). A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 6741-6745.

Xu, N., Voyno-Yasenetskaya, T., and Gutkind, J.S. (1994). Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. Biochem Biophys Res Commun *201*, 603-609.

Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. The Journal of pathology *215*, 211-213.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. CXCR4 mediates spontaneous metastatic spread of breast cancer cells

(A) Migratory potential of normal breast and breast cancer cell lines including non-metastatic and metastatic cells. Values represent the average +/- s.e.m. of four wells. (B) SDF-1 induced the migration of MDA-MB-231 cells. Error bars, s.e.m.; n=4. (C) Images of invading MDA-MB-231 cells expressing GFP after 24 h of collagen gel invasion assay. (D) Knock down of the expression of CXCR4 by RNA interfering approach. (E) Knocking down CXCR4 decreases MDA-MB-231 cell migration induced by SDF-1. Error bars, s.e.m.; n=4. **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by SDF-1. (F) Schematic of the vascular and lymphatic *in vitro* intravasation assay model system. (G, H) SDF-1 induces trans-endothelial migration of MDA-MB-231 cells through CXCR4. Images of transmigrated MDA-MB-231 cells expressing GFP after 24h of *in vitro* intravasation assay (G), and quantification (H). Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by SDF-1. (I) Metastatic spread of MDA-MB-231 cells on day 40 following orthotopic injection into the mammary fat pad of SCID/NOD mice. Several metastatic sites are identified by arrow heads. (J) H&E stain of a MDA-MB-231 primary mammary tumor growing into the mammary fat pad, many remaining mammary ducts can be seen (black arrow heads). The inset depicts a ductal structure surrounded by the growing neoplastic cells (upper left). A regional (inguinal) lymph node metastasis; metastases are identified by yellow dotted line (shown in the inset, white arrow), and mammary gland ducts by black arrows (upper right and lower left). Several lung metastases are shown (black arrow heads), with a nearby bronchial structure (star). The likely hematogeneous nature of this spread is depicted in the inset; neoplastic cells are seen within a blood vessel (lower right). (K) Cytokeratin immunohistochemistry (red) of a group of MDA-MB-231 cells free into a lymphatic vessel highlighted by the lymphatic endothelial marker LYVE1 (green). (L) Comparison of the weight of distant metastases between shRNA control and shRNA CXCR4 tumors supports a role for CXCR4 in the spontaneous metastatic spread of breast cancer cells. **$p<0.01$.

Fig. 1

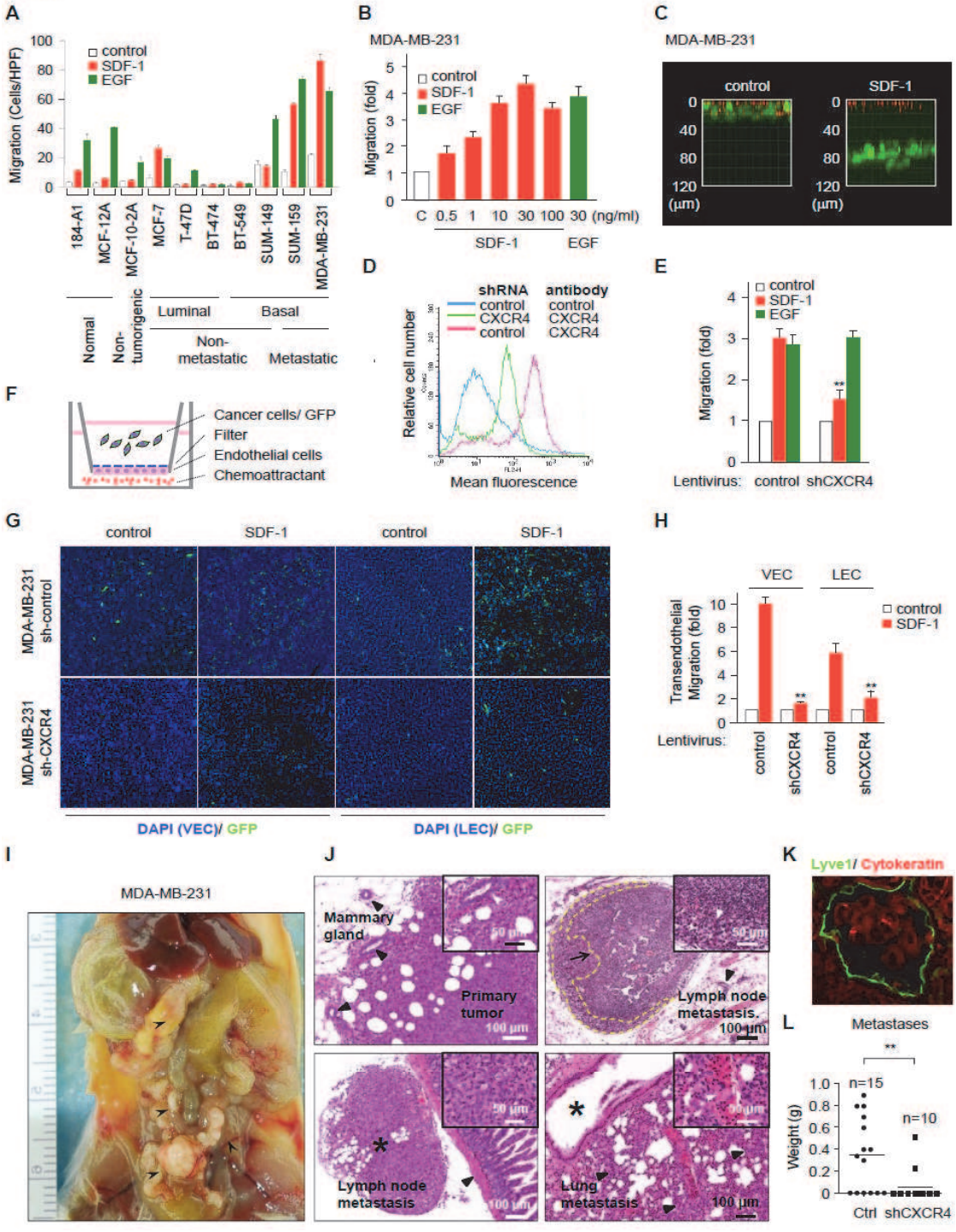

A
Migration (Cells/HPF)
control
SDF-1
EGF
184-A1
MCF-12A
MCF-10-2A
MCF-7
T-47D
BT-474
BT-549
SUM-149
SUM-159
MDA-MB-231
Normal
Non-tumorigenic
Luminal
Basal
Non-metastatic
Metastatic
B
MDA-MB-231
Migration (fold)
C 0.5 1 10 30 100 30 (ng/ml)
SDF-1
EGF
C
MDA-MB-231
control
SDF-1
(μm)
D
shRNA
antibody
control
CXCR4
Relative cell number
Mean fluorescence
E
Migration (fold)
Lentivirus: control shCXCR4
F
Cancer cells/ GFP
Filter
Endothelial cells
Chemoattractant
G
control
SDF-1
MDA-MB-231 sh-control
MDA-MB-231 sh-CXCR4
DAPI (VEC)/ GFP
DAPI (LEC)/ GFP
H
VEC
LEC
Transendothelial Migration (fold)
Lentivirus:
I
MDA-MB-231
J
Mammary gland
Primary tumor
Lymph node metastasis
Lung metastasis
K
Lyve1/ Cytokeratin
L
Metastases
Weight (g)
n=15
n=10
Ctrl shCXCR4

Figure 2. SDF-1 can induce migration of metastatic breast cancer cells independent of PTX-sensitive heterotrimeric proteins of the $G\alpha_i$ family

(A) PTX inhibits the phosphorylation of Akt (Ser473) stimulated by SDF-1 in MDA-MB-231 cells, but (B) does not abolish the migration of MDA-MB-231 or SUM-159 cells evoked by SDF-1. Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by SDF-1. (C, D) $G\alpha_i$ activity is not strictly required to induce trans-endothelial migration of MDA-MB-231 cells promoted by SDF-1. After pretreatment with PTX (50ng/ml) overnight, *in vitro* transmigration activity was assessed as described above. Error bars, s.e.m.; n=4 (E) Schematic of G_i RASSL (receptors activated solely by synthetic ligands). Clozapine N-oxide (CNO) promotes the activation of G_i in cells expressing G_i RASSL. (F) Expression of HA-tagged G_i RASSL in MDA-MB-231 cells. (G) CNO induces phosphorylation of Akt (Ser473) in MDA-MB-231 cells stably expressing G_i RASSL, which is inhibited by PTX (H). (I) CNO fails to induce migration of MDA-MB-231 cells stably expressing G_i RASSL. Error bars, s.e.m.; n=4.

Fig. 2

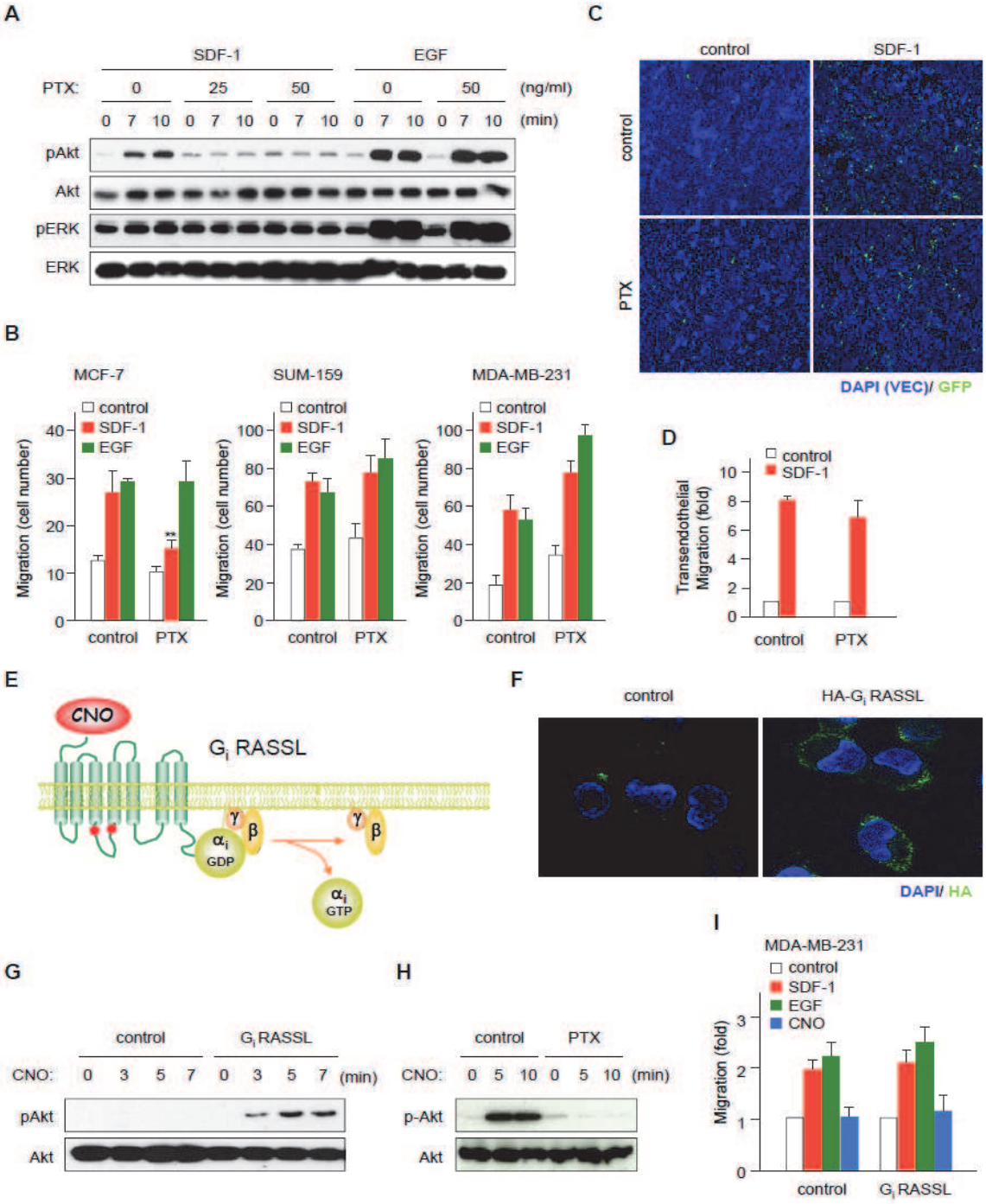

A
SDF-1
EGF
PTX:
0
25
50
0
50
(ng/ml)
0 7 10 0 7 10 0 7 10 0 7 10 0 7 10 (min)
pAkt
Akt
pERK
ERK
B
MCF-7
SUM-159
MDA-MB-231
control
SDF-1
EGF
Migration (cell number)
control
PTX
C
control
SDF-1
control
PTX
DAPI (VEC)/ GFP
D
control
SDF-1
Transendothelial Migration (fold)
control
PTX
E
CNO
G$_i$ RASSL
γ
β
α$_i$ GDP
α$_i$ GTP
F
control
HA-G$_i$ RASSL
DAPI/ HA
G
control
G$_i$ RASSL
CNO:
0 3 5 7 0 3 5 7 (min)
pAkt
Akt
H
control
PTX
CNO:
0 5 10 0 5 10 (min)
p-Akt
Akt
I
MDA-MB-231
control
SDF-1
EGF
CNO
Migration (fold)
control
G$_i$ RASSL

Figure 3. CXCR4/ $G\alpha_{12/13}$/ Rho signaling axis is involved in migration of metastatic breast cancer cells

(A) Time course of Rho activation induced by SDF-1 in MDA-MB-231 and SUM-159 cells. (B) Knock down of CXCR4 expression diminishes phosphorylation of Akt (Ser473) and Rho activation in response to SDF-1 in MDA-MB-231 cells. (C) Rho activation promoted by SDF-1 is independent of PTX-sensitive heterotrimeric G proteins of the $G\alpha_i$ family. Cells pre-treated overnight with serum-free medium with or without PTX (50ng/ml) were stimulated with SDF-1 (100ng/ml) and Rho activation was examined by pull-down assay. (D) Knock down of RhoA by siRNA (E) inhibits the migration of MDA-MB-231 cells stimulated by SDF-1. The migration of MDA-MB-231 cells was examined as described above 48 h after transfection of siRNA-control or siRNA-RhoA. Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by each stimulant. (F) Treatment with C3 toxin inhibits the migration of MDA-MB-231 cells. Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by each stimulant. (G) C3 toxin fails to inhibit migration of MDA-MB-231 cells expressing C3 toxin insensitive mutant of RhoA, RhoA I41, but not RhoA wild type. Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by each stimulant. (H) Schematic of chimeric protein encoding RGS domain of PDZ-RhoGEF fused to GFP. (I, J) Expression of GFP or the GFP-RGS domain of PDZ-RhoGEF in MDA-MB-231 cells. (K) Inhibition of $G\alpha_{12/13}$ suppresses the activation of Rho by SDF-1 in MDA-MB-231 cells. (L) Inhibition of $G\alpha_{12/13}$ prevents cell migration induced by SDF-1. Error bars, s.e.m.; n=4 **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by SDF-1.

Fig. 3

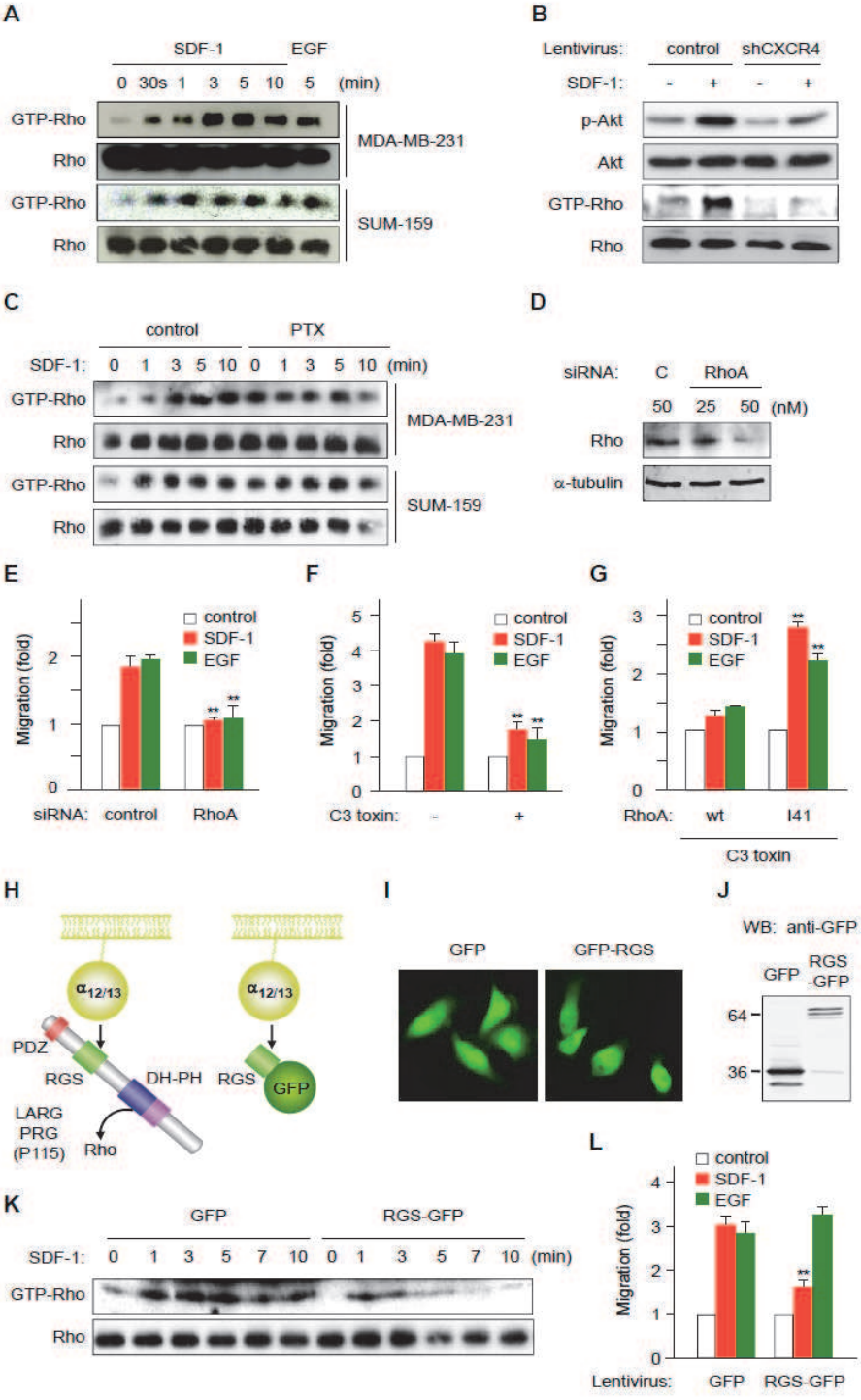

A
SDF-1
EGF
0 30s 1 3 5 10 5 (min)
GTP-Rho
Rho
MDA-MB-231
SUM-159
B
Lentivirus: control shCXCR4
SDF-1: - + - +
p-Akt
Akt
GTP-Rho
Rho
C
control
PTX
SDF-1: 0 1 3 5 10 0 1 3 5 10 (min)
GTP-Rho
Rho
MDA-MB-231
SUM-159
D
siRNA: C RhoA
50 25 50 (nM)
Rho
α-tubulin
E
control
SDF-1
EGF
Migration (fold)
siRNA: control RhoA
F
C3 toxin: - +
G
RhoA: wt I41
C3 toxin
H
α12/13
PDZ
RGS
DH-PH
LARG
PRG
(P115)
Rho
GFP
I
GFP
GFP-RGS
J
WB: anti-GFP
GFP
RGS-GFP
64
36
K
GFP
RGS-GFP
SDF-1: 0 1 3 5 7 10 0 1 3 5 7 10 (min)
GTP-Rho
Rho
L
Lentivirus: GFP RGS-GFP

Figure 4. $G\alpha_{12/13}$ levels correlate with metastatic properties of breast cancer cell lines

(A) Expression of $G\alpha_{12/13}$ in human mammary cell lines. (B) Knock down of $G\alpha_{12/13}$ by lentiviruses carrying $G\alpha_{12}$ shRNA or $G\alpha_{13}$ shRNA. (C) Knock down of $G\alpha_{12/13}$ inhibits Rho activation stimulated by SDF-1 in MDA-MB-231 cells. (D) Knock down of $G\alpha_{12/13}$ prevents the migration of MDA-MB-231 cells stimulated by SDF-1. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with control cells stimulated by SDF-1. (E) Knock down of $G\alpha_{12/13}$ inhibits metastatic spread of MDA-MB-231 cells injected to mammary fat pads of SCID/NOD mice. Black arrows indicate primary tumors and arrow heads indicate distant metastases. (F) Scatter plot of the weight of primary tumors and metastatic sites for MDA-MB-231 cells infected with lentivirus-shRNA control versus lentivirus-shRNA $G\alpha_{12/13}$. NS, no significant difference, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with control. (G) Principle of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) I suggest to write FP (fluorescent protein) instead of GFP/venus both in the cartoon (and legends?) to make it more simple for the readers; Also I did a correction as the Gi is tagged with RLuc and not RLucII and suggest to call it D (for donor) in the cartoon. (H) Specificity of interaction between $G\alpha_{13}$ RlucII and CXCR4 GFP2. (I) A conformational change is promoted between $G\alpha_{13}$ RlucII and CXCR4 GFP2 but not between $G\alpha_{13}$ RlucII and CCR2 GFP2 by their cognate ligands. Error bars, s.e.m.; n=4 *p<0.05 compared with control in each group. (J) A conformational change is promoted between $G\alpha_{i91}$ Rluc and CXCR4 venus and also between $G\alpha_{i91}$ Rluc and CCR2 venus by their cognate ligands. Error bars, s.e.m.; n=4 *p<0.05 compared with control in each group.

Fig. 4

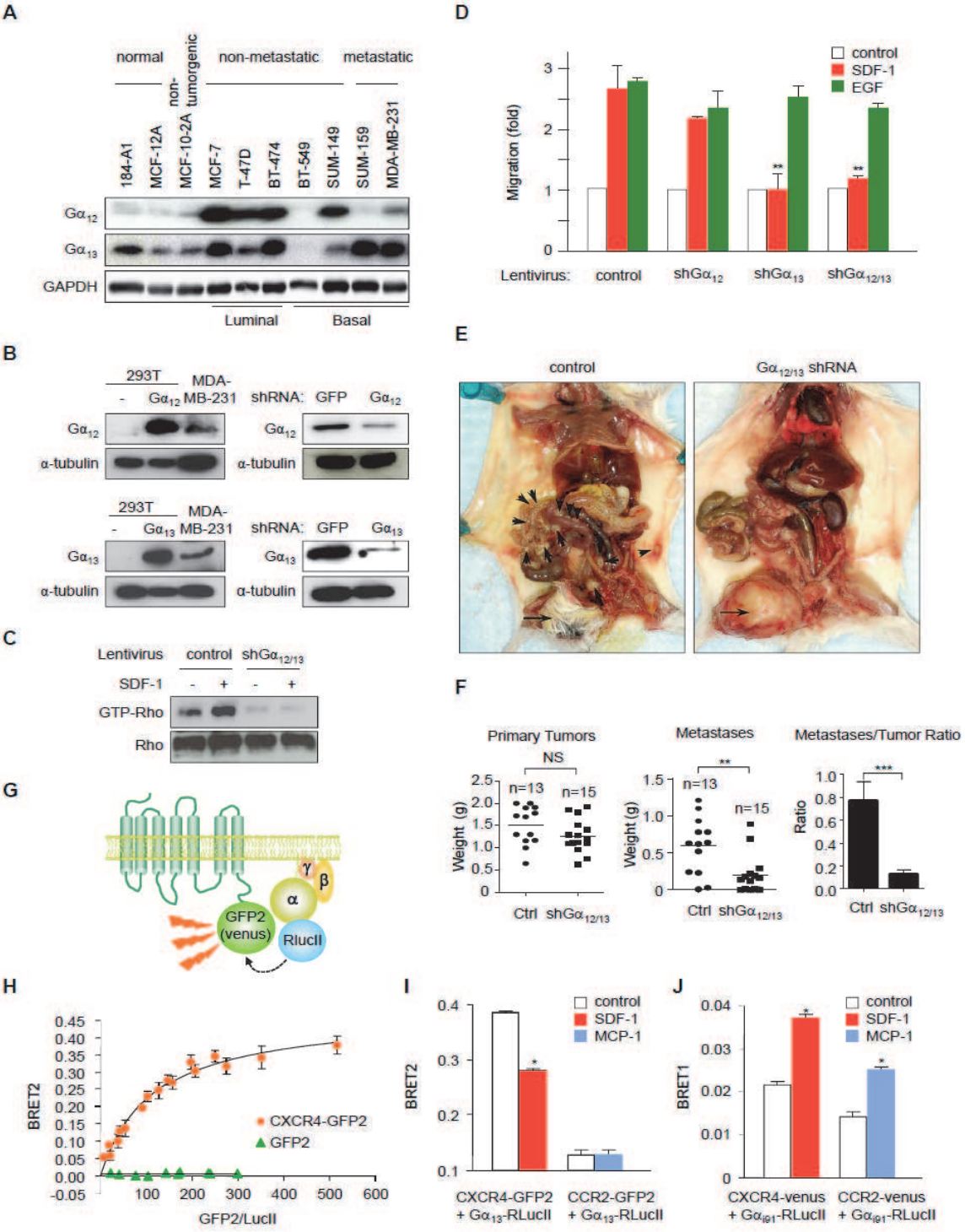

A
normal
non-tumorgenic
non-metastatic
metastatic
184-A1
MCF-12A
MCF-10-2A
MCF-7
T-47D
BT-474
BT-549
SUM-149
SUM-159
MDA-MB-231
Gα12
Gα13
GAPDH
Luminal
Basal
B
293T
MDA-MB-231
shRNA: GFP Gα12
Gα12
α-tubulin
293T
MDA-MB-231
shRNA: GFP Gα13
Gα13
α-tubulin
C
Lentivirus control shGα12/13
SDF-1 - + - +
GTP-Rho
Rho
D
control
SDF-1
EGF
Migration (fold)
Lentivirus: control shGα12 shGα13 shGα12/13
E
control
Gα12/13 shRNA
F
Primary Tumors
NS
Weight (g)
n=13
n=15
Ctrl shGα12/13
Metastases
**
Weight (g)
n=13
n=15
Ctrl shGα12/13
Metastases/Tumor Ratio
***
Ratio
Ctrl shGα12/13
G
γ
β
α
GFP2 (venus)
RlucII
H
BRET2
CXCR4-GFP2
GFP2
GFP2/LucII
I
control
SDF-1
MCP-1
BRET2
CXCR4-GFP2 + Gα13-RLucII
CCR2-GFP2 + Gα13-RLucII
J
control
SDF-1
MCP-1
BRET1
CXCR4-venus + Gαi91-RLucII
CCR2-venus + Gαi91-RLucII

Figure 5. The migration of metastatic breast cancer cells requires the activation of $G\alpha_{13}$/Rho signaling axis. A synthetic biology approach.

(A) Schematic of cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. CNO promotes the activation of $G\alpha_{13}$ in cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. (B) Expression of $G\alpha_{13i5}$ in HEK-293T cells. (C) CNO induces activation of ERK and Rho in HEK-293T cells co-expressing G_i RASSL and Ga_{i3i5}. (D) CNO induces the migration of HEK-293T cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with cells without stimulation. (E) Expression of $G\alpha_{13i5}$ in MDA-MB-231 cells stably expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. (F) CNO induces Rho activation in MDA-MB-231 cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. (G) CNO induces migration of MDA-MB-231 or SUM-159 cells stably expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with cells without stimulation. (H) Images of invaded MDA-MB-231 cells expressing G_i RASSL and GFP or G_i RASSL, $G\alpha_{13i5}$ and RFP after 24 h of collagen gel invasion assay.

Fig. 5

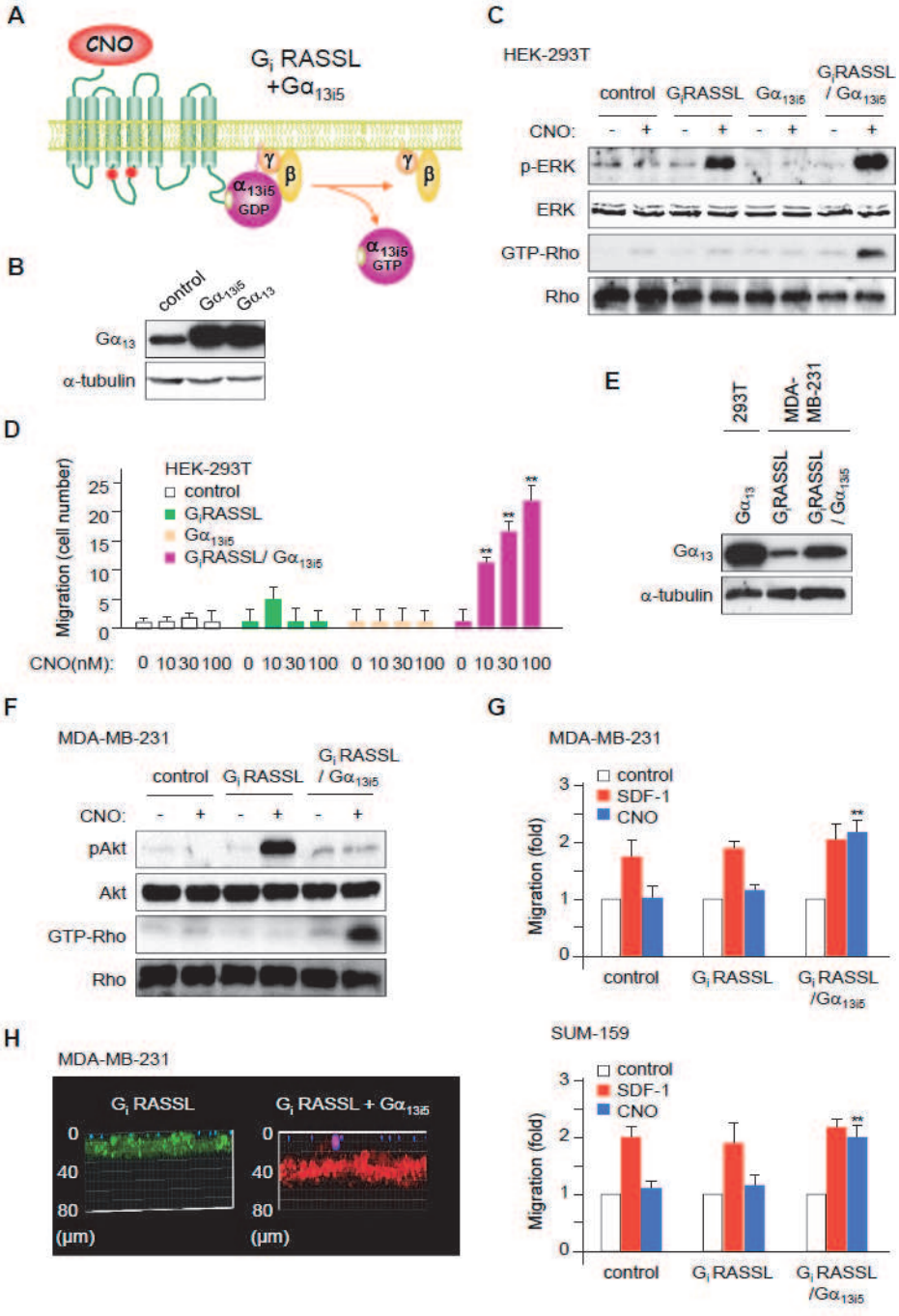
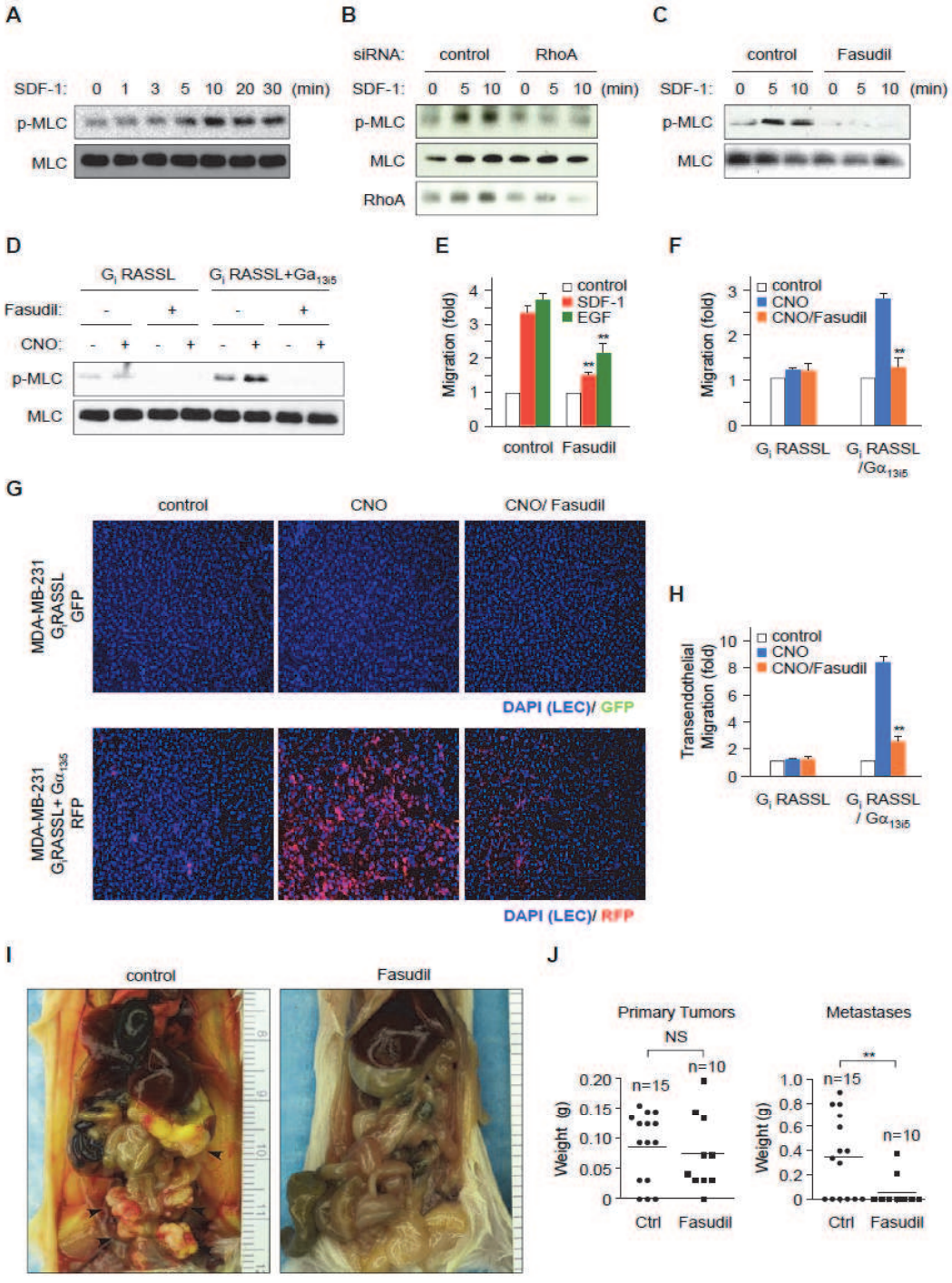

A
CNO
Gi RASSL
+Gα13i5
γ
β
α13i5
GDP
α13i5
GTP
B
control
Gα13i5
Gα13
Gα13
α-tubulin
C
HEK-293T
control
GiRASSL
Gα13i5
GiRASSL
/ Gα13i5
CNO:
- + - + - + - +
p-ERK
ERK
GTP-Rho
Rho
D
HEK-293T
control
GiRASSL
Gα13i5
GiRASSL/ Gα13i5
Migration (cell number)
25
20
15
10
5
0
**
**
**
CNO(nM): 0 10 30 100 0 10 30 100 0 10 30 100 0 10 30 100
E
293T
MDA-MB-231
Gα13
GiRASSL
GiRASSL
/ Gα13i5
Gα13
α-tubulin
F
MDA-MB-231
control
Gi RASSL
Gi RASSL
/ Gα13i5
CNO:
- + - + - +
pAkt
Akt
GTP-Rho
Rho
G
MDA-MB-231
control
SDF-1
CNO
Migration (fold)
3
2
1
0
**
control
Gi RASSL
Gi RASSL
/Gα13i5
H
MDA-MB-231
Gi RASSL
Gi RASSL + Gα13i5
0
40
80
(μm)
0
40
80
(μm)
SUM-159
control
SDF-1
CNO
Migration (fold)
3
2
1
0
**
control
Gi RASSL
Gi RASSL
/Gα13i5

Figure 6. ROCK inhibitors provide a molecular targeted therapy for breast cancer metastasis

(A) Time course of phosphorylation of MLC induced by SDF-1 in MDA-MB-231 cells. (B) Knock down of RhoA inhibits the activation of MLC stimulated by SDF-1. (C) Fasudil inhibits MLC phosphorylation stimulated by SDF-1. (D) Fasudil blocks the activation of MLC induced by CNO in MDA-MB-231 cells expressing both G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. (E) Fasudil inhibits cell migration promoted by SDF-1. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with control cells stimulated by each stimulant. (F) Fasudil prevents migration of MDA-MB-231 cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$ induced by CNO. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with control cells stimulated by each stimulant. (G, H) CNO-induced lymphatic transendothelial migration of MDA-MB-231 cells stably expressing G_i RASSL, $G\alpha_{13i5}$ and RFP was blocked by Fasudil. Error bars, s.e.m.; n=4 **p<0.01 compared with control cells stimulated by each stimulant. (I) Fasudil inhibits metastatic spread of MDA-MB-231 cells injected into mammary fat pads of SCID/NOD mice. Arrow heads indicate metastases. (J) Scatter plot of weight of primary tumors and metastatic sites for control versus Fasudil treated group. NS, no significant difference and **p<0.01 compared with control.

Fig.6


A
SDF-1: 0 1 3 5 10 20 30 (min)
p-MLC
MLC
B
siRNA: control RhoA
SDF-1: 0 5 10 0 5 10 (min)
p-MLC
MLC
RhoA
C
control Fasudil
SDF-1: 0 5 10 0 5 10 (min)
p-MLC
MLC
D
G$_i$ RASSL
G$_i$ RASSL+Ga$_{13/5}$
Fasudil:
CNO:
p-MLC
MLC
E
Migration (fold)
control
SDF-1
EGF
control Fasudil
F
Migration (fold)
control
CNO
CNO/Fasudil
G$_i$ RASSL
G$_i$ RASSL /Gα$_{13/5}$
G
control
CNO
CNO/ Fasudil
MDA-MB-231 G$_i$RASSL GFP
DAPI (LEC)/ GFP
MDA-MB-231 G$_i$RASSL+ Gα$_{13/5}$ RFP
DAPI (LEC)/ RFP
H
Transendothelial Migration (fold)
control
CNO
CNO/Fasudil
G$_i$ RASSL
G$_i$ RASSL / Gα$_{13/5}$
I
control
Fasudil
J
Primary Tumors
NS
n=15
n=10
Weight (g)
Ctrl
Fasudil
Metastases
**
n=15
n=10
Weight (g)
Ctrl
Fasudil

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. CXCR4 mediates spontaneous metastatic spread of breast cancer cells, related to Figure1

(A, B) CXCR4 levels correlates with prognosis of breast cancer patients. Compiled from publicly available data accessible on Oncomine using a threshold p value of 0.01. Scatter plot of relative microarray signal intensities for CXCR4 in normal mammary samples versus breast cancer samples (Oncomine, Richardson_Breast_2) (A) and primary breast carcinomas, having a good prognosis versus a poor prognosis (Oncomine, vandeVijver_Breast) (B). (C) SDF-1 induces migration of metastatic breast cancer cells, SUM-159. Cell migration induced by various concentration of SDF-1 was assessed as described in figure 1A. (D) AMD3100 inhibits the migration induced by SDF-1. MDA-MB-231 cells were treated with the indicated concentration of AMD3100 and their migration toward wells containing SDF-1 (30 ng/ml) or EGF (30 ng/ml) were measured and represented as for figure 1A. **$p<0.01$ compared with SDF-1-induced migration without AMD3100. n=4. (E, F) AMD3100 inhibits *in vitro* transmigration activity induced by SDF-1. MDA-MB-231 cells expressing GFP were treated with 50 ng/ml of AMD3100 and their transmigration toward wells containing SDF-1 (50ng/ml) was measured and represented as for figure.1G and 1H. **$p<0.01$ compared with control cells stimulated by SDF-1. n=4. (G) Knock down of CXCR4 has no effect on the size of primary tumor but inhibits metastatic spread of MDA-MB-231 cells. (H) Scatter plot of weight of primary tumors for MDA-MB-231 cells infected with lentivirus-shRNA control versus lentivirus-shRNA CXCR4.

Supplemental Figure 1

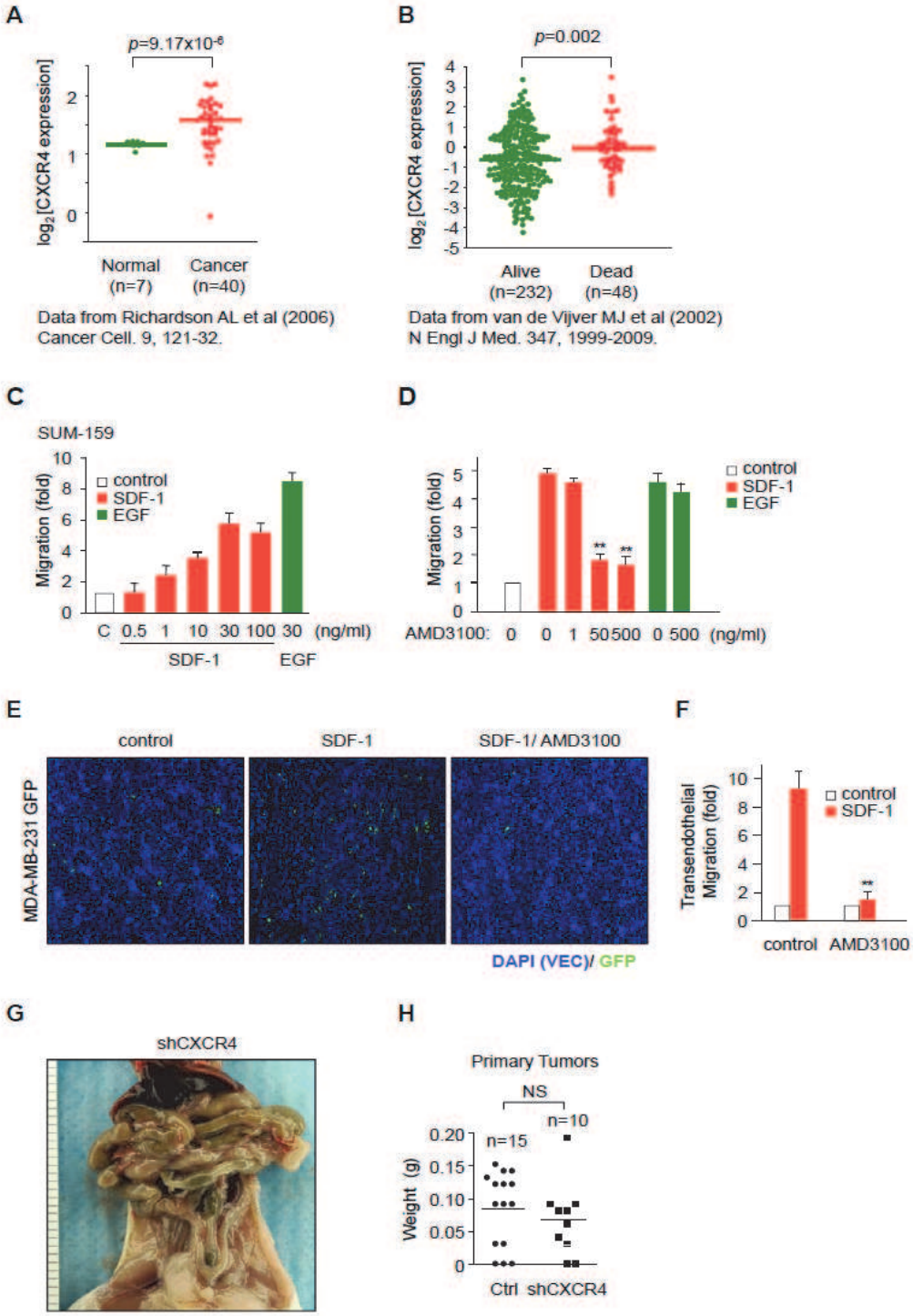


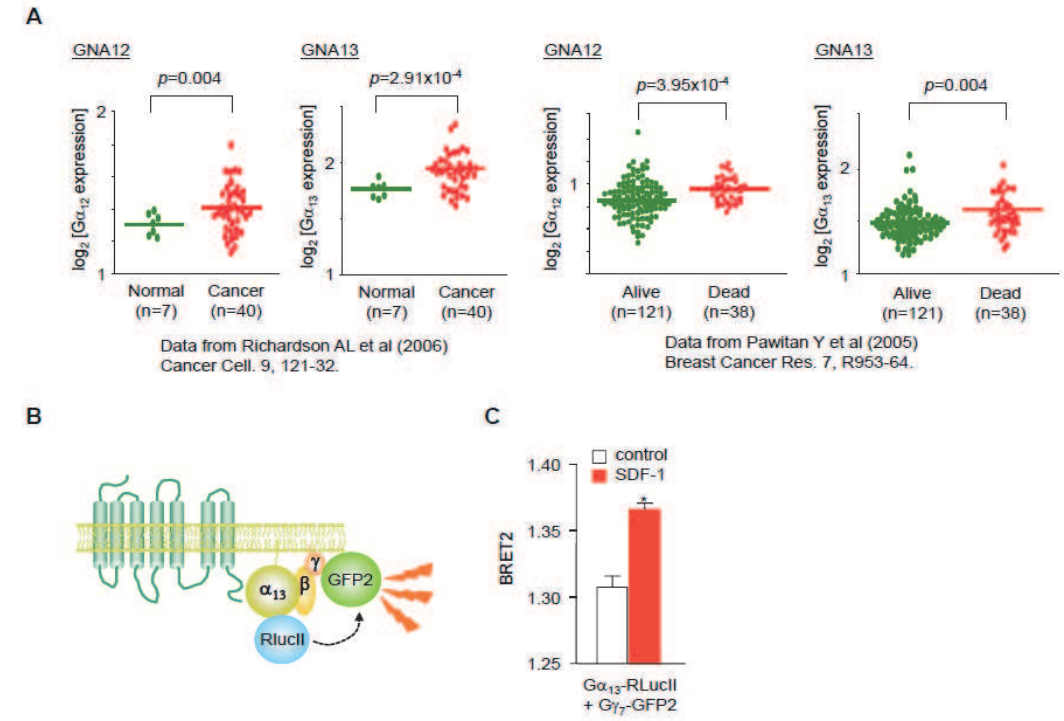
Figure S2. $G\alpha_{12/13}$ levels correlate with prognosis of breast cancer patients and metastatic properties of breast cancer cell lines, related to Figure 4

(A) Scatter plot of relative microarray signal intensities for $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{13}$ in normal mammary samples versus breast cancer samples (Oncomine, Richardson_Breast_2) and in primary breast carcinomas, having a good prognosis versus a poor prognosis (Oncomine, Pawitan_Breast). (B) Principle of bioluminescence resonance energy transfer (BRET). (C) A conformational change is promoted between $G\alpha_{13}$ RlucII and $G\gamma_7$ GFP2 by SDF-1.

Figure S3. The migration of metastatic breast cancer cells requires the activation of $G\alpha_{13}$/Rho signaling axis. A synthetic biology approach, related to Figure 5.

(A) CNO induces Rho activation in SUM-159 cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. Cells were serum starved overnight and stimulated with CNO (30nM) for 5 min. The activation of Rho in cell lysates was analyzed by pull-down assay. (B) Images of MDA-MB-231 cells expressing G_i RASSL/ GFP or G_i RASSL/ $G\alpha_{13i5}$/ RFP. (C) Cells were serum starved overnight and stimulated with CNO (30nM) for 5 min. The activation of Akt (Ser473) or Rho in cell lysates was analyzed by Western blot or pull-down assay.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3

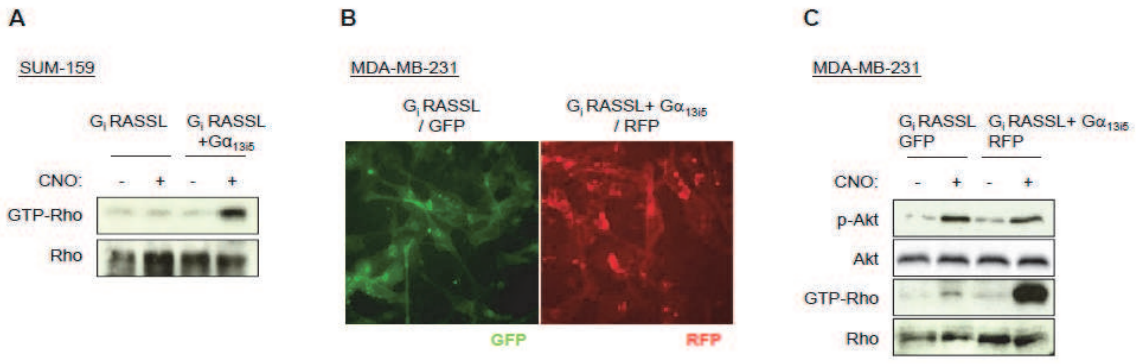
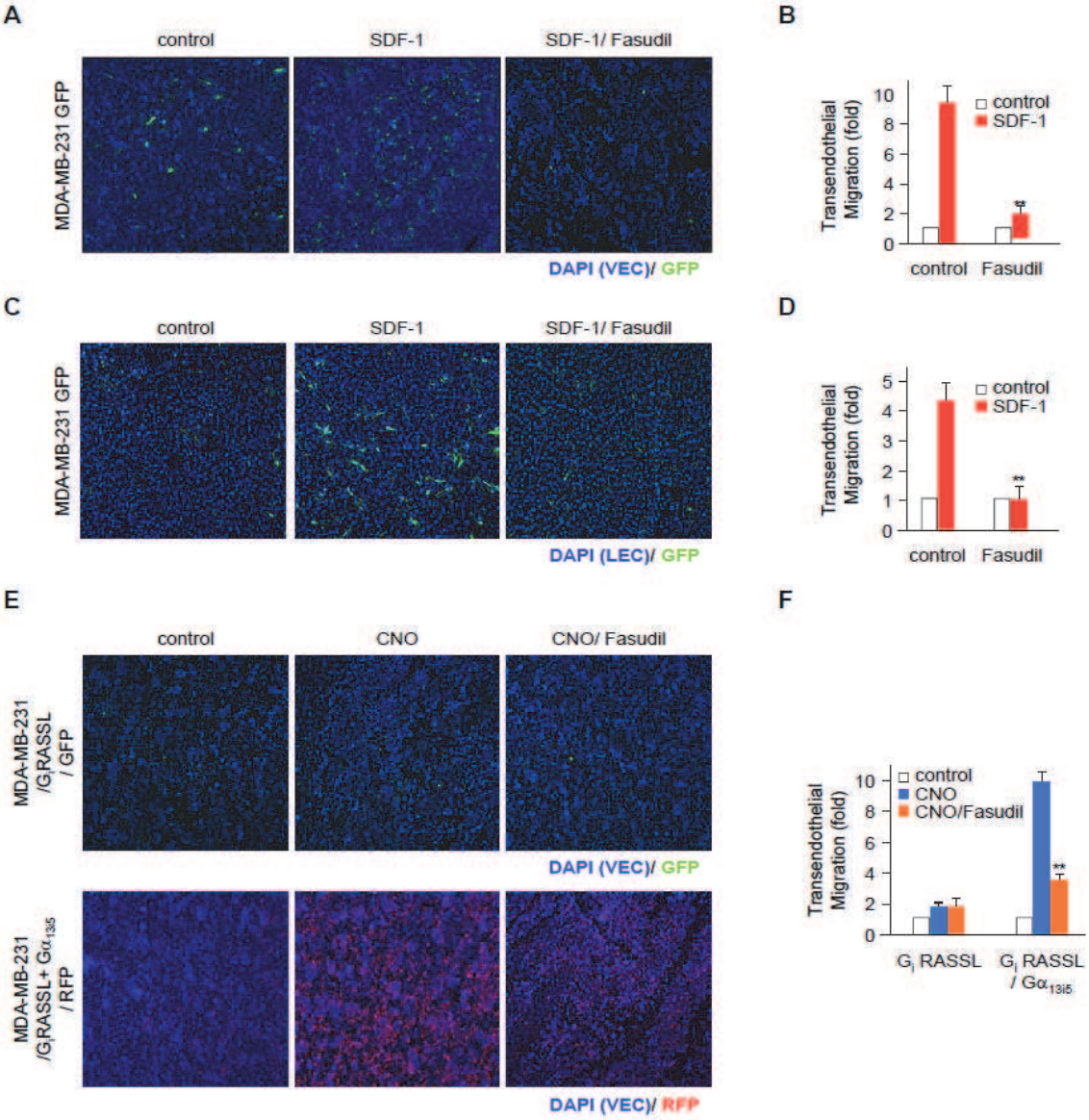


Figure S4. ROCK inhibitors provide a molecular targeted therapy for breast cancer metastasis, related to Figure 6.

(A, B, C, D) Fasudil inhibits migration of MDA-MB-231 cells through vascular (A, B) or lymphatic (C, D) endothelial monolayers induced by SDF-1. After pretreatment with or without 10nM of Fasudil for 30 min, *in vitro* intravasation activity of MDA-MB-231 cells expressing GFP induced by 50ng/ml of SDF-1 was assessed as described in figure 1G and 1H. **p<0.01 compared with control cells stimulated by SDF-1. n=4. (E, F) Fasudil prevents transendothelial migration induced by CNO of MDA-MB-231 cells co-expressing G_i RASSL and $G\alpha_{13i5}$. After pretreatment with Fasudil (10μm) for 30 min, *in vitro* transmigration activity through vascular endothelial monolayer was assessed as described in figure 1G and 1H. **p<0.01 compared with control cells stimulated by each stimulant. n=4.

Supplemental Figure 4



Discussion

La perspective de décrypter le génome d'un organisme au complet était il y a vingt ans un rêve inespéré qui promettait dans beaucoup d'esprits d'expliquer la biologie cellulaire; comprendre ses mécanismes, et traiter ses dysfonctions. Après être parvenu à séquencer le génome humain et des centaines d'autres, de la bactérie à l'animal, le bilan apparait très différent; nous sommes effectivement devant un nombre fini de gènes et de protéines, mais aussi et surtout face à un réseau d'interactions géniques et protéiques d'une complexité et d'une subtilité inestimable. La diversité générée par ces interactions permettrait d'expliquer que deux espèces ayant un nombre semblable de gènes puissent présenter des écarts d'évolution très marqués. Chez les vertébrés, les domaines protéiques auraient évolué en permettant un plus grand nombre de combinaisons avec d'autres partenaires; par exemple, le domaine apparenté à la trypsine des sérines protéases pourrait lier 18 autres types de domaines protéiques chez l'humain alors qu'il ne lierait que 5 domaines chez le ver (Molecular Cell Biology, 5ème édition). Mais ces interactions expliquent surtout comment un même organisme, ou même une seule cellule de cet organisme, peut générer une variété de réponses qu'il ne pourrait atteindre par la seule fonction du nombre total de ses protéines. Une protéine va s'associer a une autre pour inhiber sa fonction, la potentialiser, ou générer une nouvelle fonction que les deux sous-unités ne peuvent accomplir indépendamment; de nombreux complexes nécessitent même l'assemblage de plusieurs sous-unités pour exercer leur rôle cellulaire. L'avantage des associations protéiques est qu'elles sont un processus réversible et contrôlable qui n'utilise qu'une faible quantité d'information génétique. Le contrôle temporel de la présence d'une protéine est effectué grâce à la régulation de l'expression des gènes et de la durée de vie des protéines. Le contexte spatial, c'est à dire l'expression de la protéine dans un type cellulaire ou même dans un compartiment cellulaire est également un aspect fondamental de cette régulation. Les voies de transduction du signal activées en réponse à la stimulation des récepteurs cellulaires que sont les RCPG sont un exemple documenté de la complexité des

signaux pouvant résulter d'interactions protéiques suite à la liaison d'un messager extracellulaire. La régulation de la signalisation par ces facteurs d'échange du GDP peut s'effectuer par leur homo ou hétéro oligomérisation mais aussi par la diversité des interactions protéiques subséquentes. La détection des interactions protéine-protéine est donc un aspect fondamental de la compréhension des mécanismes cellulaires qui explique le grand nombre de méthodes développées pour les mettre en évidence : la co-immunoprécipitation, les essais pull-down, la technique de double-hybride, la purification d'affinité en tandem, les pontages chimiques croisés (cross link) et de nombreuses autres. Si ces méthodes se sont avérées extrêmement fructueuses pour mettre en évidence toute sorte de complexes protéiques, elles ne renseignent pas sur la dynamique de ces interactions en temps réel et très rarement sur leur localisation cellulaire. En ce sens, le clonage de la GFP et la génération de ses variants représentent une révolution puisque leur utilisation en microscopie a permis de suivre visuellement une protéine et d'identifier ses inter-acteurs ou partenaires par co-localisation dans des compartiments définis. De plus, elles ont donné naissance aux essais de complémentation de fluorescence (BiFC) et aux techniques de transfert d'énergie par résonance (RET) qui permettent de s'affranchir des problèmes de résolution spectrales de la microscopie et d'étudier les interactions protéiques avec des outils à leur format.

Choix méthodologiques et contrôles.

Résumé

Les résultats présentés dans la première partie de l'article 1 démontrent que l'activation du récepteur CCR2 est capable d'engendrer une augmentation du signal de BRET au sein du dimère CXCR4-*R*Luc / CXCR4-vYFP de manière dépendante à la dose de MCP-1, que nous interprétons comme un changement conformationnel. En combinant ensuite le BRET à un essai de PCA impliquant deux récepteurs CXCR4 fusionnés au PCA *R*LucII et un récepteur CCR2 fusionné à la vYFP, nous nous sommes assurés que le

changement conformationnel impliquait l'interaction directe des récepteurs au sein du complexe oligomérique. Comme les résultats d'études précédentes démontraient que CCR2 et CXCR4 pouvaient former des homodimères mais également des hétérodimères entre eux, nous avons testé et confirmé l'hypothèse selon laquelle le complexe de récepteurs était composé d'un dimère de CXCR4 en interaction avec un dimère de CCR2 par une approche de BRET combinée à un double essai PCA. Par la même méthode, nous avons enfin démontré que CXCR4 pouvait former des homotétramères et que l'interaction des quatre protomères était modulable par le SDF-1. Le choix des méthodes de BRET, BRET-PCA et les contrôles qu'elles requièrent seront discutés dans cette première partie, ainsi que l'améliorations technique du PCA luciférase qui a permis d'obtenir ces résultats et ceux présentés dans l'article 4 en annexe.

Rationnelle de l'étude d'un complexe entre CXCR4 et CCR2.

Des dizaines d'études utilisant des méthodes très diverses ont démontré l'existence d'homo et hétérodimères de RCPG. Les divers artéfacts de détection pouvant résulter en des faux positifs doivent nous inciter à multiplier les contrôles d'une part, et d'autre part à vérifier la pertinence biologique de l'interaction entre deux RCPG. Les récepteurs CXCR4 et CCR2 sont coexprimés dans les monocytes, les basophiles, les lymphocytes T mémoire, et les cellules dendritiques (Viola and Luster, 2008). La validité biologique de l'interaction de ces deux récepteurs a tout d'abord été démontrée par le fait que la coopérativité négative entre CXCR4 et CCR2 avait une conséquence fonctionnelle; en effet, la liaison d'un agoniste inverse ou d'un antagoniste sur un des deux récepteurs de l'hétérodimère est capable d'inhiber la signalisation calcique et la migration induite par l'agoniste du second récepteur (Sohy et al., 2007). De plus, dans cette même étude, les auteurs démontrent également la coopérativité négative entre CXCR4 et CCR2 sur des lymphocytes T CD4+ exprimant les deux récepteurs de manière endogène. Une autre étude utilisant des cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) a révélé qu'un anticorps anti-CCR2 ne modifiant pas la liaison de MCP-1 ni la signalisation de CCR2 pouvait inhiber l'infection

des cellules par la souche X4 du VIH-1. En effet les auteurs démontrent que l'hétérodimérisation des récepteurs endogènes CCR2 et CXCR4 induite par l'anticorps suffisait à inhiber la fusion virale par CXCR4, et proposent donc un mécanisme permettant de bloquer l'infection par le VIH-1 en agissant en *trans* sur le récepteur CCR2 (Rodriguez-Frade et al., 2004). En plus de leur coexpression dans plusieurs types cellulaire, ces travaux démontrent donc une interaction fonctionnelle entre les récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR2. Les rôles potentiels de l'association de plus de deux récepteurs seront discutés plus loin.

Localisation des dimères de récepteurs à la membrane de cellules vivantes.

Au début de l'étude sur l'oligomérisation des récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR2, le choix s'est orienté vers les techniques de transfert d'énergie car nous voulions avoir une preuve de l'existence des complexes d'ordre supérieur dans des cellules vivantes; de plus, cette approche pouvait permettre de suivre la dynamique des protomères entre eux, notamment les possibles changements conformationnels des protomères induits par le ligand. L'utilisation du BRET plutôt que du FRET est justifiée par le fait que l'on s'affranchi alors des problèmes de photoblanchiement, d'autofluorescence, et d'excitation simultanée du donneur et de l'accepteur. L'avantage majeur du FRET sur le BRET est de pouvoir localiser l'interaction protéique dans des compartiments sub-cellulaires en microscopie, ce qui n'étais pas requis dans cette étude. Il était en revanche important de vérifier la localisation des récepteurs à la surface cellulaire pour s'assurer que les signaux de BRET enregistrés ne provenaient pas d'une accumulation dans le RE. Or l'étude de Percherancier *et al*. qui a servi de base à ces travaux avait démontré que la stimulation des homo et hétéro-dimères de récepteurs CXCR4 et CCR2 avaient la propriété d'engendrer une augmentation du signal de BRET basal (Percherancier et al., 2005); comme les chimiokines SDF-1 et MCP-1 sont des peptides qui ne peuvent traverser la membrane plasmique, cette variation du signal fournissait la preuve suffisante que les récepteurs

activés ne se situaient pas dans un compartiment intracellulaire. De plus, la localisation d'un dimère en microscopie BRET est désormais accessible grâce aux mutants de la *Renilla* Luciférase, les *R*Luc8 et *R*LucII. En effet, l'augmentation significative du rendement quantique de ces deux variants permet de détecter la luminescence et le transfert d'énergie avec un ratio signal/bruit et des temps d'acquisition tout à fait acceptables. Le dimère CXCR4-RLucII / CXCR4-vYFP a ainsi été visualisé en membrane à la surface cellulaire par microscopie TIRF avec un temps d'acquisition de seulement 10 secondes (figure 19).

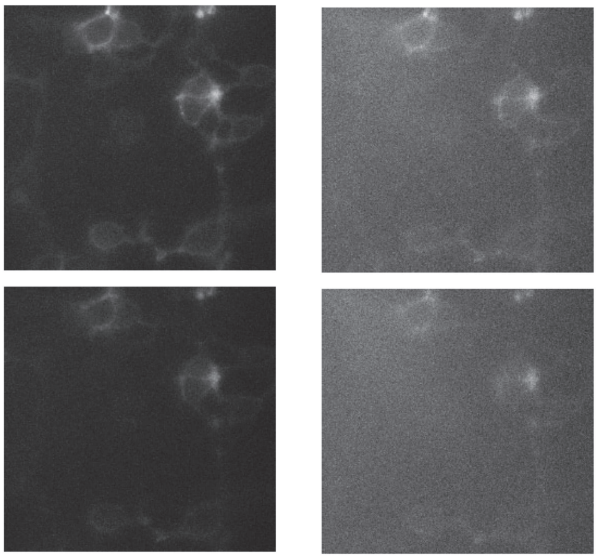


Figure 19 : Visualisation du dimère CXCR4 en microscopie BRET

Images obtenues pour une exposition de 10 secondes avec un objectif 60x 1,4NA Nikon TIRF et une caméra EMCCD (Cascade II). La première colonne est non filtrée (luminescence totale) et la deuxième est filtrée à 530nm (BRET). La ligne du bas est obtenue après photoblanchiement. La perte de signal entre l'image en haut à droite et en bas à droite représente donc la lumière émise à 530nm par la YFP grâce au transfert d'énergie.

Changement conformationnel trans-récepteur détecté en BRET.

Nous avions donc la confirmation que l'augmentation du signal de BRET entre CXCR4-*R*Luc et CXCR4-vYFP en réponse au SDF-1 relevait de la modulation de leur interaction en membrane (figure 1a). Les résultats de la figure 1b démontrent que l'activation de CCR2 engendre une augmentation de BRET entre CXCR4-RLuc et CXCR4-vYFP de manière dépendante de la dose de MCP-1. Cet effet, que nous interprétons comme un changement conformationnel trans-récepteur, n'avait été observé auparavant que dans des complexes impliquant deux récepteurs. Par exemple, une étude de l'équipe du Dr. Lohse a utilisé le FRET intramoléculaire dans le récepteur α_{2A}-AR pour démontrer que le changement conformationnel induit par son ligand, la noradrénaline, était inhibé par l'activation du récepteur opioïde μOR avec lequel il forme un hétérodimère, après traitement avec la morphine (Vilardaga et al., 2008). L'augmentation du signal de BRET que nous observons à la figure1b peut cependant être indirect et résulter de l'activation d'une voie de signalisation par CCR2, qui modifierait l'état conformationnel de CXCR4 par un changement d'environnement protéique. Les expériences en BRET-PCA menées par la suite nous ont démontré que ces trois récepteurs étaient en interaction directe, et donc que la conformation du dimère CXCR4 pouvait être modifiée en réponse directe à celle de CCR2. Le fait que les trois récepteurs interagissent directement n'élimine cependant pas la possibilité qu'une voie de signalisation engagée par CCR2 soit impliquée, mais trois arguments supplémentaires nous ont confortés dans ce sens. D'abord, une expérience préliminaire à cette étude réalisée par le co-auteur Y.Percherancier montre que le signal de BRET du dimère CXCR4 est affecté par la stimulation de CCR2 sur des préparations membranaires en présence de PTX (Figure non montrée). Cette expérience exclue donc à priori l'implication d'une voie de signalisation engagée par CCR2. D'autre part, le contrôle utilisé dans la figure 1b qui consiste à vérifier l'absence d'effet de la stimulation du récepteur dopaminergique D2 sur le dimère CXCR4 a un double rôle. Il permet de s'assurer que l'interaction directe entre le dimère de CXCR4 et CCR2 est spécifique et qu'un autre RCPG n'a pas le même effet sur CXCR4, mais aussi que la stimulation de ce récepteur contrôle, qui est couplé à la protéines $G\alpha_i$ comme CCR2, n'influence pas la conformation

de CXCR4 *via* la protéine Gαi ou ses voies de signalisation. Enfin, il a été démontré que le peptide dérivé du domaine TMIV de CXCR4 pouvait inhiber en partie le changement conformationnel entre CXCR4 et CCR2 suite à la stimulation par le MCP-1, ce qui implique la transmission du changement conformationnel par un contact direct entre les deux protomères (Percherancier et al., 2005). Aucune de ces hypothèses ne peut cependant exclure que l'augmentation de BRET au sein du dimère CXCR4 en réponse à la stimulation de CCR2 résulte d'une combinaison d'effets directs et indirects, à savoir d'un changement conformationnel propagé et de l'intervention de protéines recrutées par CCR2 respectivement.

Détection de complexes d'ordre supérieur de RCPG par BRET combiné à la méthode de PCA.

Les méthodes disponibles permettant de détecter plus de deux membres dans un complexe protéique sont très rare. Avant l'amélioration des techniques de transfert d'énergie, seule la co-immunoprécipitation séquentielle utilisant trois épitopes différents avait permis de révéler une interaction directe entre 3 récepteurs, dans le cas des récepteurs muscariniques M2 (Park and Wells, 2004). Cependant, comme mentionné auparavant, cette technique requiert l'usage de détergents et la solubilisation des protéines, ce qui peut entraîner plusieurs artéfacts dans la détection de complexes protéiques. Les transferts d'énergie séquentiels ou combinés à l'approche PCA permettant de visualiser l'interaction de trois ou quatre protéines en temps réel dans des cellules vivantes représentent donc une avancée majeure de cette dernière décennie. Le 3-FRET représente une méthode intéressante pour détecter l'interaction entre 3 RCPG (Lopez-Gimenez et al., 2007). Comme démontré dans la figure 13 de l'introduction, l'interaction des trois partenaires est attestée par le transfert d'énergie successif entre la CFP, la YFP et la DsRed; l'inconvénient est qu'il existe aussi un transfert d'énergie direct entre la CFP et la DsRed qui oblige à effectuer une correction du signal. Une interaction entre les récepteurs A_{2A} de l'adénosine, cannabinoïde CB1 et D_2 de la dopamine a aussi été démontrée par une technique de RET

séquentiel appelée SRET (Carriba et al., 2008). Cette méthode consiste en un premier transfert d'énergie BRET entre la *R*Luc et la YFP ($SRET_1$) ou la GFP2 ($SRET_2$), où l'excitation de l'accepteur BRET permet un transfert d'énergie à l'accepteur FRET final, la DsRed pour le $SRET_1$ et la YFP pour le $SRET_2$. L'effet n'a pas cependant pu être reproduit dans notre laboratoire du fait que la YFP accepte directement l'énergie de la RLuc et qu'il serait impossible de distinguer ce signal de celui du transert RLuc-GFP-YFP (Breton et al., 2010).

Le fait que ces techniques impliquent des limitations majeures en terme de sensibilité et qu'elles ne permettent la détection que de trois protéines simultanément, nous ont conduit à choisir une méthode utilisant le PCA simple et double. Un avantage majeur de l'utilisation de la luciférase tronquée (BiLC) ou de la vYFP tronquée (BiFC) dans une interaction protéine – protéine « simple » par rapport au transfert d'énergie est que l'analyse de FRET par exemple se base sur une différence d'intensité ou de temps de ½ vie de fluorescence lorsque les deux fluorophores sont seuls ou dans le même complexe. En revanche, la BiFC se base sur la reconstitution d'un complexe fluorescent à partir de deux fragments non fluorescents; cette analyse est donc par nature plus sensible puisque variant sans ambiguïté entre un signal ou une absence de signal. En revanche, un des désavantages de la BiFC, notamment avec la vYFP utilisée dans cette étude, est que la complémentation des fragments est irréversible, empêchant donc toute dissociation subséquente des protéines d'intérêt. Nous avons pu nous affranchir de ce problème en utilisant préférentiellement le PCA luciférase dans les interactions entre trois partenaires car il a été démontré que l'association de ce PCA était complètement réversible (Stefan et al., 2007). La reconstitution de deux hémifragments de luciférase ou de v-YFP donnent des signaux de luminescence inférieurs aux protéines natives, ce qui affecte le transfert d'énergie détecté (Kerppola, 2006). Il était donc préférable d'utiliser la méthode de RET la plus sensible possible pour pouvoir distinguer les signaux spécifiques du bruit de fond. Pour les raisons énoncées plus haut qui affectent beaucoup la sensibilité du FRET, il était donc justifié de choisir le BRET pour le combiner à l'approche en double PCA. Les premiers essais effectués avaient pour but de déterminer si CXCR4 pouvait former un tétramère; ce

récepteur a été choisi, plutôt que CCR2, en raison de sa forte expression et des signaux de BRET importants que le dimère générait dans le système hétérologue de cellules HEK293 transfectées de manière transitoire. Si un transfert d'énergie était visible entre le dimère de CXCR4 fusionné à la *R*Luc tronquée au niveau de l'acide aminé 110 (voir tableau V) (Stefan et al., 2007) et le dimère de CXCR4 fusionnée à la vYFP tronquée en position 156 (Heroux et al., 2007), les signaux sortaient à peine du bruit de fond, principalement dû à une émission trop faible de la luminescence du PCA luciférase.

Le double mutant de la luciférase *R*LucII (voir tableau III) a permis de générer le PCA *R*LucII également tronqué en position 110, qui génère environ 6,5 fois plus de lumière que le précédent (figure 20).

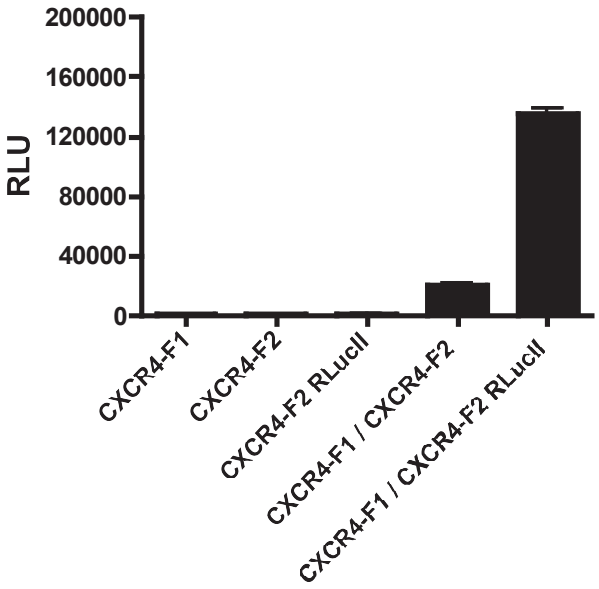


Figure 20 : Luminescence PCA *R*LucII

Signaux de luminescence détectés pour l'expression des deux fragments individuels des PCA-*R*Luc et PCA *R*LucII et pour leur reconstitution.

Détection d'un trimère Stau1 en BRET-PCA

La génération du PCA *R*LucII a été un apport technique significatif dans la détection de complexes multi-protéiques en BRET. Dans une collaboration avec l'équipe du Dr. Desgroseillers (article en annexe), l'approche BRET combinée au PCA *R*LucII nous a permis de révéler que Stau-1, une protéine de liaison de l'ARN double brin impliquée dans l'adressage des protéines dans des régions cellulaires spécifiques, était un complexe oligomérique impliquant au moins 3 partenaires. La validation de la spécificité d'interaction entre trois protéines Stau1 a pu être évaluée grâce à une courbe de titration; cet essai n'aurait pas été envisageable avec la version non mutée du PCA-*R*Luc. Aussi, pour savoir si l'ARN était requis pour l'assemblage de Stau1, le BRET-PCA a du être réalisé en présence de RNAse dans un lysat cellulaire. La modification du pH due à l'utilisation d'un tampon de lyse altère l'émission de lumière par la luciférase et cette expérience de BRET n'aurait sans doute pas pu être effectuée sans la version modifiée du PCA-*R*LucII

Détection d'homo et hétéro-tétramères CXCR4 en BRET-double PCA

Le défi majeur pour détecter une interaction entre trois ou quatre protéines en BRET est donc d'avoir un signal de donneur suffisant pour palier la faible probabilité de reconstitution du PCA en présence d'un ou deux partenaires supplémentaires respectivement. Cette tâche a été accomplie avec succès pour le trimère CXCR4 par co-transfection du CXCR4-vYFP dans un premier temps (figure non montrée), puis avec le récepteur CCR2-vYFP (figure 2a). L'interaction basale entre le dimère de CXCR4 fusionné au PCA-*R*LucII et le récepteur CCR2-vYFP confirmait donc une interaction directe entre les trois récepteurs. L'augmentation du signal de BRET en réponse au traitement par le MCP-1 corroborait l'hypothèse d'un changement conformationnel trans-récepteur impliquant au moins 3 protomères.

Comme les récepteurs CXCR4 et CCR2 peuvent chacun former des homodimères, et en avançant l'hypothèse que le dimère serait l'unité fonctionnelle d'un RCPG, notre intuition était que les oligomères seraient plus vraisemblablement des tétramères que des

trimères. L'utilisation d'une *Vénus* tronquée (tableau IV), comme accepteur d'énergie du PCA-*R*LucII nous a permis par la suite de détecter l'association de quatre récepteurs CXCR4 en simultané dans des cellules vivantes (figure 4a), mais aussi de confirmer que le changement conformationnel trans-récepteur observé juste avant (figures 1b et 2a) impliquait l'interaction directe d'un dimère de CCR2 avec un dimère de CXCR4 (figure 3a). C'était la première fois que l'interaction entre deux dimères différents était démontrée; de plus, dans le cas de cet hétéro-tétramère comme dans le cas de l'homotétramère CXCR4, la spécificité d'interaction a pu être confirmée par la modulation du signal de BRET entre les quatre partenaires après stimulation par le MCP-1 et le SDF-1 respectivement. En effet la variation de proximité des quatre récepteurs en réponse à l'agoniste qui se trouvent constitutivement à une distance permissive pour le transfert d'énergie peut être considérée comme une preuve de spécificité d'interaction. La modulation du signal de BRET par l'agoniste n'avait jamais été rapportée auparavant pour un tétramère, ce qui oblige à réaliser des courbes de titration complexes (voir chapitre suivant) ou utiliser des méthodes alternatives telles que le pontage chimique de cystéines entres les TM pour valider la spécificité d'interaction des quatre partenaires (Guo et al., 2008).

Contrôle de la spécificité d'interaction en BRET et BRET-PCA.

Comme dans toute méthode de détection d'interaction protéine – protéine, la spécificité de l'interaction doit être évaluée rigoureusement en BRET. Même si leur localisation en membrane est vérifiée, les RCPG peuvent interagir de manière aléatoire dû à leur surexpression et leur confinement dans des zones membranaires limitées et générer un signal de BRET basal aspécifique. La méthode habituelle pour discriminer une interaction spécifique d'une collision aléatoire en BRET est l'utilisation des courbes de titration (figure 9). Si ce contrôle est aisé à mettre en place dans le cas d'un dimère de RCPG, les contraintes techniques deviennent majeures dans l'étude de complexes d'ordre supérieur. L'objectif qui est de saturer tous les donneurs d'énergie en cotransfectant une quantité croissante d'accepteurs devient problématique dans le cas d'un tétramère où deux

hémifragments de luciférase fusionnés au premier dimère et deux hémifragments de v-YFP fusionnés au second doivent être coexprimés. La formation d'un tétramère permettant le transfert d'énergie par reconstitution des deux PCA représente alors une probabilité de 1/35 (figure 21).

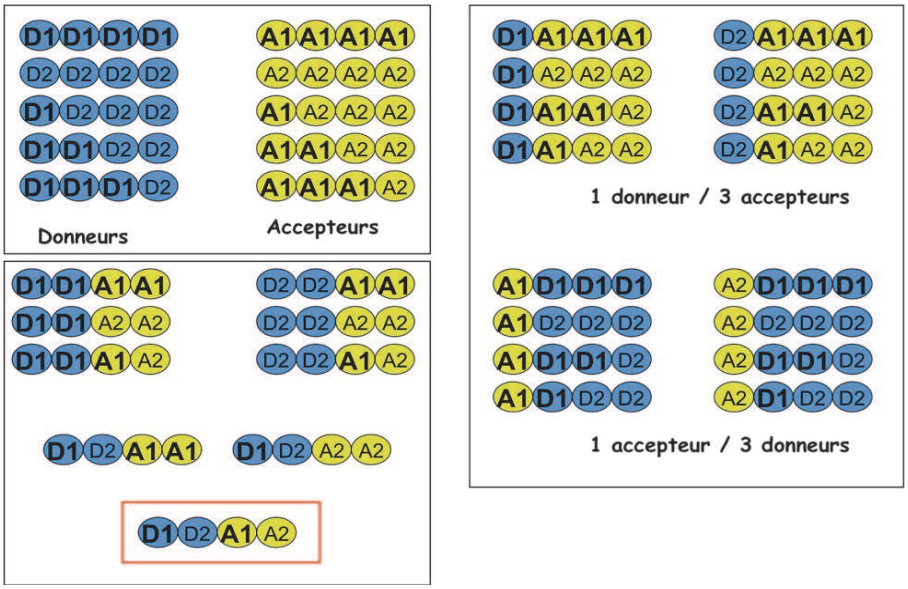


Figure 21 : Probabilité de reconstitution BiLC-BiFC

Il existe une configuration sur 35 permettant de générer un transfert d'énergie.

L'augmentation de l'expression des accepteurs pour réaliser la titration fait diminuer encore cette probabilité en favorisant les tétramères composés seulement d'accepteurs et entrent en compétition avec la formation de donneurs. La diminution de luminescence inhérente à la surexpression d'accepteurs modifie le ratio brut accepteur/donneur et oblige à réaliser des matrices avec différentes quantités de donneurs pour réaliser la titration dans des conditions rigoureuses. La transfection de grandes quantités de récepteurs-BiLC et de récepteurs-BiFC augmentent également le risque de travailler dans des conditions d'expression supra-physiologiques. Dans l'article 1, le changement de BRET induit par le ligand a été utilisé comme contrôle de spécificité

d'interaction entre deux dimères de CXCR4, mais aussi entre un dimère de CXCR4 et un dimère de CCR2.

Etude moléculaire du changement de BRET induit par le ligand.

L'augmentation du signal de BRET entre deux RCPG suite à la liaison de l'agoniste est rarement observée dans la littérature, et il n'avait encore jamais été démontré entre 4 récepteurs. Son utilité en tant que contrôle de la spécificité d'interaction mais aussi comme témoin potentiel de l'activité du récepteur en font un outil qu'il aurait été intéressant d'appliquer à d'autres RCPG. En ce sens, nous avons essayé de déterminer pourquoi ce changement était visible avec le récepteur CXCR4 avec une telle fenêtre dynamique, et non sur la majorité des autres RCPG. Le « linker » ou espaceur est une courte séquence d'acides aminés qui fait le lien entre la protéine d'intérêt et le domaine protéique rapporteur qui lui est fusionné. Il est attendu que la composition de sa séquence et sa longueur influencent le signal puisque le BRET dépend de l'orientation et de la distance entre les deux fluorophores. L'hypothèse de base était que dans le cas du récepteur CXCR4, la composition des acides aminés structurait assez le linker pour que le changement conformationnel du récepteur puisse être transmis jusqu'au niveau du fluorophore. Le linker 1 de séquence KPGDPPARAT qui donne la meilleure fenêtre dynamique (linker 1 avec le donneur + linker 1 avec l'accepteur effet maximum = 0,28 +/- 0,02 Unités BRET) a donc été remplacé soit dans une des fusions, soit dans les deux, par le linker 2, de taille semblable mais composé des acides aminés GSGGGGSA (figure 22). De manière intéressante, on peut voir sur la figure 22 que l'insertion du linker 2 sur les protéines de fusion accepteur et donneur (linker 2 + linker 2) abolit quasiment l'effet de ligand induit par le SDF-1 (effet maximum = 0,07 +/- 0,02 Unités BRET), alors que le mélange des deux linkers donne un effet intermédiaire (linker 1+ linker 2, effet maximum = 0,149 +/- 0,018).

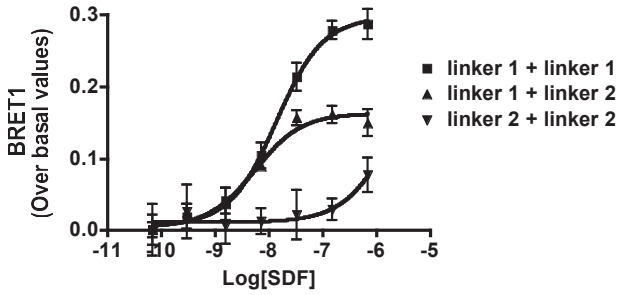


Figure 22 : Influence du linker sur le changement de BRET .

Le différents linkers sont testés sur le dimère CXCR4-*R*Luc et CXCR4-vYFP après stimulation avec un dose croissante de SDF-1..

Ces résultats démontraient que le linker influence de manière importante le changement de BRET du dimère CXCR4 induit par le SDF-1; nous avons alors décidé d'introduire le linker 1 sur d'autres fusions de RCPG pour essayer d'obtenir les mêmes effets. La fusion par le linker 1 du récepteur des prostaglandines F (FP) et du récepteur du facteur d'agrégation plaquettaire (PAF) aux donneurs et accepteurs d'énergie ne donnèrent cependant aucun changement de BRET induit par leurs ligands respectifs PGF2α et cPAF (Figure 23).

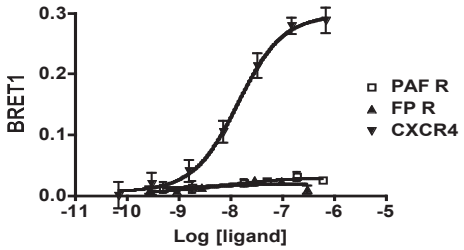


Figure 23 : Absence d'effet du linker sur d'autres dimère de RCPG

Le linker 1 n'influence pas le BRET du dimère FP-R et du dimère PAF-R suite à la stimulation par leurs agonistes.

La composition du linker joue donc un rôle important dans le changement de BRET induit par le ligand, mais l'application n'est pas généralisable à d'autres RCPG. Il se pourrait que l'effet observé avec CXCR4 soit une propriété intrinsèque de ce récepteur; notamment, l'extrémité C-terminale de CXCR4 n'est pas palmitoylée, contrairement à celle de la plupart des RCPG (Nguyen and Taub, 2002). L'absence de palmitoylation, qui sert de point d'ancrage à la sortie du TMVII, pourrait expliquer un plus grand degré de liberté de l'extrémité C-terminale du récepteur (Wu et al., 2010) à laquelle sont fusionnées les protéines donneur et accepteur en BRET. Le coté C-terminal du TMVII qui contient le motif NPXXY subit des changement conformationnels importants lors de l'activation du récepteur en réponse à la liaison du ligand (Rosenbaum et al., 2009) qui pourraient être transmis plus facilement jusqu'aux protéines de fusion en absence de l'ancrage créé par le palmitate.

Il est intéressant de noter que le SDF-1 engendre un changement de BRET important dans le cas du tétramère CXCR4 (figure 4a), alors que les PCA *R*LucII et vYFP sont fusionnés avec des linkers plus longs que ceux décrits précédemment et composés d'un enchaînement de Glycines et de Serines comme le linker 2. Ceci confirme que les caractéristiques du récepteur sont sans doute plus importantes que celles du linker dans l'effet observé, mais amène également à la question qui fait débat pour le dimère, à savoir de déterminer si SDF-1 induit la formation de tétramères par association de deux dimères ou si l'effet observé est dû à un changement de conformation au sein d'un tétramère préformé. Une explication possible des importants changements de BRET induits par le ligand dans le cas de CXCR4 serait que la chimiotaxie induite par SDF-1 engendre la relocalisation membranaire des récepteurs et leur accumulation dans certaines zones. Cette hypothèse sera approfondie ultérieurement.

Formation de complexes d'ordre supérieur.

Si l'on assume que les oligomères de RCPG existent et qu'ils sont assemblés dès leur biosynthèse dans le RE, deux possibilités de formation de tétramères sont envisageables. D'abord, les tétramères, comme les dimères, seraient formés dans le RE puis exportés à la membrane plasmique. Dans le cas du récepteur adrénergique α_{1b}, l'intégrité des deux domaines d'interaction TMI et TMIV serait nécessaire à son assemblage en trimère dans le RE et un prérequis à son adressage membranaire à la surface (Lopez-Gimenez et al., 2007). Une autre hypothèse serait que les dimères soient formés dans le RE et que les tétramères soient assemblés à la surface par association de deux dimères. Une étude explore actuellement cette question concernant les récepteurs A_{2A} de l'adénosine qui peuvent former au moins des trimères (Gandia et al., 2008). En effet des résultats non encore publiés suggèrent que l'inhibition du transport antérograde des protéines du RE vers l'appareil de Golgi par la bréfeldine A provoquerait l'accumulation du dimère A_{2A} dans les compartiments intracellulaires mais pas des oligomères d'ordre supérieur. Ce fonctionnement serait d'une importance majeure puisque il apporterait la possibilité d'une régulation dynamique de l'assemblage de deux dimères en réponse à une stimulation ou à un environnement cellulaire particulier.

Le fait que deux dimères de nature différente (figure 3a) puisse s'assembler conduit à s'interroger sur la notion d'hérérodimérisation en tant qu'interaction entre deux monomères. Selon les résultats obtenus (figure 3a), les hétérodimères pourraient en effet résulter de l'association de deux dimères de nature différente; ce modèle fournirait alors un schéma simple pour expliquer que certains récepteurs forment des homodimères et des hétérodimères, comme CXCR4 et CCR2. Comme mentionné plus haut, les homodimères seraient les unités fonctionnelles des RCPG, assemblés dès leur biosynthèse pour permettre leur export du RE, et les hétéro-oligomères se formeraient plus tard, vraisemblablement en à la surface cellulaire, par association de deux homodimères. Une des raisons de ce fonctionnement serait de permettre l'association de deux familles de récepteurs à faible degré d'homologie pour générer une entité avec une nouvelle fonction. Si les RCPG

doivent obligatoirement être en dimère pour sortir du RE, l'interaction préférentielle entre deux récepteurs identiques privilégierait les homodimères et annihilerait la diversité apportée par les hétérodimères. Les interfaces multiples d'interaction permettraient en revanche l'association de différents homodimères en membrane et un gain de diversité. En fonction des niveaux d'expression des différents homodimères, la seconde interface pourrait néanmoins permettre la formation d'homotétramères. Cette hypothèse doit cependant être nuancée puisque l'on sait déjà que le récepteur GABAb est un hétérodimère obligatoire qui se forme dans le RE, et que le tétramère est le résultat de l'homodimérisation des hétérodimères (Maurel et al., 2008). D'autre part, les formes immatures des récepteurs V1a et V2 ont pu être immunoprécipitées en hétérodimères ainsi qu'un signal de BRET de ce complexe détecté à partir de fractions enrichies de membranes de RE, suggérant que certains hétérodimères au moins s'assemblent tôt durant leur biosynthèse (Terrillon et al., 2003)**.** L'hypothèse d'homodimérisation d'hétérodimères préformés est donc plausible aussi. Il est important de garder à l'esprit qu'une dizaine d'études à peine rapportent aujourd'hui l'existence de complexes de RCPG d'ordre supérieur; même si ce faible nombre de cas est peut être dû aux limitations techniques qui viennent juste d'être franchies, les oligomères de plus de deux récepteurs ne sont sans doute pas généralisable à tous les RCPG (Rives et al., 2009).

Hypothèse structurale.

Les travaux de Percherancier *et al*. rapportent qu'un peptide issu du TMIV de CXCR4 inhibe le changement conformationnel induit par SDF-1 mesuré par l'approche BRET et la production d'AMPc par CXCR4 (Percherancier et al., 2005). Sur la base de ces données fonctionnelles et de la structure tridimensionnelle du dimère de CXCR4 (Wu et al., 2010), on peut donc émettre l'hypothèse d'une double interface de contact dont la première impliquerait les TMV et VI et la seconde le TM IV (Figure 24).

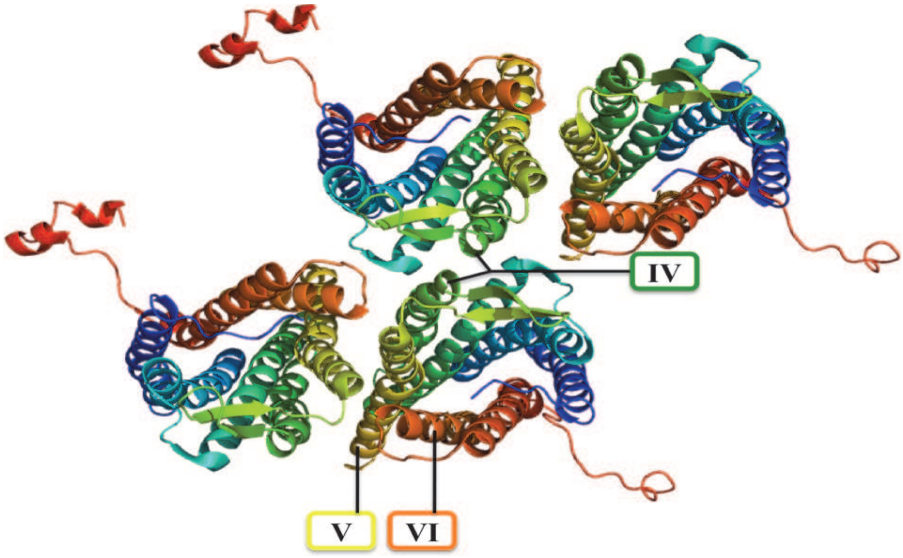


Figure 24 : Représentation de la structure quaternaire potentielle d'un tétramère CXCR4

Figure réalisée à partir du logiciel PyMol et du pdb 3ODU

Rôles potentiels.

Comme mentionné plus haut, l'assemblage de deux dimères différents pourrait être la manière d'obtenir ce que nous qualifiions d'hétérodimères, et d'apporter une diversité supplémentaire dans la signalisation des RCPG.

Une autre possibilité pourrait expliquer la formation de ces complexes. La migration initiée par les chimiokines engendre une polarisation de la cellule et de la machinerie de signalisation intracellulaire. Il a été démontré que CXCR4 était uniformément distribué à la surface de cellules immobilisées sur un endothélium en absence de stimulation, et que l'ajout de SDF-1 permettait la redistribution des récepteurs sur le front de migration (van Buul et al., 2003). Les auteurs rapportent également que le regroupement des récepteurs CXCR4 se ferait dans des zones correspondant à des radeaux lipidiques et que la présence des radeaux serait nécessaire à la migration, l'internalisation, et à la polarisation. La

polarisation de la cellule et la formation d'un front de migration regroupant les récepteurs pourraient expliquer l'augmentation du signal de BRET observé pour les récepteurs CXCR4. La capacité de former des tétramères ou des oligomères supérieurs faciliterait ce regroupement en formant des structures quaternaires plus compactes. L'association des récepteurs serait aussi un moyen de diminuer leur mobilité latérale pour rester positionnés sur le front de migration en absence de stimulation continue. De manière intéressante, une autre étude avait déjà mentionné l'importance de la localisation de CXCR4 dans les radeaux lipidiques; les résultats démontraient que la migration de cellules cancéreuses était inhibée par la déplétion des radeaux, mais aussi que cet effet pouvait être reproduit par un peptide issu du TMIV de CXCR4 capable d'atténuer le signal de FRET entre deux protomères CXCR4 (Wang et al., 2006).

Les résultats de cette première partie démontrent que les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 peuvent former des homo et hétéro tétramères, et que l'activation d'un dimère de CCR2 peut modifier la conformation d'un dimère CXCR4. De manière intéressante, ils constituent une explication potentielle à la *trans* inhibition allostérique qui a été observée entre ces deux récepteurs (Sohy et al., 2007). La modification du site de liaison de CXCR4 serait au moins en partie la conséquence d'un réarrangement induit par l'activation de CCR2.

La seconde partie de la discussion aborde le rôle potentiel du changement conformationnel trans récepteur sur l'engagement des protéines G et de la β-arrestine.

Engagement d'une protéine G par un dimère de récepteur.

Les résultats présentés dans la figure 5 démontrent l'engagement de la protéine $G\alpha_{i1}$ par un dimère de récepteurs CXCR4, qui se traduit par une variation du signal de BRET entre les trois partenaires. Un signal basal est observé entre le dimère de CXCR4 fusionné au PCA v-YFP et la $G\alpha_i$ fusionnée à la *R*Luc en trois positions différentes. La stimulation

par SDF-1 entraîne une augmentation du signal de BRET pour deux des positions ($G\alpha_{i91}$ et $G\alpha_{i60}$) alors qu'une diminution est observée pour la troisième position ($G\alpha_{i122}$). Ceci peut être interprétée comme la preuve d'un complexe préformé entre le dimère CXCR4 et $G\alpha_i$ qui changerait de conformation lors de la stimulation par le ligand, et écarte l'hypothèse d'une interaction récepteur – protéine G qui se ferait par collision (Orly and Schramm, 1976; Tolkovsky and Levitzki, 1978). Ces résultats démontrent avant tout que la protéine G peut être engagée par un dimère de récepteur.

Nous avons alors voulu savoir si le changement conformationnel trans-récepteur entre CCR2 et CXCR4 permettait l'engagement de la protéine G par CXCR4 lors de l'activation de CCR2. On peut voir sur la figure 7b que la stimulation de CCR2 par MCP-1 est capable d'engendrer une augmentation du signal de BRET entre CXCR4-vYFP et $G\alpha_i$-*R*Luc. Ce résultat peut s'expliquer de deux manières : soit le changement conformationnel trans-récepteur permet à CXCR4 d'engager la protéine G en réponse à l'activation de CCR2, soit l'activation de CCR2 engendre un état de haute affinité avec la protéine G, ce qui modifie le positionnement de cette dernière sous l'hétérodimère et fait varier le signal de BRET. Il a été démontré que dans le dimère BLT1, la liaison de l'agoniste à un seul des protomères diminuait fortement la liaison de l'agoniste à l'autre protomère (Damian et al., 2008). L'explication avancée est qu'une seule protéine G interagit avec le dimère, et qu'elle ne peut lier qu'un des deux protomères pour le stabiliser dans sa conformation active de haute affinité. Ce mécanisme qui a également été suggéré pour expliquer la coopérativité négative des hétérodimères CCR2-CCR5 et CCR2-CXCR4, signifierait que le changement de BRET observé entre CXCR4 et $G\alpha_i$ est dû à un réarrangement conformationnel de la protéine G en faveur du récepteur activé, CCR2. Cependant, on ne peut pas exclure un rôle du récepteur non lié dans l'activation de la protéine G. Les travaux sur le récepteur BLT1 démontrent que la conformation du récepteur non lié ne représente pas un état actif en terme de couplage à la protéine G mais n'attribuent pas de rôle à ce protomère. D'autres résultats obtenus avec le récepteur dopaminergique D2 prouvent par contre que le récepteur non lié serait nécessaire à l'activation de la G, car certaines de ses conformations et la mutation de ses boucles intracellulaires peuvent inhiber l'activation de

la protéine G (Han et al., 2009). L'étude sur le récepteur dopaminergique D2 utilise un modèle permettant de contrôler le rôle de chaque protomère dans l'activation de la protéine G. Dans ce système, une réponse calcique n'est générée que lors de la coexpression d'un récepteur D2 sauvage (protomère A) et d'une chimère D2-Gqi5 (protomère B) (figure 25); en effet le D2 qui est couplé à $G\alpha_i$ ne génère pas de signal calcium, et la chimère D2-G_{qi5} utilise un linker très court entre le récepteur et la protéines G qui impose un encombrement stérique défavorable à l'activation de G_{qi5} et de la voie calcique. Des mutations sur chacune des sous-unités du dimère D2 ont ensuite permis aux auteurs de déterminer l'importance de chacun des protomères dans l'activation de la protéine G.



Figure 25 : dimère de récepteur à la dopamine D2 - D2/Gqi5

Modèle utilisé par Han *et al*. pour définir le rôle de chaque protomère de récepteur dopaminergique D2 dans l'activation de la protéine G.

L'effet de trois mutations de la deuxième boucle intracellulaire (R132A, V136D, M140E) et une délétion de la boucle i3 (213-219) semble particulièrement intéressant. Chacune de ces modifications inhibe l'influx calcique lorsqu'elle est placée sur le protomère A, confirmant l'importance de son rôle dans l'activation de la protéine G. Mais de manière plus intéressante, les mutations de i2 inhibent également la signalisation lorsqu'elles sont placées sur le protomère B, et la délétion de i3 n'a pas d'effet. Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la protéine G nécessite les boucles i2 des deux

protomères, alors que la boucle i3 du protomère activé seulement serait requise. L'utilisation de mutations découplantes (D80A et N393A) situées dans le TMII et le TMVII respectivement inhibent la réponse calcique lorsqu'elles sont placées sur le protomère A alors que la mutation N393A seulement altère l'activation de la G. La conformation des deux récepteurs serait donc importante pour l'activation de la protéine G, mais elle serait de nature différente.

L'importance des boucles intracellulaires des deux récepteurs pourrait expliquer l'absence de trans-activation observée dans le cas du récepteur BLT1. En effet, dans le système utilisé par Damian *et al*., le récepteur BLT1 qui est le seul à pouvoir lier LTB4 dans le dimère est également mutés sur sa boucle i3, empêchant l'activation *en cis* de la protéine G (figure 26). Comme la stimulation par LTB4 n'entraîne pas de liaison de GTPγs, les auteurs en concluent une absence de *trans* activation de la protéine G (Damian et al., 2008). Au vu des résultats obtenus avec le récepteur dopaminergique D2, il serait donc intéressant de connaître l'effet de mutations des boucles intracellulaires du récepteur ALXR sur l'activation *en cis* de la protéine G par BLT1. Ces résultats ne permettent donc pas d'exclure un rôle de ALXR dans l'activation de Gα par BLT1.



Figure 26 : Dimère ALXR-BLT1

Absence de trans-activation de la protéine G dans le dimère BLT1-ALXR.

Dans le but de déterminer si CXCR4 jouait un rôle dans l'engagement de la protéine G par l'hétérodimère, nous avons utilisé le récepteur mutant CXCR4-N119K qui est

déficient dans sa capacité à activer la protéine $G\alpha_i$; des résultats antérieurs ont montré l'absence de liaison de GTPγs par la protéine G lors de l'activation du mutant par SDF-1 (Berchiche et al., 2007) et nous avons pu démontrer en BRET que cette mutation inhibe totalement l'engagement de Gαi par CXCR4 (figure 7a). Les données de la figure 7b démontrent que la mutation N119K altère l'engagement de la protéine $G\alpha_i$ par l'hétérodimère lors de la stimulation de CCR2 par MCP-1. L'augmentation du signal de BRET qui était de 43% avec CXCR4 sauvage n'est plus que de 22% dans le cas de CXCR4 N119K. Comme dans le cas des récepteurs dopaminergiques D2, ce résultat suggère une part substantielle de CXCR4 dans l'engagement de la protéine G par l'hétérodimère CXCR4-CCR2. Il est important de noter que cette trans-régulation de la protéine G par CXCR4 n'est pas incompatible avec l'hypothèse avancée pour expliquer la coopérativité négative des dimères : la liaison de haute affinité de la protéine G à un seul protomère n'impose pas qu'il y ait une absence totale de régulation par l'autre protomère. Car alors, tout le gain de la dimérisation serait perdu.

Recrutement de la β-arrestine par un dimère de récepteur.

Dans le but de mieux caractériser les voies de signalisation engagées, nous avons ensuite étudié le recrutement de β-arrestin2 par les homo et hétéro-complexes CXCR4 et CCR2. Dans un premier temps, comme dans le cas des protéines G, nous avons pu constater que la β-arrestine pouvait être recrutée par l'homodimère CXCR4 mais aussi par l'homodimère CCR2 (figures 8a et 8b). De manière intéressante, les cinétiques de recrutement s'avèrent très différentes pour les deux récepteurs, avec une ½ vie de 11 minutes environ pour CXCR4 et inférieure à la minute pour CCR2. Comme nous l'avions observé pour la protéine G, nous voulions savoir si CXCR4 était également impliqué dans le recrutement de β-arrestine par l'hétérodimère CXCR4-CCR2 lors de l'activation de ce dernier. Les résultats de la figure 10b montrent que la stimulation par MCP-1 permet également le recrutement de *R*LucII-β-arrestine2 sous le dimère CXCR4-vYFP/CCR2. Ces

résultats suggèrent que l'hétérodimère pourrait être désensibilisé et /ou engager une voie de signalisation dépendante de la β-arrestine en réponse à la stimulation d'un seul récepteur, CCR2. De manière intéressante, nous avons révélé que le mutant CXCR4-N119K qui est découplé de la protéine G n'est plus capable non plus de recruter la β-arrestine sous le récepteur CXCR4 en réponse au SDF-1. L'effet de ce mutant sur le recrutement de la β-arrestine à l'hétérodimère n 'était pas attendu; comme le démontre la figure 7b, il s'avère que la mutation potentialise le recrutement de la *R*LucII-β-arrestine2 sous l'hétérodimère CXCR4-N119k-vYFP/CCR2 en réponse au MCP-1. Le fait que CXCR4-N119K ne puisse pas engager la protéine G ni la β-arrestine en réponse au SDF-1 suggère que les modifications qu'engendrent cette mutation affectent un site commun à l'engagement de ces deux effecteurs (figures 7a et 10a). On pourrait donc penser que la mutation découplante diminue l'affinité de la protéine G pour le récepteur, et par conséquent facilite le recrutement de β-arrestine sur ce site. Également, une hypothèse intéressante est que la conformation du protomère non stimulé soit favorable à l'activation d'autres voies de signalisations, incluant d'autres sous-unités de protéines G ou de β-arrestine. La modification de conformation de CXCR4 par la mutation pourrait affecter ces voies de signalisation, ce qui expliquerait l'effet observé sur le recrutement de β-arrestine.

La spécificité de la trans-régulation pour l'engagement de la protéine G et de la β-arrestine par CXCR4 lors de l'activation de CCR2 a été vérifiée en absence du récepteur CCR2 pour s'assurer que le MCP-1 ne pouvait activer CXCR4 directement. Également, nous avons pu nous assurer que l'effet observé relevait d'une interaction spécifique entre CXCR4 et CCR2; aucun engagement de la protéine Gi ni de la β-arrestine n'a été observé lors de la stimulation du récepteur dopaminergique D2 cotransfecté avec CXCR4.

Ensemble, ces données suggèrent que chaque récepteur de l'hétérodimère CXCR4-CCR2 est impliqué dans l'engagement des effecteurs Gαi et β-arrestine.

Engagement de $G\alpha_i$ et de la β-arrestine2 par un hétéro-oligomère CXCR4-CCR2.

Nous avons démontré dans la première partie de l'article 1 que le réarrangement conformationnel trans-récepteur entre CXCR4 et CCR2 impliquait deux dimères de récepteurs (figures 1a, 2a, 3a). Nous avons donc voulu savoir si l'hétéro-oligomère pouvait engager ses effecteurs lors de la stimulation d'un seul des sous-type de récepteur. Comme le démontrent les figures 6a et 9a, l'engagement de la protéine $G\alpha_i$-*R*Luc (figure 6a) et de la *R*LucII-β-arrestine2 (figure 9a) par le dimère CXCR4-V1/V2 en réponse à la stimulation de CCR2 par MCP-1 a pu être révélée par une augmentation du signal de BRET entre le dimère de récepteur et l'effecteur. Ces données indiquent donc que les complexes oligomériques de CXCR4 et CCR2 représentent la forme fonctionnelle des récepteurs. Le modèle mis en place pour démontrer l'engagement des effecteurs par l'oligomère CXCR4-CCR2 implique trois unités de récepteurs (CXCR4-V1/V2 et Myc-CCR2) et ne permet donc pas d'affirmer que l'effet observé provient d'un dimère de dimère. Cependant, comme mentionné dans la première partie de la discussion et démontré dans la figure 4, nous pensons que l'organisation oligomérique des RCPG relève de l'association de dimères plutôt que d'une formation trimérique, et par conséquent que l'engagement des effecteurs se ferait à proximité de quatre récepteurs. Ces données ne nous permettent pas de faire de conclusion sur la stœchiométrie d'interaction entre les complexes de récepteurs et les effecteurs; les résultats prouvent en revanche que trois récepteurs au moins dans un complexe peuvent interagir avec la même protéine G et la même β-arrestine. Il a été suggéré dans le cas du récepteur $GABA_b$ que la formation de tétramères atténuait l'activation des protéines G (Maurel et al., 2008). Ceci pourrait s'expliquer par un effet allostérique entre les TM en contact qui empêcherait chaque récepteur d'atteindre son activité maximale (Pin et al., 2009). Cette hypothèse, qui fournirait aussi une explication au fait que certains monomères de récepteurs activent la protéine G de manière plus efficace que les dimères (Arcemisbehere et al., 2010; White et al., 2007), amène à l'idée énoncée

plus haut selon laquelle le rôle du dimère, et encore plus du tétramère, serait de permettre l'association à d'autres protéines; la formation de ces nouveaux complexes serait à l'origine de la diversité de la signalisation cellulaire.

Régulation de la signalisation de CXCR4 par de multiples kinases.

[Note au lecteur : les termes arrestine 2 et 3 seront employés à la place de β-arrestine 1 et 2 pour rester fidèle à la nomenclature employée dans l'article]

Suite à l'activation par l'agoniste, il a été démontré que certains RCPG, dont CXCR4, pouvaient être phosphorylés en de multiples sites par différentes kinases. Le recrutement des arrestines subséquent permettra d'une part la désensibilisation et l'internalisation du récepteur mais aussi l'engagement de certaines voies de signalisation telles que la voie des MAPK (Shenoy and Lefkowitz, 2005). La phosphorylation de l'extrémité C-terminale d'un récepteur par plusieurs GRK différentes pourrait former un « code barre », imposant aux arrestines d'adopter une conformation spécifique et ainsi d'activer différents effecteurs et désensibiliser certaines voies de signalisation. Dans le deuxième article présenté, la spectrométrie de masse et des anticorps phospho-spécifiques ont été utilisés pour déterminer les différents résidus phosphorylés sur l'extrémité C-terminale de CXCR4, comprendre la dynamique d'action des kinases et la conséquence sur la signalisation du « réseau phosphate » qu'elles créent. Les résultats démontrent dans un premier temps que les sérines (S)324/325 sont phosphorylées rapidement par la PKC et GRK6, et que la sérine S339 est phosphorylée seulement par GRK6. La sérine 330 est également phosphorylée par GRK6 mais avec une cinétique plus lente. Ensuite, en inhibant sélectivement l'expression des GRK2/3/5/6, et des arrestines 2/3 par des siRNA, cette étude démontre que pour le récepteur CXCR4, la désensibilisation de la voie du calcium serait principalement régulée par GRK2, GRK6 et le recrutement de l'arrestine 3 alors que

GRK3, GRK6 et l'arrestine 2 potentialiseraient l'activation des MAPK ERK1/2. GRK2, cependant, inhiberait cette dernière voie.

La stratégie utilisée ne permettait cependant pas de faire un lien direct entre ces évènements, à savoir d'affirmer que la phosphorylation par certaines GRK permettait le recrutement préférentiel d'une des arrestines, qui activerait ou inhiberait certaines voies de signalisation. L'équipe du Dr. Benovic nous a alors demandé d'essayer d'établir ce lien en utilisant le BRET.

Il a été démontré grâce à l'arrestine « double brillance » que le changement conformationnel de l'arrestine avait lieu après son recrutement au récepteur (Charest et al., 2005). Le principe de ce biosenseurs est d'avoir placé l'arrestine entre les molécules donneur et accepteur d'énergie; il en résulte un BRET intramoléculaire modulable lors de la stimulation du récepteur qui reflète son activation. Dans un premier temps nous voulions donc vérifier qu'un changement conformationnel d'une des arrestine pouvait être achevé suite à la phosphorylation par certaines GRK et pas par d'autres. En d'autres terme, il était attendu que l'inhibition de l'expression de GRK2 et GRK6 inhiberait complètement le changement conformationnel de l'arrestine3, alors que l'arrestine2 pouvait encore être activée par la phosphorylation de GRK3. Ultimement, des variations distinctes dans l'état conformationnel de chaque arrestine auraient pu caractériser l'altération de l'activation de leurs voies de signalisation respectives lors de l'inhibition ciblée de chaque GRK. L'avantage d'utiliser le biosenseur dans cette étude était d'éviter de fusionner une GFP ou une luciférase à l'extrémité C-terminale de CXCR4 pour ne pas perturber la phosphorylation par les GRK; malheureusement, les premiers tests montrèrent une absence totale de changement de conformation en réponse au SDF-1, et nous avons dû abandonner son utilisation (figure 27).

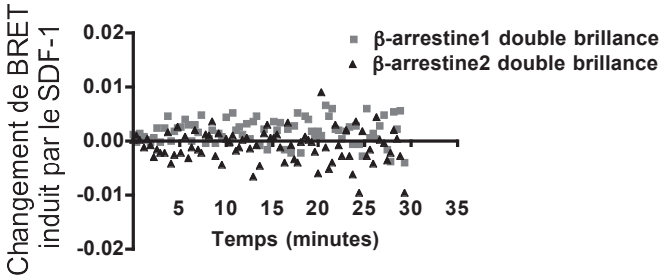


Figure 27 : BRET avec les arrestines double brillance

Absence d'effet de la stimulation de CXCR4 par SDF-1 sur le changement conformationnel des arrestines double brillance

Il a donc été décidé d'évaluer l'impact de chaque GRK sur le recrutement des arrestines en BRET inter moléculaire. L'effet de l'inhibition d'expression des GRK ainsi que de leur surexpression devait être testée sur le BRET entre CXCR4-RLucII et les GFP2-arrestines2/3. Il ne nous a cependant pas été possible d'exprimer de manière simultanée les siRNA contre les GRK et les protéines de fusion utilisées pour le BRET car l'expression de l'un par transfection transitoire inhibait l'expression de l'autre. Le système de surexpression des GRK nous a permis de voir une potentialisation du recrutement des arrestines dans certains cas, notamment pour GRK2 (figure 28). De manière intéressante, on peut voir que GRK2 potentialise le recrutement de l'arrestine2 de manière prolongée alors que le maximum de l'effet se situe dans les temps court (5 premières minutes) pour l'arrestine3. Ces cinétiques sont en accord avec un rôle de la phosphorylation de CXCR4 par GRK2 entrainant un recrutement rapide de l'arrestine 3 pour désensibiliser la voie du calcium et favorisant une interaction prolongée avec l'arrestine 2 pour moduler la voie des MAPK ERK1/2. Cependant, le lien entre la phosphorylation de CXCR4 par GRK3 et le recrutement exclusif de l'arrestine 2, qui était l'unique moyen de distinguer le recrutement préférentiel d'une arrestine par une GRK, n'a pas pu être établi par cette méthode.

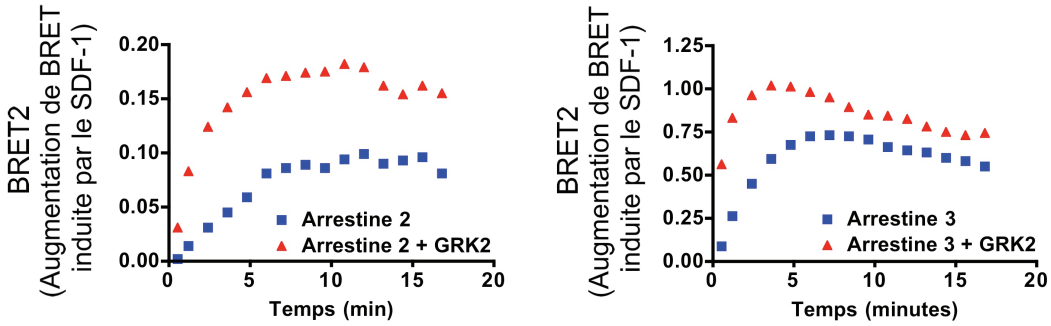


Figure 28 : Augmentation du signal de BRET entre CXCR4-*R*Luc et GFP2-arrestines par surexpression de GRK2

En revanche, nous avons pu définir le rôle de la phosphorylation de certains résidus sur le recrutement des arrestines en les mutant. Comme on peut le voir sur les figures 8a et 8b de l'article 2 ou sur la figure 28, le recrutement des arrestines 2 et 3 suit une cinétique distincte et l'intensité du signal de BRET est presque 10 fois supérieure pour l'arrestine 3 par rapport à l'arrestine 2. Comme discuté plus haut, les différences de cinétiques peuvent s'expliquer par les rôles décris pour les deux arrestines : la désensibilisation se ferait plutôt dans les temps court par l'arrestine 3 alors que l'action prolongée de l'arrestine 1 servirait majoritairement à la régulation des voies de signalisation ERK1/2. Les GFP2-arrestines2 et 3 utilisées ici sont construites de la même manière, et leur expression est similaire. La différence d'intensité du signal de BRET pourrait donc résulter d'un positionnement différent des arrestines sur le C-terminal du récepteur dû à la reconnaissance de motifs phosphates distincts, ce qui entrainerait une variation d'orientation et/ou de distance entre le donneur et l'accepteur d'énergie.

Un récepteur CXCR4 dont les 5 dernières sérines de la queue C-terminale sont mutées en alanine (5A Tail) a été utilisé pour mimer la perte de phosphorylation par GRK2 et GRK3. Comme on peut le voir sur les figures 8C et 8D, ce mutant n'a plus la capacité de recruter les arrestines 2 et 3, soulignant l'importance de la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de CXCR4 par les GRK2 et GRK3. En revanche, la mutation des sites de

phosphorylation pour GRK6 (les sérines 324, 325, 330, et 339) de CXCR4 (GRK6SA) potentialise le signal entre CXCR4 et les arrestines 2 et 3. Pour expliquer cet effet du mutant CXCR4 GRK6SA, il a été proposé soit que la phosphorylation par GRK6 inhibe le recrutement des arrestines à CXCR4, soit que l'absence de phosphorylation provoquerait un changement dans la conformation du complexe récepteur-arrestine qui favoriserait le transfert d'énergie. Nous avons mis à l'épreuve ces deux hypothèses en testant l'effet de la surexpression de GRK6 sur le recrutement des arrestines. Comme on le voit sur la figure 29, la cotransfection de GRK6 potentialise le recrutement des deux arrestines; l'effet inverse aurait du être observé si la phosphorylation par GRK6 avait inhibé le recrutement des arrestines.

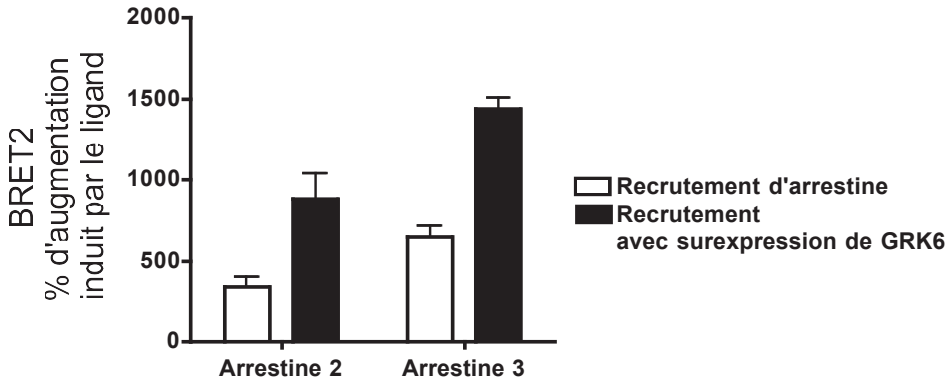


Figure 29 : Augmentation du signal de BRET entre CXCR4-*R*Luc et GFP2-arrestines par surexpression de GRK6.

La phosphorylation de certains résidus plutôt que d'autres par des GRK distinctes pourrait donc influencer la conformation de l'arrestine, avec pour conséquence l'activation ou l'arrêt de différentes voies de signalisations du récepteur.

Pour faire suite aux thèmes abordés dans le cadre de l'article 1, il serait intéressant de connaître l'effet de l'hétérodimérisation sur la phosphorylation par les GRK et le recrutement des arrestines. En effet, les GRK majoritairement impliquées dans la régulation

d'un homodimère pourraient différer dans le cas d'un hétérodimère. Également, on a vu dans la figure 10b de l'article 1 qu'une mutation du récepteur CXCR4 pouvait potentialiser le recrutement d'arrestine sous l'hétérodimère CXCR4-CCR2 en réponse à la stimulation de CCR2; il est donc envisageable qu'un récepteur puissent modifier par effet allostérique l'interaction de l'autre récepteur avec les arrestines, et ainsi en changer la régulation.

CXCR4 est couplé à la voie Gα13-Rho dans les métastases de cancer du sein.

CXCR4 est classiquement décris comme étant couplé aux protéines Gαi; les résultats présentés l'article 3 démontrent cependant que la chimiotaxie et la migration trans endothéliale des cellules métastatiques « basal like » ne peuvent être inhibées par traitement à la PTX. La combinaison de plusieurs méthodes a permis de déterminer que la migration de ces cellules cancéreuses nécessitait absolument l'activation de la voie des protéines $G\alpha_{12/13}$ - Rho par CXCR4.

Dans un premier temps il a été observé que l'activation de $G\alpha_i$ par CXCR4 n'était pas nécessaire à la chimiotaxie (figure 2B) et à la migration trans endothéliale des cellules cancéreuses « basal like » MDA-MB-231 et SUM-159 (figure 2C-D); en effet le traitement à la PTX n'a pas d'effet sur ces cellules alors qu 'il inhibe la chimiotaxie des cellules luminales de cancers du sein non métastatiques MCF-7 (figure 2B). Pour déterminer quelle voie de signalisation pouvait être impliquée dans la migration de ces cellules cancéreuses, les trois membres principaux de la famille des protéines Rho, Rho, Rac et Cdc42 qui sont impliqués dans le mouvement cellulaire ont été étudiés. Les résultats de l'essai en pull-down révèlent que Rho est activé dans les cellules MDA-MB-231 et SUM-159 environ 5 minutes après la stimulation par le SDF-1 (figure 3A) alors que Rac et Cdc42 ne le sont pas. De manière intéressante, l'activation de Rho par SDF-1 n'est pas inhibée par le traitement à la PTX, démontrant que cette voie n'est pas activée par la protéine Gαi (figure 3C). La suppression de l'expression de Rho par des petits ARN interférents (siRNA) ou le

traitement à la toxine C3 qui ADP-rybosile et inhibe la fonction de Rho diminuent significativement la migration des cellules cancéreuses (figures 3E-F). La stimulation par SDF-1 entraine donc l'activation de RhoA de manière indépendante des protéines Gi et RhoA permet en retour la migration des cellules cancéreuses. Il a été démontré que les membres de la famille des protéines $G\alpha_{12/13}$, aussi appelées oncogènes GEP, pouvaient activer les petites GTPases RhoA (Kozasa et al., 1998). Ces protéines G, qui sont surexprimées dans les cellules cancéreuses du sein (Kelly et al., 2006), sont capables d'activer la voie Rho. De fait, la suppression de l'expression de $G\alpha_{13}$ par interférence ARN inhibe la migration des cellules cancéreuses (figures 4C et 4D) et empêche l'apparition de métastases sur un modèle animal (figure 4E).

Dans le but de déterminer si cette voie de signalisation était initiée par une interaction directe entre CXCR4 et $G\alpha_{13}$, nous avons proposé d'étudier la spécificité d'interaction de ces deux protéines en BRET dans le système hétérologue de cellules HEK-293. Le choix s'est tourné vers le BRET2 pour les raisons indiquées en introduction; le spectre de recouvrement du donneur d'énergie luciférase et de l'accepteur d'énergie GFP2 est plus important que dans la configuration BRET1, et de plus il présente une meilleure séparation entre les spectres d'excitation de la coelenterazine 400A et d'émission de la GFP2. La meilleure efficacité de transfert qu'offre le BRET2 par ses caractéristiques spectrales permet d'obtenir une plus grande fenêtre dynamique pour détecter la modulation d'interactions protéine-protéine. Une courbe de titration a d'abord été réalisée pour vérifier la spécificité d'interaction entre CXCR4 et $G\alpha_{13}$. Les résultats présentés à la figure 4H démontrent une saturation de la courbe entre CXCR4-GFP2 et $G\alpha_{13}$-RLucII, indiquant que ces deux protéines interagissent de manière spécifique; en revanche, l'absence d'interaction entre $G\alpha_{13}$ et la protéine soluble GFP2 se traduit par une droite et une absence quasi totale de transfert d'énergie. Une des raisons pouvant expliquer le couplage de CXCR4 à $G\alpha_{13}$ dans les cellules MDA-MB-231 est la surexpression du récepteur et de cette protéine G. Comme mentionné en introduction, il a été rapporté que plusieurs RCPG pouvait coupler deux protéines G de différentes sous-familles, et jusqu'à quatre dans certains cas (Laugwitz et al., 1996). Il est alors important de se demander si l'interaction entre les protéines G et

les RCPG est spécifique par nature, ou si le couplage préférentiel ne serait pas guidé uniquement par l'expression cellulaire préférentielle de certaines sous-familles de protéines G. Le fait que la PTX puisse inhiber la migration de certaines cellules cancéreuses (MCF-7) et pas celle des cellules MDA-MB-231 (figure 2B) corrobore la seconde hypothèse; la surexpression de $G\alpha_{13}$ dans les cellules « basal like » favoriserait le couplage de cette famille de protéines G à CXCR4. La figure 4A compare l'expression de $G\alpha_{12/13}$ dans des cellules cancéreuses et non cancéreuses, révélant la surexpression de cette famille dans les tissus tumoraux. Il aurait cependant été intéressant de contrôler également l'expression de des protéines G de la famille G_i pour savoir si la surexpression de $G\alpha_{13}$ était concomitante d'une diminution d'expression de Gαi. Cette notion introduit cependant un biais dans l'étude du couplage d'un récepteur aux protéines G dans des systèmes hétérologues de surexpression; en effet, si l'interaction préférentielle entre le récepteur et la protéine G est guidé par une régulation tissulaire plutôt que par des déterminants structuraux alors, de nombreux faux-positifs pourraient ressortir de ces études. En dépit d'une forte proximité des complexes, il est en revanche peu probable que toutes les protéines G puissent être activées par un RCPG. Étant donné que la spécificité d'activation viendrait de l'insertion de l'extrémité C-terminale de la protéine G dans la cavité cytoplasmique créée par l'activation des RCPG (Farrens et al., 1996; Scheerer et al., 2008), on peut donc penser qu'elle requiert des éléments structuraux propres à chaque RCPG et à chaque sous-famille de protéines G. Des données non publiées démontrent d'ailleurs que les récepteurs des opiacés δOR qui sont majoritairement couplés aux protéines de la famille Gi pourraient interagir avec la $G\alpha_q$ sans pouvoir l'activer. Également, une interaction importante a pu être observée en BRET entre le récepteur CXCR4 et la protéine Gαs alors qu'aucune fonction n'a été attribuée à ce couplage; aucun effet du SDF-1 n'est d'ailleurs observé sur cette interaction (figure 30).

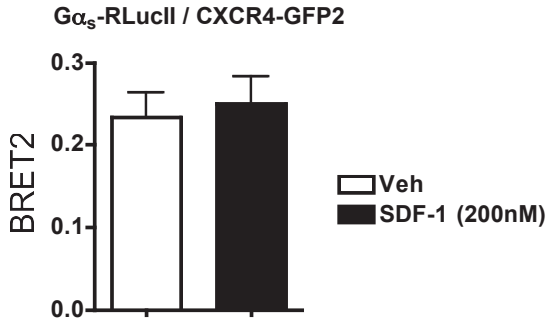


Figure 30 : Absence d'engagement de la protéine Gαs par CXCR4 en réponse au SDF-1

Pour appuyer la spécificité du couplage de CXCR4 à Gα13, nous nous sommes donc assurés qu'il pouvait engager cette protéine G en réponse à l'agoniste. Les résultats présentés à la figure 4I démontrent une forte interaction basale entre CXCR4-GFP2 et Gα13-RLucII qui est diminuée substantiellement par la stimulation du récepteur par le SDF-1. Comme dans le cas du couplage de la protéine Gαi à CXCR4, nous pensons qu'une variation du signal de BRET reflète l'engagement de la protéine G par le récepteur, et qu'elle est la conséquence d'un changement conformationnel entre les deux protéines. Cependant, en absence du contrôle qui consiste à marquer la protéine G en de multiple sites (article 1, figure 5a), il n'est pas possible d'exclure que la diminution du signal de BRET vienne de la dissociation de la protéine G suite à l'activation du récepteur. Pour savoir si l'engagement de cette protéine G était spécifique du récepteur CXCR4, nous avons testé en contrôle l'effet de la stimulation du récepteur CCR2 par le MCP-1 sur le couplage avec Gα13. La figure 4I démontre non seulement une interaction basale beaucoup plus faible entre CCR2-GFP2 et $G\alpha_{13}$-RLucII par rapport à CXCR4, mais également une absence complète d'effet du MCP -1. Ce récepteur est pourtant capable, comme CXCR4, d'engager les protéines G de la famille $G\alpha_i$ (figure 4J). Ces expériences de BRET ont donc pu démontrer que CXCR4 était capable d'engager spécifiquement la protéine $G\alpha_{13}$ par un couplage direct. Une autre manière de s'assurer de l'activation de cette protéine G par CXCR4 a été de mesurer le changement de BRET entre $G\alpha_{13}$ et la protéine Gγ (figure

supplémentaire 2B); une variation de l'interaction entre Gα et Gβγ suite à la stimulation du RCPG serait un reflet direct de l'activation des voies de signalisation dépendantes des protéines G hétérotrimériques. Dans ce but, la modulation de l'interaction entre $G\alpha_{13}$ et plusieurs membres de la sous-famille des protéines Gγ ($G\gamma_{1/2/3/4/5/7/12/13}$) a été testée. L'effet le plus robuste a été observé avec $G\gamma_7$ (figure supplémentaire 2C) et plusieurs n'ont pas donné de réponse ($G\gamma_{3/4/5/12/13}$).

Il est important de noter que dans certaines cellules telles que les Jurkat, la migration en réponse au SDF-1 serait la résultante d'une action coordonnée de l'activation des petites GTPases Rho par $G\alpha_{13}$ et Rac par $G\alpha_i$ (Tan et al., 2006). Comme mentionné dans le cadre de l'article 1, il est possible d'envisager que le couplage à de multiples protéines G soit une conséquence de l'oligomérisation de CXCR4. En effet, la formation de structures oligomériques de RCPG pourrait favoriser les complexes multiprotéiques pour diversifier la signalisation en réponse au ligand, incluant l'activation de plusieurs protéines G.

Conclusion

Les interactions protéine-protéine représentent la pierre angulaire des régulations du fonctionnement de la cellule, et les voies de signalisation des RCPG en sont un exemple de choix. Le paradigme initial qui énonçait une stœchiométrie récepteur : protéine G : effecteur de 1 :1 :1 a été révolutionné au cours de 20 dernières années par le développement de techniques permettant de mettre en évidence les interactions protéiques. Grâce au transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) combinée à une approche de double complémentation de protéines (PCA), les travaux réalisés durant cette thèse ont montré que les deux récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR2 qui étaient décris comme formant des dimères, pouvaient s'assembler en dimères de dimères. La trans-régulation de la protéine G et de la β-arrestine par CXCR4 lors de l'activation de CCR2 implique de reconsidérer la stœchiométrie d'un complexe fonctionnel de RCPG et les paradigmes

d'activation des effecteurs. Également, nous suggérons que dans certains cas au moins, ce qui était décris comme étant un hétérodimère puisse en fait résulter de l'assemblage de deux homodimères de nature différente. La formation de tétramères par des RCPG est un concept émergent; elle n'est rapportée aujourd'hui que pour une dizaine de récepteurs, et les conséquences de l'assemblage ces complexes sur la signalisation cellulaire restent encore largement méconnues. Comme dans le cas d'un dimère où le récepteur non stimulé pourrait servir de plateforme pour l'activation de certaines protéines de signalisation, nous pensons qu'un tétramère ou des oligomères supérieurs seraient des entités servant à diversifier le signal en permettant la formation de complexes multiprotéiques. Cette hypothèse pourrait notamment expliquer pourquoi un récepteur peut engager de multiples voies de signalisation.

Bibliographie

Abbadie, C., Lindia, J.A., Cumiskey, A.M., Peterson, L.B., Mudgett, J.S., Bayne, E.K., DeMartino, J.A., MacIntyre, D.E., and Forrest, M.J. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7947-7952.

AbdAlla, S., Lother, H., and Quitterer, U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. Nature *407*, 94-98.

Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L.*, et al.* (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. Nat Chem Biol *6*, 587-594.

Allgeier, A., Laugwitz, K.L., Van Sande, J., Schultz, G., and Dumont, J.E. (1997). Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor. Mol Cell Endocrinol *127*, 81-90.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). The Journal of biological chemistry *271*, 20246-20249.

Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. Annu Rev Pharmacol Toxicol *42*, 409-435.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 3684-3689.

Aragay, A.M., Mellado, M., Frade, J.M., Martin, A.M., Jimenez-Sainz, M.C., Martinez, A.C., and Mayor, F., Jr. (1998). Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 2985-2990.

Arcemisbehere, L., Sen, T., Boudier, L., Balestre, M.N., Gaibelet, G., Detouillon, E., Orcel, H., Mendre, C., Rahmeh, R., Granier, S.*, et al.* (2010). Leukotriene BLT2 receptor monomers activate the G(i2) GTP-binding protein more efficiently than dimers. J Biol Chem *285*, 6337-6347.

Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 5163-5168.

Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. J Biol Chem *267*, 17882-17890.

Ayoub, M.A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., and Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem *277*, 21522-21528.

Ayoub, M.A., Trinquet, E., Pfleger, K.D., and Pin, J.P. (2010). Differential association modes of the thrombin receptor PAR1 with Galphai1, Galpha12, and beta-arrestin 1. FASEB J *24*, 3522-3535.

Babcock, G.J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003). Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. J Biol Chem *278*, 3378-3385.

Bai, M., Trivedi, S., and Brown, E.M. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. J Biol Chem *273*, 23605-23610.

Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O.*, et al.* (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. Blood *105*, 2449-2457.

Baldwin, J.M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. Curr Opin Cell Biol *6*, 180-190.

Balkwill, F. (2004a). Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer *4*, 540-550.

Balkwill, F. (2004b). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. Semin Cancer Biol *14*, 171-179.

Baneres, J.L., and Parello, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. J Mol Biol *329*, 815-829.

Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. Cell *103*, 227-238.

Barak, L.S., Menard, L., Ferguson, S.S., Colapietro, A.M., and Caron, M.G. (1995). The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)2,3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor. Biochemistry *34*, 15407-15414.

Basile, J.R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K.L., and Gutkind, J.S. (2004). Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. Cancer research *64*, 5212-5224.

Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G., Oprian, D.D., and Sligar, S.G. (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. J Biol Chem *282*, 14875-14881.

Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. J Biol Chem *260*, 7094-7101.

Berchiche, Y.A., Chow, K.Y., Lagane, B., Leduc, M., Percherancier, Y., Fujii, N., Tamamura, H., Bachelerie, F., and Heveker, N. (2007). Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. J Biol Chem *282*, 5111-5115.

Berglund, M.M., Schober, D.A., Esterman, M.A., and Gehlert, D.R. (2003). Neuropeptide Y Y4 receptor homodimers dissociate upon agonist stimulation. J Pharmacol Exp Ther *307*, 1120-1126.

Binet, V., Brajon, C., Le Corre, L., Acher, F., Pin, J.P., and Prezeau, L. (2004). The heptahelical domain of GABA(B2) is activated directly by CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABA(B) receptor. J Biol Chem *279*, 29085-29091.

Bjarnadottir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schioth, H.B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. Genomics *88*, 263-273.

Blahos, J., Fischer, T., Brabet, I., Stauffer, D., Rovelli, G., Bockaert, J., and Pin, J.P. (2001). A novel site on the Galpha -protein that recognizes heptahelical receptors. J Biol Chem *276*, 3262-3269.

Blum, J.J., and Conn, P.M. (1982). Gonadotropin-releasing hormone stimulation of luteinizing hormone release: A ligand-receptor-effector model. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 7307-7311.

Blumer, J.B., Smrcka, A.V., and Lanier, S.M. (2007). Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. Pharmacol Ther *113*, 488-506.

Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J *18*, 1723-1729.

Bourne, H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. Curr Opin Cell Biol *9*, 134-142.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature *348*, 125-132.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. Nat Rev Neurosci *2*, 274-286.

Breton, B., Lagace, M., and Bouvier, M. (2010). Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the {alpha}2A-adrenergic receptor, G{alpha}i1{beta}1{gamma}2, and GRK2. FASEB J.

Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J.L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. J Biol Chem *285*, 7805-7817.

Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L., Ferre, S., Bouvier, M., Fuxe, K.*, et al.* (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. J Neurochem *88*, 726-734.

Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S.*, et al.* (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. J Biol Chem *278*, 46741-46749.

Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferre, S., Casado, V., Agnati, L., Cortes, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I.*, et al.* (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. Nat Methods *5*, 727-733.

Carrillo, J.J., Lopez-Gimenez, J.F., and Milligan, G. (2004). Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric alpha1b-adrenoceptor. Mol Pharmacol *66*, 1123-1137.

Carrillo, J.J., Pediani, J., and Milligan, G. (2003). Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. J Biol Chem *278*, 42578-42587.

Chabre, M., Cone, R., and Saibil, H. (2003). Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? Nature *426*, 30-31; discussion 31.

Charest, P.G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. EMBO Rep *6*, 334-340.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., and Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 2752-2756.

Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med *354*, 610-621.

Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., and Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res *14*, 1368-1376.

Cheng, Z.J., and Miller, L.J. (2001). Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem *276*, 48040-48047.

Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X., and Pei, G. (2000). beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. J Biol Chem *275*, 2479-2485.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., *et al.* (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science *318*, 1258-1265.

Chiang, N., Fierro, I.M., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2000). Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. J Exp Med *191*, 1197-1208.

Chikumi, H., Vazquez-Prado, J., Servitja, J.M., Miyazaki, H., and Gutkind, J.S. (2002). Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. The Journal of biological chemistry *277*, 27130-27134.

Cho, M.L., Yoon, B.Y., Ju, J.H., Jung, Y.O., Jhun, J.Y., Park, M.K., Park, S.H., Cho, C.S., and Kim, H.Y. (2007). Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. Exp Mol Med *39*, 499-507.

Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. Nature *441*, 444-450.

Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. Science *265*, 1405-1412.

Conklin, B.R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D., and Bourne, H.R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. Nature *363*, 274-276.

Conklin, B.R., Hsiao, E.C., Claeysen, S., Dumuis, A., Srinivasan, S., Forsayeth, J.R., Guettier, J.M., Chang, W.C., Pei, Y., McCarthy, K.D.*, et al.* (2008). Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. Nature methods *5*, 673-678.

Conn, P.M., Rogers, D.C., Stewart, J.M., Niedel, J., and Sheffield, T. (1982). Conversion of a gonadotropin-releasing hormone antagonist to an agonist. Nature *296*, 653-655.

Conn, P.M., and Venter, J.C. (1985). Radiation inactivation (target size analysis) of the gonadotropin-releasing hormone receptor: evidence for a high molecular weight complex. Endocrinology *116*, 1324-1326.

Contento, R.L., Molon, B., Boularan, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., and Viola, A. (2008). CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 10101-10106.

Cotecchia, S., Fanelli, F., and Costa, T. (2003). Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action. Assay Drug Dev Technol *1*, 311-316.

Crawford, K.W., Frey, E.A., and Cote, T.E. (1992). Angiotensin II receptor recognized by DuP753 regulates two distinct guanine nucleotide-binding protein signaling pathways. Mol Pharmacol *41*, 154-162.

Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. Nature *369*, 418-420.

Curnock, A.P., Sotsios, Y., Wright, K.L., and Ward, S.G. (2003). Optimal chemotactic responses of leukemic T cells to stromal cell-derived factor-1 requires the activation of both class IA and IB phosphoinositide 3-kinases. J Immunol *170*, 4021-4030.

Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 5134-5138.

Cvejic, S., and Devi, L.A. (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. J Biol Chem *272*, 26959-26964.

D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J.A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. Eur J Immunol *27*, 1788-1793.

Dadiani, M., Kalchenko, V., Yosepovich, A., Margalit, R., Hassid, Y., Degani, H., and Seger, D. (2006). Real-time imaging of lymphogenic metastasis in orthotopic human breast cancer. Cancer research *66*, 8037-8041.

Damian, M., Martin, A., Mesnier, D., Pin, J.P., and Baneres, J.L. (2006). Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. EMBO J *25*, 5693-5702.

Damian, M., Mary, S., Martin, A., Pin, J.P., and Baneres, J.L. (2008). G protein activation by the leukotriene B4 receptor dimer. Evidence for an absence of trans-activation. J Biol Chem *283*, 21084-21092.

de Boer, M., van Deurzen, C.H., van Dijck, J.A., Borm, G.F., van Diest, P.J., Adang, E.M., Nortier, J.W., Rutgers, E.J., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M.B.*, et al.* (2009). Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. The New England journal of medicine *361*, 653-663.

De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. Nat Rev Drug Discov *2*, 581-587.

De Clercq, E. (2010). Recent advances on the use of the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100, Mozobil) and potential of other CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers. Pharmacol Ther.

Dealwis, C., Fernandez, E.J., Thompson, D.A., Simon, R.J., Siani, M.A., and Lolis, E. (1998). Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 6941-6946.

DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D., and Bunnett, N.W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. J Cell Biol *148*, 1267-1281.

Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., and Lippman, S.M. (2005). Statins and cancer prevention. Nat Rev Cancer *5*, 930-942.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res *29*, 313-326.

Dinger, M.C., Bader, J.E., Kobor, A.D., Kretzschmar, A.K., and Beck-Sickinger, A.G. (2003). Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells. J Biol Chem *278*, 10562-10571.

Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer *7*, 79-94.

Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. Genomics *62*, 544-552.

Duthey, B., Caudron, S., Perroy, J., Bettler, B., Fagni, L., Pin, J.P., and Prezeau, L. (2002). A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. J Biol Chem *277*, 3236-3241.

Dutt, P., Wang, J.F., and Groopman, J.E. (1998). Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. J Immunol *161*, 3652-3658.

Edgell, C.J., McDonald, C.C., and Graham, J.B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *80*, 3734-3737.

El-Asmar, L., Springael, J.Y., Ballet, S., Andrieu, E.U., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. Mol Pharmacol *67*, 460-469.

Epstein, R.J. (2004). The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. Nat Rev Cancer *4*, 901-909.

Ernst, O.P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K.P., and Heck, M. (2007). Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 10859-10864.

Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. Science *274*, 768-770.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer *3*, 453-458.

Filipek, S., Krzysko, K.A., Fotiadis, D., Liang, Y., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2004). A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. Photochem Photobiol Sci *3*, 628-638.

Flanagan, L., Van Weelden, K., Ammerman, C., Ethier, S.P., and Welsh, J. (1999). SUM-159PT cells: a novel estrogen independent human breast cancer model system. Breast cancer research and treatment *58*, 193-204.

Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J., and Patel, D.D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 7478-7483.

Ford, C.E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, C.S., Iyengar, R.*, et al.* (1998). Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. Science *280*, 1271-1274.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. Nature *421*, 127-128.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. FEBS Lett *564*, 281-288.

Frade, J.M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Lind, P., and Martinez, A.C. (1997). Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. J Immunol *159*, 5576-5584.

Fraser, C.M., Arakawa, S., McCombie, W.R., and Venter, J.C. (1989). Cloning, sequence analysis, and permanent expression of a human alpha 2-adrenergic receptor in Chinese hamster ovary cells. Evidence for independent pathways of receptor coupling to adenylate cyclase attenuation and activation. J Biol Chem *264*, 11754-11761.

Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J.S. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? Oncogene *20*, 1661-1668.

Fukuhara, S., Marinissen, M.J., Chiariello, M., and Gutkind, J.S. (2000). Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves Galpha q and Galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway. The Journal of biological chemistry *275*, 21730-21736.

Fung, J.J., Deupi, X., Pardo, L., Yao, X.J., Velez-Ruiz, G.A., Devree, B.T., Sunahara, R.K., and Kobilka, B.K. (2009). Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. EMBO J *28*, 3315-3328.

Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., and Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. Trends in pharmacological sciences *28*, 423-430.

Gales, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T.E., and Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. Nature methods *2*, 177-184.

Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. Nat Struct Mol Biol *13*, 778-786.

Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L., and Pin, J.P. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. EMBO J *20*, 2152-2159.

Gandia, J., Galino, J., Amaral, O.B., Soriano, A., Lluis, C., Franco, R., and Ciruela, F. (2008). Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. FEBS Lett *582*, 2979-2984.

Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. J Biol Chem *273*, 23169-23175.

Garcia Lopez, M.A., Aguado Martinez, A., Lamaze, C., Martinez, A.C., and Fischer, T. (2009). Inhibition of dynamin prevents CCL2-mediated endocytosis of CCR2 and activation of ERK1/2. Cell Signal *21*, 1748-1757.

Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. Nature cell biology *8*, 1223-1234.

George, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., and O'Dowd, B.F. (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. J Biol Chem *275*, 26128-26135.

Gill, D.M., and Meren, R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A *75*, 3050-3054.

Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem *56*, 615-649.

Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casado, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M.*, et al.* (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 8606-8611.

Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. Ann Oncol *20*, 1913-1927.

Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., and Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIbbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. Science (New York, NY *327*, 340-343.

Gonzalez-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N.V., Lopez-Gimenez, J.F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L.F., Milligan, G.*, et al.* (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. Nature *452*, 93-97.

Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. Nature *383*, 447-450.

Goudet, C., Kniazeff, J., Hlavackova, V., Malhaire, F., Maurel, D., Acher, F., Blahos, J., Prezeau, L., and Pin, J.P. (2005). Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators. J Biol Chem *280*, 24380-24385.

Grant, M., Collier, B., and Kumar, U. (2004). Agonist-dependent dissociation of human somatostatin receptor 2 dimers: a role in receptor trafficking. J Biol Chem *279*, 36179-36183.

Grishina, G., and Berlot, C.H. (2000). A surface-exposed region of G(salpha) in which substitutions decrease receptor-mediated activation and increase receptor affinity. Mol Pharmacol *57*, 1081-1092.

Gross, W., and Lohse, M.J. (1991). Mechanism of activation of A2 adenosine receptors. II. A restricted collision-coupling model of receptor-effector interaction. Mol Pharmacol *39*, 524-530.

Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 17495-17500.

Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. EMBO J *27*, 2293-2304.

Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. Cell *127*, 679-695.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. Trends Pharmacol Sci *25*, 105-111.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther *110*, 465-502.

Gutkind, J.S., Coso, O.A., and Xu, N. (1998). G12 and G13 α subunits of heterotrimeric G proteins: A novel family of oncogenes. In G Proteins, Receptors, and Disease, S.A. M., ed. (Totowa, NJ, Humana Press), pp. 101-117.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science *279*, 509-514.

Hamada, T., Mohle, R., Hesselgesser, J., Hoxie, J., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Rafii, S. (1998). Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. J Exp Med *188*, 539-548.

Hamdan, F.F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., and Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. J Biomol Screen *10*, 463-475.

Hamm, H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. J Biol Chem *273*, 669-672.

Hamm, H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 4819-4821.

Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. Nat Chem Biol *5*, 688-695.

Hanson, S.M., Gurevich, E.V., Vishnivetskiy, S.A., Ahmed, M.R., Song, X., and Gurevich, V.V. (2007). Each rhodopsin molecule binds its own arrestin. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 3125-3128.

Haribabu, B., Richardson, R.M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S.C., Horuk, R., Ali, H., and Snyderman, R. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. J Biol Chem *272*, 28726-28731.

Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., and Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. Science *280*, 2112-2114.

Hayashida, K., Nanki, T., Girschick, H., Yavuz, S., Ochi, T., and Lipsky, P.E. (2001). Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. Arthritis Res *3*, 118-126.

Hazeki, O., and Ui, M. (1981). Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. J Biol Chem *256*, 2856-2862.

Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. J Biol Chem *271*, 16384-16392.

Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J., and Bunemann, M. (2005). Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. EMBO J *24*, 4106-4114.

Hern, J.A., Baig, A.H., Mashanov, G.I., Birdsall, B., Corrie, J.E., Lazareno, S., Molloy, J.E., and Birdsall, N.J. (2010). Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 2693-2698.

Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J.M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S.F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A.C.*, et al.* (2004). Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. Nat Immunol *5*, 216-223.

Heroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., and Bouvier, M. (2007). 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 *282*, 31610-31620.

Herroeder, S., Reichardt, P., Sassmann, A., Zimmermann, B., Jaeneke, D., Hoeckner, J., Hollmann, M.W., Fischer, K.D., Vogt, S., Grosse, R.*, et al.* (2009). Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. Immunity *30*, 708-720.

Hilairet, S., Bouaboula, M., Carriere, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (2003). Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. J Biol Chem *278*, 23731-23737.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J.*, et al.* (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. J Biol Chem *277*, 18091-18097.

Hirota, K., and Semenza, G.L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. Crit Rev Oncol Hematol *59*, 15-26.

Hlavackova, V., Goudet, C., Kniazeff, J., Zikova, A., Maurel, D., Vol, C., Trojanova, J., Prezeau, L., Pin, J.P., and Blahos, J. (2005). Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. EMBO J *24*, 499-509.

Hopkins, A.L., and Groom, C.R. (2002). The druggable genome. Nat Rev Drug Discov *1*, 727-730.

Hori, T., Sakaida, H., Sato, A., Nakajima, T., Shida, H., Yoshie, O., and Uchiyama, T. (1998). Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic [correction of T cell-tropic] HIV-1 by three different monoclonal antibodies. J Immunol *160*, 180-188.

Huttenrauch, F., Nitzki, A., Lin, F.T., Honing, S., and Oppermann, M. (2002). Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. J Biol Chem *277*, 30769-30777.

Hwang-Verslues, W.W., Kuo, W.H., Chang, P.H., Pan, C.C., Wang, H.H., Tsai, S.T., Jeng, Y.M., Shew, J.Y., Kung, J.T., Chen, C.H.*, et al.* (2009). Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. PloS one *4*, e8377.

Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. J Biol Chem *277*, 34666-34673.

Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. Nature medicine *5*, 221-225.

Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. Science *322*, 1211-1217.

Jach, G., Pesch, M., Richter, K., Frings, S., and Uhrig, J.F. (2006). An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. Nat Methods *3*, 597-600.

Janz, J.M., and Farrens, D.L. (2004). Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. J Biol Chem *279*, 29767-29773.

Jastrzebska, B., Fotiadis, D., Jang, G.F., Stenkamp, R.E., Engel, A., and Palczewski, K. (2006). Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. J Biol Chem *281*, 11917-11922.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin *59*, 225-249.

Ji, I., and Ji, T.H. (1995). Differential roles of exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. J Biol Chem *270*, 15970-15973.

Jin, L.Q., Wang, H.Y., and Friedman, E. (2001). Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. J Neurochem *78*, 981-990.

Jordan, B.A., and Devi, L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. Nature *399*, 697-700.

Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., and Devi, L.A. (2001). Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 343-348.

Kalatskaya, I., Berchiche, Y.A., Gravel, S., Limberg, B.J., Rosenbaum, J.S., and Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. Mol Pharmacol *75*, 1240-1247.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2006). Chemokine networks and breast cancer metastasis. Breast disease *26*, 75-85.

Katada, T., and Ui, M. (1982). ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. J Biol Chem *257*, 7210-7216.

Katz, A., and Simon, M.I. (1995). A segment of the C-terminal half of the G-protein beta 1 subunit specifies its interaction with the gamma 1 subunit. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 1998-2002.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R.*, et al.* (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature *396*, 683-687.

Kawai, T., Choi, U., Whiting-Theobald, N.L., Linton, G.F., Brenner, S., Sechler, J.M., Murphy, P.M., and Malech, H.L. (2005). Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome. Exp Hematol *33*, 460-468.

Kelly, P., Casey, P.J., and Meigs, T.E. (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. Biochemistry *46*, 6677-6687.

Kelly, P., Moeller, B.J., Juneja, J., Booden, M.A., Der, C.J., Daaka, Y., Dewhirst, M.W., Fields, T.A., and Casey, P.J. (2006). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 8173-8178.

Kenakin, T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. Trends Pharmacol Sci *24*, 346-354.

Kerppola, T.K. (2006). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 449-456.

Khelashvili, G., Dorff, K., Shan, J., Camacho-Artacho, M., Skrabanek, L., Vroling, B., Bouvier, M., Devi, L.A., George, S.R., Javitch, J.A.*, et al.* (2010). GPCR-OKB: the G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. Bioinformatics *26*, 1804-1805.

Kikuchi, A., Yamamoto, K., Fujita, T., and Takai, Y. (1988). ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1. The Journal of biological chemistry *263*, 16303-16308.

Kim, J., Ahn, S., Ren, X.R., Whalen, E.J., Reiter, E., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 1442-1447.

Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. Annu Rev Cell Dev Biol *15*, 705-732.

Kisselev, O.G., and Downs, M.A. (2006). Rhodopsin-interacting surface of the transducin gamma subunit. Biochemistry *45*, 9386-9392.

Klein, S., Reuveni, H., and Levitzki, A. (2000). Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 3219-3223.

Kobayashi, H., Ogawa, K., Yao, R., Lichtarge, O., and Bouvier, M. (2009). Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. Traffic *10*, 1019-1033.

Kocan, M., See, H.B., Seeber, R.M., Eidne, K.A., and Pfleger, K.D. (2008). Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. J Biomol Screen *13*, 888-898.

Koch, W.J., Inglese, J., Stone, W.C., and Lefkowitz, R.J. (1993). The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem *268*, 8256-8260.

Koelle, M.R. (1997). A new family of G-protein regulators - the RGS proteins. Curr Opin Cell Biol *9*, 143-147.

Kohout, T.A., Lin, F.S., Perry, S.J., Conner, D.A., and Lefkowitz, R.J. (2001). beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 1601-1606.

Kostenis, E., Degtyarev, M.Y., Conklin, B.R., and Wess, J. (1997). The N-terminal extension of Galphaq is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. J Biol Chem *272*, 19107-19110.

Kourlas, P.J., Strout, M.P., Becknell, B., Veronese, M.L., Croce, C.M., Theil, K.S., Krahe, R., Ruutu, T., Knuutila, S., Bloomfield, C.D*., et al.* (2000). Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 2145-2150.

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., and Sternweis, P.C. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. Science *280*, 2109-2111.

Kroeger, K.M., Hanyaloglu, A.C., Seeber, R.M., Miles, L.E., and Eidne, K.A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem *276*, 12736-12743.

Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Jr., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. J Biol Chem *272*, 15011-15016.

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. Nature *407*, 971-977.

Kusano, K.F., Nakamura, K., Kusano, H., Nishii, N., Banba, K., Ikeda, T., Hashimoto, K., Yamamoto, M., Fujio, H., Miura, A*., et al.* (2004). Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. Circ J *68*, 671-676.

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

Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. Nature *369*, 621-628.

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

Laugwitz, K.L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J.E., and Schultz, G. (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 116-120.

Lavoie, C., Mercier, J.F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.R., Zhu, W.Z., Xiao, R.P., Lakatta, E.G., Bouvier, M.*, et al.* (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. J Biol Chem *277*, 35402-35410.

Lee, C., Murakami, T., and Simonds, W.F. (1995a). Identification of a discrete region of the G protein gamma subunit conferring selectivity in beta gamma complex formation. J Biol Chem *270*, 8779-8784.

Lee, C.H., Katz, A., and Simon, M.I. (1995b). Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. Mol Pharmacol *47*, 218-223.

Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A.J., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. J Biol Chem *279*, 35671-35678.

Lefkowitz, R.J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. Cell *74*, 409-412.

Li, Y., Sternweis, P.M., Charnecki, S., Smith, T.F., Gilman, A.G., Neer, E.J., and Kozasa, T. (1998). Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. J Biol Chem *273*, 16265-16272.

Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D.*, et al.* (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. Cancer cell *6*, 459-469.

Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., and Engel, A. (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. J Biol Chem *278*, 21655-21662.

Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M.M., Williams, L., and Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. Cancer research *65*, 967-971.

Lilly, L., Fraser, C.M., Jung, C.Y., Seeman, P., and Venter, J.C. (1983). Molecular size of the canine and human brain D2 dopamine receptor as determined by radiation inactivation. Mol Pharmacol *24*, 10-14.

Limbird, L.E., and Lefkowitz, R.J. (1976). Negative cooperativity among beta-adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. J Biol Chem *251*, 5007-5014.

Limbird, L.E., Meyts, P.D., and Lefkowitz, R.J. (1975). Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. Biochem Biophys Res Commun *64*, 1160-1168.

Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. Protein Eng Des Sel *19*, 391-400.

Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. J Biol Chem *267*, 8558-8564.

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. Science *248*, 1547-1550.

Lopez-Gimenez, J.F., Canals, M., Pediani, J.D., and Milligan, G. (2007). The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. Mol Pharmacol *71*, 1015-1029.

Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J.J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1991). The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 8715-8719.

Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K.*, et al.* (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. Science *283*, 655-661.

Maggio, R., Barbier, P., Colelli, A., Salvadori, F., Demontis, G., and Corsini, G.U. (1999). G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. J Pharmacol Exp Ther *291*, 251-257.

Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3103-3107.

Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H., and Benovic, J.L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. Dev Cell *5*, 709-722.

Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. Neuron *27*, 97-106.

Marinissen, M.J., Chiariello, M., Tanos, T., Bernard, O., Narumiya, S., and Gutkind, J.S. (2004). The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. Mol Cell *14*, 29-41.

Martel, C., Dugre-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trepanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., and Desgroseillers, L. (2010). Multimerization of Staufen1 in live cells. RNA *16*, 585-597.

Masri, B., Salahpour, A., Didriksen, M., Ghisi, V., Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2008). Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 13656-13661.

Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.L., Bourrier, E., Ayoub, M.A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prezeau, L.*, et al.* (2008). Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. Nat Methods *5*, 561-567.

Maurel, D., Kniazeff, J., Mathis, G., Trinquet, E., Pin, J.P., and Ansanay, H. (2004). Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. Anal Biochem *329*, 253-262.

McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., and Lefkowitz, R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. Science *290*, 1574-1577.

McLaughlin, J.N., Patterson, M.M., and Malik, A.B. (2007). Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 5662-5667.

McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J., and Milligan, G. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. J Biol Chem *276*, 14092-14099.

Meigs, T.E., Fields, T.A., McKee, D.D., and Casey, P.J. (2001). Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 519-524.

Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D.R., Toran, J.L., and Martinez, A.C. (2001). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. EMBO J *20*, 2497-2507.

Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem *277*, 44925-44931.

Mesnier, D., and Baneres, J.L. (2004). Cooperative conformational changes in a G-protein-coupled receptor dimer, the leukotriene B(4) receptor BLT1. J Biol Chem *279*, 49664-49670.

Miki, N., Keirns, J.J., Marcus, F.R., Freeman, J., and Bitensky, M.W. (1973). Regulation of cyclic nucleotide concentrations in photoreceptors: an ATP-dependent stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by light. Proc Natl Acad Sci U S A *70*, 3820-3824.

Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. Curr Opin Pharmacol *10*, 23-29.

Mixon, M.B., Lee, E., Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis. Science *270*, 954-960.

Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A.C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. Nat Immunol *6*, 465-471.

Montaner, S., Sodhi, A., Servitja, J.M., Ramsdell, A.K., Barac, A., Sawai, E.T., and Gutkind, J.S. (2004). The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia. Blood *104*, 2903-2911.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N.*, et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature *410*, 50-56.

Murakami, M., and Kouyama, T. (2008). Crystal structure of squid rhodopsin. Nature *453*, 363-367.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev *52*, 145-176.

Myers, S.J., Wong, L.M., and Charo, I.F. (1995). Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. J Biol Chem *270*, 5786-5792.

Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell *34*, 807-814.

Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell *80*, 249-257.

Neil, S.J., Aasa-Chapman, M.M., Clapham, P.R., Nibbs, R.J., McKnight, A., and Weiss, R.A. (2005). The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes. J Virol *79*, 9618-9624.

Neubig, R.R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. FASEB J *8*, 939-946.

Neubig, R.R., Gantzos, R.D., and Thomsen, W.J. (1988). Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. Biochemistry *27*, 2374-2384.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F.*, et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer cell *10*, 515-527.

Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., Chung, H.T., Brann, M.R., Seeman, P., and George, S.R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. Biochem Biophys Res Commun *227*, 200-204.

Nguyen, D.H., and Taub, D. (2002). Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. Blood *99*, 4298-4306.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer *9*, 274-284.

Nijmeijer, S., Leurs, R., Smit, M.J., and Vischer, H.F. (2010). The Epstein-Barr virus-encoded G protein-coupled receptor BILF1 hetero-oligomerizes with human CXCR4, scavenges Galphai proteins, and constitutively impairs CXCR4 functioning. J Biol Chem *285*, 29632-29641.

Nimchinsky, E.A., Hof, P.R., Janssen, W.G., Morrison, J.H., and Schmauss, C. (1997). Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. J Biol Chem *272*, 29229-29237.

Nobles, M., Benians, A., and Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 18706-18711.

Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1993). The 2.2 A crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. Nature *366*, 654-663.

O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B.A., McGrane, V., Houamed, K.M., Thomsen, C., Gilbert, T.L., and Mulvihill, E.R. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. Neuron *11*, 41-52.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. J Biol Chem *276*, 19452-19460.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. J Biol Chem *275*, 17201-17210.

Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J.P., and Simon, M.I. (1997). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. Science *275*, 533-536.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell *121*, 335-348.

Orly, J., and Schramm, M. (1976). Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A *73*, 4410-4414.

Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A., and Benovic, J.L. (2000). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4: role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization. J Biol Chem *275*, 25876.

Overton, M.C., and Blumer, K.J. (2000). G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. Curr Biol *10*, 341-344.

Overton, M.C., Chinault, S.L., and Blumer, K.J. (2003). Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycophorin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. J Biol Chem *278*, 49369-49377.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E*., et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science *289*, 739-745.

Palmer, T.M., Gettys, T.W., and Stiles, G.L. (1995). Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. J Biol Chem *270*, 16895-16902.

Panetta, R., and Greenwood, M.T. (2008). Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. Drug Discov Today *13*, 1059-1066.

Papayannopoulou, T., Priestley, G.V., Bonig, H., and Nakamoto, B. (2003). The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. Blood *101*, 4739-4747.

Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. Nature *454*, 183-187.

Park, P.S., Sum, C.S., Pawagi, A.B., and Wells, J.W. (2002). Cooperativity and oligomeric status of cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemistry *41*, 5588-5604.

Park, P.S., and Wells, J.W. (2004). Oligomeric potential of the M2 muscarinic cholinergic receptor. J Neurochem *90*, 537-548.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. J Biol Chem *280*, 9895-9903.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A.*, et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747-752.

Peters, W., Scott, H.M., Chambers, H.F., Flynn, J.L., Charo, I.F., and Ernst, J.D. (2001). Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 7958-7963.

Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Klutzny, M., Kirscht, S., Kreienkamp, H.J., Hollt, V., and Schulz, S. (2001). Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). J Biol Chem *276*, 14027-14036.

Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Laugsch, M., Hollt, V., and Schulz, S. (2002). Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. J Biol Chem *277*, 19762-19772.

Pfleger, K.D., and Eidne, K.A. (2005). Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. Biochem J *385*, 625-637.

Pin, J.P., Comps-Agrar, L., Maurel, D., Monnier, C., Rives, M.L., Trinquet, E., Kniazeff, J., Rondard, P., and Prezeau, L. (2009). G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. J Physiol *587*, 5337-5344.

Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Role of beta gamma subunits of G

proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. Science *257*, 1264-1267.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer *9*, 265-273.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene *111*, 229-233.

Premont, R.T., Macrae, A.D., Aparicio, S.A., Kendall, H.E., Welch, J.E., and Lefkowitz, R.J. (1999). The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation. J Biol Chem *274*, 29381-29389.

Pronin, A.N., and Gautam, N. (1992). Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 6220-6224.

Quinones, M.P., Ahuja, S.K., Jimenez, F., Schaefer, J., Garavito, E., Rao, A., Chenaux, G., Reddick, R.L., Kuziel, W.A., and Ahuja, S.S. (2004). Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis. J Clin Invest *113*, 856-866.

Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S., and Milligan, G. (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. Biochem J *365*, 429-440.

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F.*, et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature *450*, 383-387.

Ratnala, V.R., and Kobilka, B. (2009). Understanding the ligand-receptor-G protein ternary complex for GPCR drug discovery. Methods in molecular biology (Clifton, NJ *552*, 67-77.

Rebois, R.V., Robitaille, M., Petrin, D., Zylbergold, P., Trieu, P., and Hebert, T.E. (2008). Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. Methods *45*, 214-218.

Remy, I., and Michnick, S.W. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. Nat Methods *3*, 977-979.

Ren, X.R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 1448-1453.

Rhee, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. Annu Rev Biochem *70*, 281-312.

Richert, M.M., Vaidya, K.S., Mills, C.N., Wong, D., Korz, W., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2009). Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. Oncology reports *21*, 761-767.

Rikitake, Y., and Liao, J.K. (2005). ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. Expert review of cardiovascular therapy *3*, 441-451.

Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. Pharmacol Ther *92*, 71-87.

Rivero-Muller, A., Chou, Y.Y., Ji, I., Lajic, S., Hanyaloglu, A.C., Jonas, K., Rahman, N., Ji, T.H., and Huhtaniemi, I. (2010). Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 2319-2324.

Rives, M.L., Vol, C., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M.A., Shigemoto, R., Pin, J.P., and Prezeau, L. (2009). Crosstalk between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration. EMBO J *28*, 2195-2208.

Robbins, M.J., Calver, A.R., Filippov, A.K., Hirst, W.D., Russell, R.B., Wood, M.D., Nasir, S., Couve, A., Brown, D.A., Moss, S.J.*, et al.* (2001). GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. J Neurosci *21*, 8043-8052.

Robishaw, J.D., Russell, D.W., Harris, B.A., Smigel, M.D., and Gilman, A.G. (1986). Deduced primary structure of the alpha subunit of the GTP-binding stimulatory protein of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A *83*, 1251-1255.

Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C., and Patel, Y.C. (2000a). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. Science *288*, 154-157.

Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R.C., and Patel, Y.C. (2000b). Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. J Biol Chem *275*, 7862-7869.

Rodriguez-Frade, J.M., del Real, G., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Soriano, S.F., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Lucas, P., Prieto, I., Martinez, A.C.*, et al.* (2004). Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. EMBO J *23*, 66-76.

Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Albar, J.P., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces

functional responses through dimerization of its receptor CCR2. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 3628-3633.

Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. Blood *101*, 399-406.

Romano, C., Yang, W.L., and O'Malley, K.L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. J Biol Chem *271*, 28612-28616.

Rondard, P., Huang, S., Monnier, C., Tu, H., Blanchard, B., Oueslati, N., Malhaire, F., Li, Y., Trinquet, E., Labesse, G.*, et al.* (2008). Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. EMBO J *27*, 1321-1332.

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature *459*, 356-363.

Rosenfeldt, H., Castellone, M.D., Randazzo, P.A., and Gutkind, J.S. (2006). Rac inhibits thrombin-induced Rho activation: evidence of a Pak-dependent GTPase crosstalk. Journal of molecular signaling *1*, 8.

Rozenfeld, R., and Devi, L.A. (2007). Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. FASEB J *21*, 2455-2465.

Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J.F., Lagace, M., Marullo, S., and Bouvier, M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. J Biol Chem *279*, 33390-33397.

Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7265-7270.

Scheerer, P., Heck, M., Goede, A., Park, J.H., Choe, H.W., Ernst, O.P., Hofmann, K.P., and Hildebrand, P.W. (2009). Structural and kinetic modeling of an activating helix switch in the rhodopsin-transducin interface. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 10660-10665.

Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. Nature *455*, 497-502.

Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., and Neer, E.J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. J Biol Chem *267*, 13807-13810.

Schoneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Rompler, H., and Sangkuhl, K. (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. Pharmacol Ther *104*, 173-206.

Schwarz, M.K., and Wells, T.N. (2002). New therapeutics that modulate chemokine networks. Nat Rev Drug Discov *1*, 347-358.

Seitz, H.R., Heck, M., Hofmann, K.P., Alt, T., Pellaud, J., and Seelig, A. (1999). Molecular determinants of the reversible membrane anchorage of the G-protein transducin. Biochemistry *38*, 7950-7960.

Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005). Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. Sci STKE *2005*, cm10.

Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol *59*, 223-239.

Shyu, Y.J., Liu, H., Deng, X., and Hu, C.D. (2006). Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. Biotechniques *40*, 61-66.

Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M.*, et al.* (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 14759-14764.

Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P.J., Tran, T., Brass, L.F., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Holmes, W., Dallas, W.*, et al.* (1997). Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. J Cell Biol *139*, 651-664.

Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A., and Marsh, M. (1998). Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. J Cell Sci *111 (Pt 18)*, 2819-2830.

Smith, M.C., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer research *64*, 8604-8612.

So, C.H., Varghese, G., Curley, K.J., Kong, M.M., Alijaniaram, M., Ji, X., Nguyen, T., O'Dowd B, F., and George, S.R. (2005). D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. Mol Pharmacol *68*, 568-578.

Sohy, D., Parmentier, M., and Springael, J.Y. (2007). Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. J Biol Chem *282*, 30062-30069.

Sohy, D., Yano, H., de Nadai, P., Urizar, E., Guillabert, A., Javitch, J.A., Parmentier, M., and Springael, J.Y. (2009). Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists. J Biol Chem *284*, 31270-31279.

Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1994). GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. Nature *372*, 276-279.

Sorensen, T.L., Ransohoff, R.M., Strieter, R.M., and Sellebjerg, F. (2004). Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. Eur J Neurol *11*, 445-449.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S.*, et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10869-10874.

Spring, D.J., and Neer, E.J. (1994). A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit. J Biol Chem *269*, 22882-22886.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E.J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature *425*, 307-311.

Stanasila, L., Perez, J.B., Vogel, H., and Cotecchia, S. (2003). Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. J Biol Chem *278*, 40239-40251.

Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., and Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. J Biol Chem *266*, 9912-9918.

Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C.R., Nyfeler, B., Bouvier, M., and Michnick, S.W. (2007). Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 16916-16921.

Stein, O., Dabach, Y., Ben-Naim, M., Halperin, G., Charo, I.F., and Stein, Y. (2003). In CCR2-/- mice monocyte recruitment and egress of LDL cholesterol in vivo is impaired. Biochem Biophys Res Commun *300*, 477-481.

Strieter, R.M., and Kunkel, S.L. (1993). The immunopathology of chemotactic cytokines. Adv Exp Med Biol *351*, 19-28.

Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. J Biol Chem *277*, 49212-49219.

Sutherland, E.W., Jr., and Wosilait, W.D. (1955). Inactivation and activation of liver phosphorylase. Nature *175*, 169-170.

Tamamura, H., Hori, A., Kanzaki, N., Hiramatsu, K., Mizumoto, M., Nakashima, H., Yamamoto, N., Otaka, A., and Fujii, N. (2003). T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. FEBS letters *550*, 79-83.

Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. The Journal of biological chemistry *281*, 39542-39549.

Tarasova, N.I., Stauber, R.H., and Michejda, C.J. (1998). Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. J Biol Chem *273*, 15883-15886.

Taylor, J.M., Jacob-Mosier, G.G., Lawton, R.G., VanDort, M., and Neubig, R.R. (1996). Receptor and membrane interaction sites on Gbeta. A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus. J Biol Chem *271*, 3336-3339.

Terashima, Y., Onai, N., Murai, M., Enomoto, M., Poonpiriya, V., Hamada, T., Motomura, K., Suwa, M., Ezaki, T., Haga, T.*, et al.* (2005). Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis. Nat Immunol *6*, 827-835.

Terrillon, S., Barberis, C., and Bouvier, M. (2004). Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 1548-1553.

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

Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M.A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., and Bouvier, M. (2003). Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. Mol Endocrinol *17*, 677-691.

Tesmer, V.M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., and Tesmer, J.J. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. Science *310*, 1686-1690.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871-890.

Tolkovsky, A.M., and Levitzki, A. (1978). Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. Biochemistry *17*, 3795.

Toth, P.T., Ren, D., and Miller, R.J. (2004). Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. J Pharmacol Exp Ther *310*, 8-17.

Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. Cell *137*, 1032-1046.

van Buul, J.D., Voermans, C., van Gelderen, J., Anthony, E.C., van der Schoot, C.E., and Hordijk, P.L. (2003). Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. J Biol Chem *278*, 30302-30310.

Van Coillie, E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev *10*, 61-86.

van der Linden, A.M., Moorman, C., Cuppen, E., Korswagen, H.C., and Plasterk, R.H. (2003). Hyperactivation of the G12-mediated signaling pathway in Caenorhabditis elegans induces a developmental growth arrest via protein kinase C. Curr Biol *13*, 516-521.

Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Pelzek, A.J., and Volkman, B.F. (2005). The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. Protein Sci *14*, 1071-1081.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., 3rd, Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008). Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. Sci Signal *1*, ra4.

Venter, J.C., Schaber, J.S., U'Prichard, D.C., and Fraser, C.M. (1983). Molecular size of the human platelet alpha 2-adrenergic receptor as determined by radiation inactivation. Biochem Biophys Res Commun *116*, 1070-1075.

Vidi, P.A., Chemel, B.R., Hu, C.D., and Watts, V.J. (2008). Ligand-dependent oligomerization of dopamine D(2) and adenosine A(2A) receptors in living neuronal cells. Mol Pharmacol *74*, 544-551.

Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. FASEB J *13*, 1699-1710.

Vilardaga, J.P., Bunemann, M., Krasel, C., Castro, M., and Lohse, M.J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. Nat Biotechnol *21*, 807-812.

Vilardaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z., and Lohse, M.J. (2008). Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. Nat Chem Biol *4*, 126-131.

Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. Annu Rev Pharmacol Toxicol *48*, 171-197.

Violin, J.D., Ren, X.R., and Lefkowitz, R.J. (2006). G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. J Biol Chem *281*, 20577-20588.

Vroon, A., Heijnen, C.J., Raatgever, R., Touw, I.P., Ploemacher, R.E., Premont, R.T., and Kavelaars, A. (2004). GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. J Leukoc Biol *75*, 698-704.

Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. Cell *83*, 1047-1058.

Wang, J., He, L., Combs, C.A., Roderiquez, G., and Norcross, M.A. (2006). Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. Mol Cancer Ther *5*, 2474-2483.

Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G., and Schertler, G.F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature *454*, 486-491.

Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol *6*, 718-730.

Weiss, E.R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M.H., Bertram, P.T., Wong, F., Kraft, T.W., and Osawa, S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. Mol Vis *4*, 27.

Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. FASEB J *11*, 346-354.

Wess, J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. Pharmacol Ther *80*, 231-264.

White, J.F., Grodnitzky, J., Louis, J.M., Trinh, L.B., Shiloach, J., Gutierrez, J., Northup, J.K., and Grisshammer, R. (2007). Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 12199-12204.

White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., and Marshall, F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. Nature *396*, 679-682.

Whorton, M.R., Bokoch, M.P., Rasmussen, S.G., Huang, B., Zare, R.N., Kobilka, B., and Sunahara, R.K. (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 7682-7687.

Willets, J.M., Challiss, R.A., and Nahorski, S.R. (2003). Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? Trends Pharmacol Sci *24*, 626-633.

Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horvath, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E.*, et al.* (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. Nat Med *14*, 64-68.

Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. Trends in pharmacological sciences *29*, 582-589.

Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C.*, et al.* (2010). Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. Science.

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W.*, et al.* (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. Nature *384*, 179-183.

Wu, P., and Brand, L. (1994). Resonance energy transfer: methods and applications. Anal Biochem *218*, 1-13.

Xu, J., He, J., Castleberry, A.M., Balasubramanian, S., Lau, A.G., and Hall, R.A. (2003a). Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. J Biol Chem *278*, 10770-10777.

Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H.R. (2003b). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. Cell *114*, 201-214.

Xu, N., Bradley, L., Ambdukar, I., and Gutkind, J.S. (1993). A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 6741-6745.

Xu, N., Voyno-Yasenetskaya, T., and Gutkind, J.S. (1994). Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. Biochem Biophys Res Commun *201*, 603-609.

Xu, Y., Piston, D.W., and Johnson, C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 151-156.

Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V.R., Swaminath, G., Farrens, D., and Kobilka, B. (2006). Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. Nat Chem Biol *2*, 417-422.

Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., and Leonard, E.J. (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Lett *244*, 487-493.

Yoshioka, K., Saitoh, O., and Nakata, H. (2002). Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells. FEBS Lett *523*, 147-151.

Zeng, F.Y., and Wess, J. (1999). Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. J Biol Chem *274*, 19487-19497.

Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Ferguson, S.S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. J Biol Chem *274*, 10999-11006.

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

Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. Int J Cancer *119*, 2026-2029.

Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. The Journal of pathology *215*, 211-213.

Annexe

Article 4

Multimerization of Staufen1 in live cells

XXXVI

Multimerization of Staufen1 in live cells

Catherine Martel*[1], Samuel Dugré-Brisson*, Karine Boulay*, Billy Breton, Gabriel Lapointe, Sylvain Armando, Véronique Trépanier, Thomas Duchaîne[2], Michel Bouvier and Luc DesGroseillers[‡]

Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. H3C 3J7

Running title: Staufen1 organizes ribonucleoprotein complexes

Keywords: Staufen, ribonucleoprotein, mRNA transport, mRNA granule, mRNA particle.

* The first three authors contributed equally to this work.

[‡] **To whom correspondence should be addressed:**

Luc DesGroseillers : Département de biochimie, Université de Montréal, PO Box 6128 Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7. [redacted]

[redacted]

[1]**: Present address:** Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA and Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Road, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA. [redacted]

[2]**: Present address**: Department of biochemistry, McGill University, and McGill Cancer Center, McIntyre Medical Sciences Building, 3655 Promenade Sir-William-Osler, Montréal, Qc, Canada. H3G 1Y6. [redacted]

Abstract

Transport of mRNA is an efficient mechanism to target proteins to specific regions of a cell. Although it is well documented that mRNA are transported in ribonucleoprotein (RNP) complexes, several of the mechanisms involved in complex formation and localization are poorly understood. Staufen (Stau) 1, a double-stranded RNA-binding protein is a well accepted marker of mRNA transport complexes. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-associates in live cells using immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. The double-stranded RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 contributed for about half of the signal suggesting that Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association. Protein-protein interaction also occurred, via dsRBD5 and dsRBD2, as shown by in vitro pull-down, yeast two-hybrid and BRET assays in live cells. Interestingly, Stau1 self-association contributes to the formation of oligomeric complexes as evidenced by the co-expression of split *Renilla* luciferase halves covalently linked to Stau1 in a protein complementation assay (PCA) combined with BRET assay with Stau1-YFP. Moreover, we showed that these high-order Stau1-containing complexes carry RNAs when the RNA-stain SYTO 14 was used as the energy acceptor in the PCA/BRET assay. The oligomeric composition of Stau1-containing complexes and the presence of specific mRNAs have been confirmed by biochemical approaches involving two successive immunoprecipitations of Stau1-tagged molecules followed by qRT-PCR amplification. Altogether, these results indicate that Stau1 self-associates in mRNPs via its multiple functional domains that can select mRNAs to be transported and establish protein-protein interaction.

Introduction

Cytoplasmic mRNA transport and local translation to defined subcellular domains allow efficient spatial and temporal restriction of genetic expression (Sossin and DesGroseillers 2006; Rodriguez et al. 2008; Martin and Ephrussi 2009). This phenomenon is observed in a large variety of cell types and organisms and has been shown to play an important role in processes such as learning and memory, synaptic transmission, axis formation during development, cell motility, and asymmetric cell division. Evidence supports a model in which the differential delivery of new mRNAs to subcellular domains occurs in motile ribonucleoprotein (RNP) structures. A compelling framework was suggested about how mRNA localization could be achieved in an ordered, multi-step pathway. It predicted (a) the formation of mRNPs as a functional complex, (b) the transport of these particles to their destination via cytoskeletal elements and motor proteins and (c) the de-repression of translation of the localized mRNAs. RNA-binding proteins (RBP) become associated with mRNAs either in the nucleus or during re-modeling of the complex in the cytoplasm forming a heterogeneous population of transport complexes. While the composition of mRNA transport complexes begins to be elucidated, less is known about the role(s) of these various RBPs in the mechanism of transport.

Staufen is a member of the double-stranded RNA-binding protein (dsRBP) family. It was first described in *Drosophila melanogaster* where it is required during development for the localization of the *oskar* and *bicoid* transcripts at the posterior and anterior poles of the oocytes, respectively (St Johnston et al. 1991). Staufen was also shown to be required for translational derepression of *osk* mRNA once properly localized (Kim-Ha et al. 1995; Micklem et al. 2000). In mammals, two homologous Staufen genes, *Stau1* and *Stau2,* were identified (DesGroseillers and Lemieux 1996; Buchner et al. 1999; Kiebler et al. 1999; Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999;

Duchaine et al. 2002). Stau1 is a multi-functional protein involved in different pathways of RNA metabolism. In neurons, Stau1 is required for the transport and localization of specific mRNAs to dendrites (Kiebler et al. 1999; Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Disruption of Staufen blocks transcription-dependent forms of synaptic plasticity/memory in Drosophila (Dubnau et al. 2003), Aplysia (Liu et al. 2006) and rodents (Lebeau et al. 2008). In addition to its role in mRNA transport, Stau1 plays additional roles in the regulation of post-transcriptional mRNA expression. When bound to the 3'UTR of mRNAs, Stau1 recruits the non-sense mediated decay (NMD) factor Upf1 and triggers degradation of the bound mRNAs (Kim et al. 2005; Kim et al. 2007). In contrast to the NMD pathway that recognizes and degrades mRNAs with a premature termination codon, Stau1-mediated mRNA decay is not a quality control mechanism but rather a *bona fide* mechanism of regulation of gene expression modulating the stability of natural mRNAs. In contrast, when bound to the 5'UTR of mRNAs, Stau1 enhances their translational efficiency (Dugre-Brisson et al. 2005).

Stau1 is a modular protein characterized by the presence of two conserved consensus amino acid sequences that fold into a domain involved in double-stranded RNA binding (dsRBD3, dsRBD4) (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999). The α–β–β–β–α structure of this domain interacts with the phosphate-backbone of the double helix RNA in its minor and major grooves (Ryter and Schultz 1998; Ramos et al. 2000). Stau1 also contains 2 truncated dsRBDs (dsRBD2, dsRBD5) in which amino acid sequence conservation is restricted to the C-terminal half of the consensus (Lunde et al. 2007). These domains are unable to bind RNA. A tubulin-binding domain (TBD) is located between dsRBD4 and dsRBD5 and is believed to be involved in mRNA transport on the cytoskeleton (Wickham et al. 1999). Proteomic and cell biological experiments have clearly established that Stau1 is a component of ribonucleoprotein complexes

in several cell types (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004).

Although it is well accepted that Stau1 is a marker of mRNA transport complexes and a crucial player for mRNA transport (Kanai et al. 2004; Sossin and DesGroseillers 2006; Vessey et al. 2008), its exact roles within RNPs are still unclear. It is known that several proteins of the dsRBP family such as TRBP2, XlrbpA, ADAR2, PACT and Rnt1p have the capacity to dimerize through their dsRBDs (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). For many of these proteins, structural rearrangements resulting from homo- and/or hetero-dimerization are required for functional activation and therefore dimerization may serve as a molecular regulator. Therefore, we tested whether Stau1, in addition to its other roles in mRNA processing, organizes Stau1-containing mRNPs through self-multimerization. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-interacts in live cells to form multimeric structures and identify the molecular determinants involved in this property. We further show that these complexes contain specific RNAs.

Results

Differentially tagged-Stau1 are found in common complexes *in vivo*

To determine whether Stau1 forms complexes in mammalian cells, we used immunoprecipitation of differentially-tagged Stau1 proteins. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-HA_3 and either poly(A)-binding protein (PABP)-YFP, Stau1-YFP or YFP. Western blot experiments indicated that transfected proteins were well expressed and that the levels of expression of Stau1-HA_3 and Stau1-YFP were close to that of endogenous Stau1 (Fig. 1A). Proteins in the cell extracts were then immunoprecipitated using anti-GFP antibody and co-immunoprecipitated proteins were analysed by western blotting (Fig. 1A). In these conditions, Stau1-HA_3 was co-immunoprecipitated with Stau1-YFP and to lesser extend with PABP-YFP. In contrast, Stau1-HA_3 was not co-immunoprecipitated when co-expressed with YFP. Interestingly, endogenous Stau1[55] was also found in the precipitates revealing the biological relevance of these interactions. Treatment of the cell extracts with RNase A before immunoprecipitation did not abolish Stau1/Stau1 interactions but prevented PABP-YFP/Stau1-HA_3 interaction. These results show that endogenous and differentially-tagged Stau1 are found in common complexes and that, if they are bound to RNA, their association is close enough to be protected from RNase degradation in contrast to that of Stau1-PABP.

To determine if Stau1 monomers can self-associate in these complexes, we used an *in vitro* pull-down assay. Bacterially expressed and purified his_6-Stau1 and his_6-NEP, used as negative control, were loaded on Ni-NTA columns. In vitro synthesized ^{35}S-labeled Stau1 was loaded on the his_6-Stau1 and his_6-NEP columns. After several washing steps, his_6-Stau1 and his_6-NEP were eluted from the columns and the co-eluted ^{35}S-labeled Stau1 was detected by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 1B). Whereas ^{35}S-labeled Stau1 was retained on the his_6-Stau1

column, it was absent from the his_6-NEP column showing that Stau1 interacts with itself in this assay. The Stau1-Stau1 interaction was done in the presence of RNase A (50 μg/ml). In these conditions, ^{35}S-labeled Stau1 still interacted with his_6-Stau1. These results indicate that Stau1 has the capacity to dimerize if not oligomerize and that protein-protein interactions contribute at least in part to Stau1 self-interaction.

Stau1 self-associates in live cells

Our results indicate that several Stau1 monomers are found in common complexes in vivo and that direct interaction may contribute to complex formation. In order to confirm the proximity (or interaction) of Stau1 molecules within mRNPs in live cells, BRET assays were used (Fig. 2A). In this technique, one candidate interacting protein is fused to *Renilla* luciferase, a luminescent energy donor, and the other to YFP, a fluorescent energy acceptor. The two fusion proteins are then coexpressed in the same cells. If the two proteins interact, their close proximity allows nonradiative energy transfer (BRET) between the luciferase and the YFP. BRET does not occur if the two proteins are separated by more than 100 Å, making the technique ideal for monitoring protein-protein interactions in biological systems. Therefore, *R*luc and to YFP were fused at the C-terminus of Stau1. Fixed amounts of Stau1-*R*luc were transfected in combination with increasing amounts of Stau1-YFP (Fig. 2B), PABP-YFP or YFP to generate BRET saturation curves (Fig. 2C). Co-expression of Stau1-*R*luc and Stau1-YFP produced a strong BRET signal in live cells comparable to that of proteins known to form obligatory dimers (Fig. 2C -$GABA_B$ receptors) suggesting a close proximity between these two proteins. In contrast, Stau1-*R*luc only produced a negligible BRET signal when co-expressed with PABP-YFP or YFP, confirming the specificity of the Stau1-*R*luc/Stau1-YFP BRET signal and suggesting that the

binding of two RNA-binding proteins on RNA molecules is not sufficient to induce a strong BRET signal. The BRET assay was then performed with cell extracts allowing us to determine whether the interaction is sensitive to RNase treatment or not. Cells were lysed and the resulting cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes before fluorescence measurement. There was no significant difference in Stau1-*R*luc/Stau1-YFP BRET signals between RNase A-treated and untreated extracts (Fig. 2D).

RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association in live cells

Although Stau1 self-association is resistant to RNase treatment and can occur with purified proteins in vitro, it is possible that an RNA molecule may be required during an initial step that triggers Stau1 self-association or that a linker RNA is protected from RNase A degradation by bound Stau1 molecules. To determine whether Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association, RNA-binding defective Stau1 mutants were fused to YFP and used in the BRET assay described above to determine their ability to interact with the wild-type Stau1-*R*luc. Mutations were introduced in Stau1 dsRBD3, a domain shown to carry the major Stau1 RNA-binding activity, and in dsRBD4, a domain carrying a weak RNA-binding activity *in vitro* (Wickham et al. 1999)(Fig. 3A). Four mutants were generated by either deletion of the complete dsRBD3 (Stau1$^{\Delta 3}$-YFP) or dsRBD4 (Stau1$^{\Delta 4}$-YFP) or through point mutations in amino acids required for RNA binding in dsRBD3 (Stau1^{KK}-YFP) or in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}-YFP). In these mutants, lysines 153 and 154 in dsRBD3 and lysines 256 and 257 in dsRBD4 were mutated to alanines. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-*R*luc and either one of the mutated fusion proteins (Fig. 3B). BRET signals were calculated in live cells 24 h post-transfection. Following expression of mutants in dsRBD3 alone (Stau1^{KK} and Stau1$^{\Delta 3}$), the BRET ratio was weakly affected being only reduced by about 20% (77% ± 10% and

77,5 ± 0,9%, respectively) as compared to the BRET activity generated with the wild type Stau1-YFP (Fig. 3C). When mutations were introduced in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}), the BRET ratio was further reduced to 51,8% (± 0,4%) of the one obtained with Stau1-YFP. These results indicate that Stau1 RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association and may be required to select mRNAs in Stau1-containing mRNPs and/or help to initiate or stabilize protein-protein interaction. Nevertheless, protein-protein interaction seems to also contribute to Stau1 self-association in live cells.

Characterization of the protein-protein determinants required for Stau1 self-association

To identify the molecular determinants involved in protein interaction, we first expressed different combinations of wild type and Stau1 deletion mutants (Fig. 4A-B) fused to either *R*luc or YFP and measured their BRET activity in live cells (Fig. 4C-E). When co-expressed with wild type Stau1, Stau1$^{\Delta 2}$ or Stau1$^{\Delta 5}$ expression reduced the BRET activity by about 20% and 50%, respectively, as compared to that obtained with wild type Stau1 (Fig. 4C). These results suggest that dsRBD5 and dsRBD2 are major and minor determinants involved in the protein-protein aspect of Stau1 self-association, respectively. To further characterize these interactions, we then calculated BRET activity following co-expression of these two fusion proteins: Stau1$^{\Delta 5}$-*R*luc/Stau1$^{\Delta 2}$-YFP, Stau1$^{\Delta 2}$-*R*luc/Stau1$^{\Delta 2}$-YFP, Stau1$^{\Delta 5}$-*R*luc/Stau1$^{\Delta 5}$-YFP and Stau1$^{\Delta 2}$-*R*luc/Stau1$^{\Delta 5}$-YFP. As shown in Figure 4D, co-expression of Stau1$^{\Delta 5}$-*R*luc and Stau1$^{\Delta 5}$-YFP showed a BRET activity that was reduced to 51,3% (± 0,1%) consistent with a significant role of dsRBD5 in Stau1 association. In contrast, co-expression of Stau1$^{\Delta 2}$-*R*luc and Stau1$^{\Delta 2}$-YFP generated a BRET signal that was similar to that obtained with Stau1-*R*luc and Stau1-YFP. Finally, BRET signals generated by the co-expression of the Stau1$^{\Delta 5}$-Rluc/Stau1$^{\Delta 2}$-YFP or

Stau1$^{\Delta 2}$-Rluc/Stau1$^{\Delta 5}$-YFP pairs were highly reduced being only about 25% (32,8% ± 0,2% and 24,3% ± 0,4%, respectively) of the BRET activity generated by the Stau1 wild-type pair (Fig. 4D). Consistently, a Stau1 mutant that only carried the dsRBD4 and tubulin-binding domains (RBD4/TBD) did not generate BRET signal when expressed with wild-type Stau1 (Fig. 4E). Altogether, these results indicate that dsRBD5 is clearly involved in Stau1 self-interaction in live cells whereas the role of dsRBD2 is less clear.

To confirm that dsRBD5 and dsRBD2 are the molecular determinants involved in Stau1-Stau1 protein interaction, the yeast two-hybrid system was used. The full-length Stau1 protein was fused to the B42 transcription activator whereas each of the four dsRBDs of Stau1 and the tubulin-binding domain (TBD) were individually fused to the LexA DNA-binding domain. After selection for the presence of both plasmids in the yeast strains, cells were plated on a Ura$^-$, His$^-$, Trp$^-$, Leu$^-$ medium with galactose and X-Gal. Our results showed that only yeast cells expressing the dsRBD2- and dsRBD5-LexA fusion proteins grew on the selective medium and produced β-galactosidase activity (Fig. 4F). Therefore, both dsRBD2 and dsRBD5 can interact with the full-length Stau1 protein in this assay.

Sub-cellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants

To determine whether the differential BRET responses obtained with the Stau1 mutants may be explained by major defects in the sub-cellular distribution of these proteins, Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were expressed in COS-7 cells and their sub-cellular distribution observed by fluorescence microscopy. HEK293T cells were not used in this assay because of the small size of their cytoplasm. As previously shown (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999), Stau1-YFP showed a granular distribution in the cytoplasm and nuclear exclusion. Stau1$^{\Delta 5}$-YFP, a mutant

that produced weak BRET signals (Fig. 4), had a sub-cellular distribution similar to that of Stau1-YFP (Fig. 5). As compared to Stau1-YFP, Stau1^{KK}-YFP showed an additional weak nucleolar distribution and mutants in the RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 showed cytosolic granules that are lightly bigger than those observed with Stau1-YFP. However, this cannot explain the difference in the BRET response of Stau1^{4K}-YFP as compared to the others (Fig. 3C). The distribution of 4/TBD-YFP is random and similar to that of YFP alone as previously described (Luo et al. 2002).

Stau1 forms oligomers in live cells

Knowing that Stau1 is present in large mRNP complexes, we assess the capacity of Stau1 to form higher order structures in live cells. To this end, we combined protein complementation (PCA) and BRET assays (Fig. 6A). For the PCA assay, *R*luc is cut into two non-functional half (*R*luc^{F1} and *R*luc^{F2}). Each half of the split luciferase protein cannot by itself generate light when express into cells. However, their fusion to proteins that interact via protein-protein interaction allows the reconstitution of a functional luciferase and light emission. Therefore, the N-terminal half (Stau1-*R*luc^{F1}) and the C-terminal half (Stau1-*R*luc^{F2}) of a split *R*luc protein were fused at the C-terminus of Stau1. Consistent with the BRET assay, co-expression of Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} reconstituted a functional luciferase that produced light (8293 ± 1341 arbitrary units (AU)) via Stau1-Stau1 interaction whereas expression of either fusion protein alone did not (580 ± 87 and 529 ± 41 AU, respectively). Then, to determine whether additional Stau1 molecules can interact with this complex in live cells, the PCA assay with Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} was repeated in the presence of increasing concentration of Stau1-YFP for BRET measurement. If Stau1 induces the formation of large complexes, a complete Stau1-Stau1-*R*luc will be reconstituted and will transfer energy to the Stau1-YFP that will be present in the same complex.

As shown in figure 6B, co-expression of Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} and Stau1-YFP produced a strong BRET saturation curve, suggesting that at least three Stau1 molecules associate in these complexes. These interactions between Stau1 molecules were resistant to RNAse treatment (Fig. 6C), consistent with results shown in Fig. 2D. In contrast, Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} did not produce BRET activity when co-expressed with YFP or PABP-YFP (Fig. 6B). Other controls were done with CXCR4, a protein that does not interact with Stau1. Stau1-*R*luc^{F1} and CXCR4-*R*luc^{F2} as well as Stau1-*R*luc^{F2} and CXCR4-*R*luc^{F1} did not produce significant luciferase activity when co-expressed (533 ± 59 and 613 ± 19 AU, respectively); CXCR4-*R*luc^{F1} and CXCR4-*R*luc^{F2} two proteins known to interact in live cells (Hamdan et al. 2006) did not transfer energy to Stau1-YFP in the BRET assay (data not shown).

Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs

To determine whether Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs, we modified the live cells assay that combined PCA and BRET to detect RNA-protein interaction (Fig. 7A). In this assay, Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} were co-expressed to reconstitute luciferase activity while SYTO 14, a dye that stains RNA was used as the energy acceptor. If Stau1-containing oligomers associate with RNA, BRET signal will be generated as a consequence of the close proximity between the reconstituted *R*luc and SYTO 14. As shown in Figure 7B, expression of both Stau1-Rluc and the split Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} generated BRET signals when RNA was stained with SYTO 14 indicating that RNAs are present in the Stau1-containing complex. In contrast, *R*luc activity resulting from interaction of the split protein kinase A (PKA) regulatory subunit-*R*luc^{F1} and PKA catalytic subunit-*R*luc^{F2} did not induce BRET signal in the presence of SYTO 14. Whereas luciferase activity generated by interaction of the split *R*luc fusion proteins was not impaired by RNase treatment (data not shown and Fig. 6C), the observed Stau1-Stau1-

*R*luc/SYTO 14 BRET signal was sensitive to RNase treatment indicating that Stau1-containing complexes indeed contain RNAs (Fig. 7C).

To confirm the formation of RNA-containing Stau1-oligomers, a biochemical approach involving two successive immunoprecipitation steps was used. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1-HA_3 and either YFP, Stau1-YFP and/or Stau1-FLAG (Fig. 8A). The level of expression of these proteins was evaluated by western blotting. First, Stau1-containing complexes were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies and eluted with the FLAG peptide. The resulting complexes contained Stau1-HA_3 and Stau1-YFP when co-expressed. Then, Stau1-FLAG-containing complexes were re-immunoprecipitated using anti-GFP antibody. The resulting pellet also contained Stau1-HA_3 and Stau1-FLAG indicating that the three tagged-Stau1 proteins were present in the same complexes. As controls, other combinations of transfected Stau1-tagged molecules lacking either Stau1-FLAG or Stau1-GFP did not bring down Stau1-HA_3.

To determine whether the Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs, immunoprecipitates obtained from the successive-IPs were treated with Trizol reagent to isolate putative RNAs and the resulting material was analyzed by qRT-PCR. Arf1 and PAICS mRNAs, two known Stau1-bound mRNAs (Kim et al. 2005) were specifically amplified from samples of the two successive IPs and were absent from other controls IPs (Fig. 8B). To discriminate between specific Stau1-mRNA association and non-physiological aggregates of mRNPs, we calculated the ratio between the amount of Arf1 and PAICS mRNAs in the successive immunoprecipitates and their amount in the cells before IPs (IP/input). As control for specificity, we also calculated the ratio of an abundant non-Stau1-interacting mRNA coding for the ribosomal protein RPL22. When the ratio obtained for RPL22 mRNA was arbitrary normalized to 1, an enrichment ranging from 13 to 20 fold was observed for Arf1 mRNA and from 32 to 43

fold for PAICS mRNA. Altogether these results indicate that Arf1 and PAICS mRNAs are highly enriched in the multimeric complexes as compared to non-Stau1 interacting controls.

Discussion

Many proteins self-associate to generate dimers and/or oligomers and this structural reorganization is essential to control their function, structure and/or regulation (Marianayagam et al. 2004). Enzymatic regulation, cell signalling, DNA binding and regulation of gene expression are a few examples among all the molecular activities that are regulated by protein self-interaction. Especially, proteins of the dsRBP family such as PKR, TRBP2, XlrbpA, ADAR2, PACT and Rnt1p are known to form homo- and/or hetero-dimers (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Lemaire et al. 2005; Valente and Nishikura 2007). The structural rearrangement resulting from dimerization is required for their functional activation and therefore dimerization serves as a molecular regulator (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). In this paper, we show that Stau1, as other members of the dsRBP family, self-associates. Using novel approaches in live cells, we further showed that Stau1 generates multimeric complexes through both RNA-binding activity and protein-protein self-interaction and that these complexes contain specific RNAs. Our results suggest that Stau1 has the potential to act as a scaffolding protein that organizes mRNAs into functional mRNPs.

Molecular determinants for mRNP formation

Our BRET assays indicate that Stau1 RNA binding activity or intact dsRBD3 and dsRBD4 contributes for about 50% of the Stau1 self-association (Fig. 3). Several biochemical studies (Nanduri et al. 2000) as well as NMR and crystallographic structures of bacterially expressed dsRBDs (Bycroft et al. 1995; Kharrat et al. 1995; Ryter and Schultz 1998; Nanduri et al. 2000; Ramos et al. 2000) indicate that RNA-binding competent dsRBDs behave as monomeric forms. Therefore, it is likely that the contribution of these domains to Stau1 self-interaction

depends on their capability to bind RNA and not on putative protein-protein interaction. In addition, our observation that protein interactions occur via other domains that do not bind RNAs in vitro (Wickham et al. 1999) supports a model in which dsRBD3 and dsRBD4 are free to interact with mRNAs. Stau1 RNA-binding activity may then be used to recognize and select mRNAs to be included in mRNPs. Subsequently, it may facilitate the association of Stau1 monomers on a dsRNA structure and then facilitate the recognition, formation and/or maintenance of protein-protein interaction mediated by dsRBD5 and dsRBD2.

The RNA-binding activity is nevertheless not essential for subsequent protein-protein interaction. Indeed, about 50% of the BRET activity is still detectable when RNA-binding deficient Stau1 mutants are expressed in vivo (Fig. 3). Accordingly, Stau1 self-association can be detected in vitro using purified proteins in the presence of RNase (Fig. 1B) revealing the intrinsic property of Stau1 to self-associate. This is consistent with previous studies in which dsRBPs form dimers through both dsRBDs and other domains not involved in RNA-binding (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Valente and Nishikura 2007). Our results identified dsRBD5 as the major determinant for protein-protein interaction, contributing for about 50% of the Stau1 self-interaction (Fig. 4C). Homophilic interaction between dsRBD5s may contribute to stabilize particle formation on mRNAs. The role of dsRBD2 is less clear. Although it can interact with Stau1 in the yeast assay (Fig. 4F), its deletion has no impact on the BRET signal in live cells (Fig. 4C). Interestingly, heterophilic interactions between dsRBD5 and the N-terminal end of Stau1 (including dsRBD2) were observed in the yeast two-hybrid assay (unpublished data). This observation would permit to generate large multimeric complexes through homo- and heterophilic interactions between dsRBDs. Moreover, it opens the additional possibility that Stau1 structure and/or functions may be regulated by intra-molecular interaction between the N-terminal domain and dsRBD5. A similar regulatory mechanism has been

described for Rnt1p, a member of the dsRBP family in yeast, in which an N-terminal domain established intra-molecular interaction with the C-terminal dsRBD (Lamontagne et al. 2000). Competition between intra-molecular Nter-dsRBD5 interaction and inter-molecular homophilic binding of dsRBD5 may control Stau1 self-association and, as a consequence, Stau1 structure/functions. Alternatively, deletion of dsRBD2 may somehow destabilize dsRBD3-mediated RNA-binding activity. This may not be crucial in the presence of functional dsRBD5 (Fig. 4C,D – Stau1-Stau1$^{\Delta 2}$, Stau1$^{\Delta 2}$-Stau1$^{\Delta 2}$) but it may explain why Stau1$^{\Delta 2}$ and Stau1$^{\Delta 5}$ only poorly interact in live cells (Fig. 4D) when dsRBD5-mediated protein-protein interactions are prevented.

Stau1 and the organization of mRNP complexes

The involvement of both Stau1 RNA-binding activity and protein-protein interaction for Stau1 self-multimerization suggests that Stau1 may act as an organizer of mRNP formation. In this model, Stau1 recognizes and binds specific mRNAs to be transported via its RNA-binding domains and organizes these mRNAs into functional mRNP complexes through protein-protein interaction involving dsRBD5 and likely dsRBD2. Interestingly, two of the known Stau1 RNA substrates are known to form homo-dimers: *bicoid* mRNAs in *Drosophila* (Ferrandon et al. 1997) and HIV-1 genomic RNA in humans (Darlix et al. 1990). Therefore, complexes may be formed through both Stau1 and RNA self-association. This novel function of Stau1 in complex formation would be complementary to other known downstream functions of Stau1 in mRNA transport, translation and decay. Moreover, Stau1 was shown to make direct protein-protein interaction with tubulin (Wickham et al. 1999), ribosomes (Luo et al. 2002; Brendel et al. 2004), the non-sense mediated factor Upf1 (Kim et al. 2005; Gong et al. 2009) and protein phosphatase I (Monshausen et al. 2002), proteins known to be present in Stau1-containing mRNPs. Therefore, not only Stau1

can organize mRNPs through self-association, it can also attract additional RNP-associated proteins through direct interaction. Interestingly, all these interactions were mapped within the Stau1 TBD domain, a region that is not involved in RNA-binding or Stau1 self-association. Therefore, Stau1 has the capability to select mRNAs, organize multimeric mRNA-protein structures and attract additional proteins to form functional mRNPs.

Several data in the literature are consistent with this model. First, Stau1 is known to co-localize with mRNAs in mRNP complexes (Kiebler et al. 1999; Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001; Mallardo et al. 2003; Kanai et al. 2004; Furic et al. 2008) and directly bind mRNAs through a specific cis-acting element (Wickham et al. 1999; Kim et al. 2007) indicating that Stau1 has the capability to select mRNAs to be transported and form functional mRNPs. Second, biochemical and proteomic studies have shown that Stau1 is a component of large complexes that contain mRNA and protein cofactors (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004). Its capacity to bind both mRNAs and specific mRNP-associated proteins via protein-protein interaction (see above) will facilitate the coordination between the fate of Stau1-bound mRNAs and proteins required to fulfil the functions. Third, relatively few Stau1 molecules were detected as monomers or dimers (Mallardo et al. 2003) indicating that Stau1 forms higher order structures. The biochemical and BRET/PCA results (Fig. 6,7,8) that show the ability of Stau1 to form oligomers in live cells support this conclusion. Fourth, in situ hybridization using Stau1-bound mRNA sequences as probes revealed that, as a consequence of Stau1 down-regulation the amount of granules containing these specific mRNAs is reduced in dendrites (Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Although these data can be interpreted as an indication that Stau1 down-regulation impairs mRNA transport, it may also indicate that Stau1 down-regulation also impairs mRNPs formation. Finally, the oligomeric nature of Stau1-containing particles in dendrites was exemplified in mouse with a loss of function

allele for Stau1 (Stau1^{tm1Apa}). Whereas a transport-defective ΔStau1-YFP was not properly transported in dendrites following transfection in hippocampal neurons derived from Stau1^{tm1Apa} mouse, it was normally transported in neurons from wild type mouse (Vessey et al. 2008). This result indicates that wild type Stau1 can rescue the transport of ΔStau1 likely through interaction that forms functional mRNPs to be transported in dendrites. A similar mechanism can be used to control the functions of mRNP complexes. Of particular interest is Stau1^{i}, a Stau1 isoform that contains an insertion of 6 amino acids in dsRBD3 that impairs its ability to bind RNA and causes the formation of RNA-binding defective particles (Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001). Its association with Stau1 in mRNPs modulates the RNA content of Stau1-containing mRNPs and their functions.

In conclusion, our results suggest that the formation of large Stau1-containing mRNP complexes may be initiated by Stau1 itself through both RNA-binding and homophilic and heterophilic protein-protein interactions. This mechanism may represent a first step for the regulation of downstream Stau1 functions such as mRNA transport and localization (Kanai et al. 2004), nuclear transit (Martel et al. 2006), translation regulation (Dugre-Brisson et al. 2005), interaction with the cytoskeleton (Wickham et al. 1999) and Stau1-mediated mRNA decay (Kim et al. 2005; Kim et al. 2007). Using sensitive and novel approaches, we were able for the first time to show that Stau1 dimers and most likely oligomers are associated with mRNAs. These techniques will contribute to our understanding of mRNA particle formation and transport and of how their misregulation may impair Stau1-mediated cellular functions.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Goat polyclonal and mouse monoclonal anti-GFP antibodies were obtained from Rockland and Roche Applied Science, respectively, mouse monoclonal anti-β-actin clone AC-74 and mouse monoclonal anti-FLAG M2 from Sigma-Aldrich. The mouse monoclonal anti-Stau1 (clone 11C6) and anti-HA (clone 12CA5) antibodies were previously described (Dugre-Brisson et al. 2005). Anti-mouse and anti-goat polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from DakoCytomation. X-gal and imidazole were purchased from Bioshop. Western blot signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences).

cDNA constructions

YFP-fused Stau1 mutants (Luo et al. 2002), Stau1-*R*luc (Chatel-Chaix et al. 2004), Stau1-HA_3, Stau1$^{\Delta 2}$-his_6 plasmids (Wickham et al. 1999), $GABA_BR1$-YFP, $GABA_BR2$-*R*luc (Perroy et al. 2003) and PKAreg-*R*luc^{F1} and PKAcat*R*luc^{F2} (Stefan et al. 2007) were previously described. Stau1$^{\Delta 2}$-*R*luc and Stau1$^{\Delta 5}$-*R*luc were constructed from Stau1-*R*luc by the all-around technique. Oligonucleotides used to generate these constructs are listed in Table I. The 4K mutant was constructed from the 2K mutant (Dugre-Brisson et al. 2005) by the all-around technique (Table I). The PCR fragment corresponding to PABP was digested with BamHI and cloned in pCMV-YFP-topaz (Packard Bioscience/PerkinElmer LifeSciences).

PCR fragments corresponding to dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4 and dsRBD5 of Stau1 (Table I) were digested with EcoRI and XhoI enzymes and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. PCR fragment corresponding to TBD domain was digested with MunI and XhoI

and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. Full length Stau1 was obtained by PCR amplification (Table I) and digested with XhoI enzyme. This fragment was cloned into pB42AD pre-digested with XhoI enzyme.

Recombinant protein production and purification

Bacterially expressed his_6-Stau1 and neutral endopeptidase his_6-NEP were purified as previously described (Wickham et al. 1999). Aliquots of the purified proteins were stored at -80°C until use. Protein concentration was determined by the BioRad dye reagent and BSA as a standard. For the pull-down assays, his_6-Stau1 and his_6-NEP (as control) were immobilized on a Ni-NTA-agarose matrix and in *vitro* translated ^{35}S-labelled Staul was loaded onto the column. After extensive washings, bound proteins were eluted with 300 mM imidazole and three elution successive fractions were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. In parallel, the *in vitro* translated ^{35}S-Stau1 extract was treated with 20 pg/ml RNase A for 1 hour prior to loading.

Yeast two-hybrid assay

The EGY48 strain was transformed with the pLexA or pB42 plasmids containing the Stau1 fragments of interest. Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media.

Cell culture, transfection and BRET assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone). Transfections were carried out with the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). BRET experiments were carried out as described (Chatel-Chaix et al. 2004; Chatel-Chaix et al. 2007). Briefly, cells were plated

into 12 well plates at 120 000 cells per well. 24 hours later, cells were transfected with constant amounts of plasmids coding for *R*luc-tagged fusion protein (10 ng) and increasing amounts of plasmids coding for YFP-tagged proteins (0 to 500 ng) as indicated. BRET assays were performed 24 hours post-transfection in live cells. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature and diluted to 10^6 cells per ml. Coelenterazine H (NanoLight Technology) was added to 90 µL of cells at a final concentration of 5 µM. A saturation curve can be drawn when the *R*luc-tagged protein becomes saturated by YFP-tagged proteins, and an optimal BRET ratio can be calculated at saturation for a specific protein-protein interaction. Luminescence (440- to 500-nm) as well as total and transmitted fluorescence (510- to 590-nm) emissions were measured using a Fusion α-FP apparatus (Perkin-Elmer). The BRET ratio was defined as [(emission at 510 to 590 nm) – (emission at 440 to 500 nm) x Cf]/(emission at 440 to 500 nm), where Cf corresponds to (emission at 510 to 590 nm)/(emission at 440 to 500 nm) when *R*luc-fused protein is expressed alone. The total YFP activity/*R*luc activity ratio reflects the relative levels of activity of the two fusion proteins in the cells. When BRET was carried out in cell extracts, cells were lysed in 200 µL of lysis buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 7.9, 0.5% NonidetP40 and 1mM DTT) and incubated at room temperature for 15 minutes with or without 30 µg/ml of RNase A (Fermentas).

For BRET between Stau1-*R*luc and RNA, 1 µL of SYTO 14 (Invitrogen), an RNA selective fluorescence dye used as energy acceptor, was added to 100 000 cells or to cell extracts and was incubated for 20 minutes at room temperature. Because the emission of SYTO14 is shifted to the red compared to that of YFP, a 550 longpass filter (Chroma) was used as acceptor filter. The BRET ratio was calculated as described before by making the ratio of the acceptor filter over the donor filter.

Microscopy

COS-7 cells were transfected with plasmids (500 ng) coding for different Stau1 mutants using PEI as previously described (Guerra-Crespo et al. 2003). Cells were fixed in a freshly made 4 % paraformaldehyde solution in PBS for 20 min at room temperature and permeabilized with 0,1 % Triton X-100 in PBS. Cover-slips were mounted on microscope slides using DAKO fluorescent medium and images were taken on a Nikon TE2000U equipped with a CoolSnap fx CCD camera, a 60X objective (Pan Apo, N.A. 1,4) and a YFP filter cube (Chroma #41028). Images were treated in ImageJ 1.43d. The YFP channel were gamma corrected (0.5), the black level was subtracted (modal value) and the brightness and contrast was set to 0,5 % saturation.

Immunoprecipitation and qRT-PCR

HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were harvested twenty four post-transfection, washed 3 times in ice-cold PBS and lysed in buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1% Triton X-100, 15 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]) supplemented or not with RNaseOUT RNase inhibitor [Invitrogen]. Lysates were cleared by centrifugation at 17 000 g for 15 minutes. The supernatant was incubated with or without 30 µg/ml of RNase A for 10 minutes at 37°C and then pre-cleared with protein G-sepharose (GE Healthcare) for 45 minutes at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with goat polyclonal anti-GFP antibodies for two hours at 4°C and then with protein G-sepharose for 90 minutes at 4°C. Immune complexes were washed three times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in 2X protein loading buffer (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 3.3% SDS, 0,2M

DTT and 0.04% bromophenol blue). Proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting using monoclonal antibodies against the indicated proteins.

For the successive immunoprecipitation experiments, lysates were prepared as described above except that DTT and RNase inhibitor were omitted. The first immunoprecipitation was carried out with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich) as described previously (Chatel-Chaix et al. 2008). The eluate was then pre-cleared with protein G-sepharose and the second immunoprecipitation was performed with polyclonal anti-GFP as described above. One third of the immune complex was analysed by SDS-PAGE and Western blotting and the two third was used for qRT-PRC analysis. To this end, RNA was isolated from the immunoprecipitates using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 µL water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse transcription reactions were done with 4 µL of RNA using the MuLV RT enzyme from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Specific antisense primers used to produce the cDNAs were 5'-AGATCAGGCCTTGTGTGTTCTGGA-3' for Arf1 and 5'-TTGAACAGCCAAGACCACTGGGTA-3' for PAICS. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche). Sense and antisense primers are described in Table I.

Acknowledgements

We thank the technical assistance of Francis Goyette, Phu Vinh On, Monique Vasseur, Louise Cournoyer and Linda Huang. CM, TD, VT and SDB were supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and KB received studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work was supported by a grant from NSERC to LDG.

References

Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *The Biochemical journal* **384**(Pt 2): 239-246.

Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. 1999. Identification of a novel homolog of the Drosophila staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* **62**(1): 113-118.

Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M., and St Johnston, D. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from Drosophila staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *The EMBO journal* **14**(14): 3563-3571.

Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. 2007. The host protein Staufen1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *Journal of virology*.

Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* **5**: 41.

Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* **24**(7): 2637-2648.

Daher, A., Longuet, M., Dorin, D., Bois, F., Segeral, E., Bannwarth, S., Battisti, P.L., Purcell, D.F., Benarous, R., Vaquero, C. et al. 2001. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *The Journal of biological chemistry* **276**(36): 33899-33905.

Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., and Barre-Sinoussi, F. 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of molecular biology* **216**(3): 689-699.

DesGroseillers, L. and Lemieux, N. 1996. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **36**(3): 527-529.

Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U. et al. 2003. The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory. *Curr Biol* **13**(4): 286-296.

Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. 2000. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Molecular and cellular biology* **20**(15): 5592-5601.

Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A., and DesGroseillers, L. 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science* **115**(Pt 16): 3285-3295.

Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research* **33**(15): 4797-4812.

Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFEN ribonucleoprotein particles. *The EMBO journal* **16**(7): 1751-1758.

Furic, L., Maher-Laporte, M., and DesGroseillers, L. 2008. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY* **14**(2): 324-335.

Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., and Maquat, L.E. 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development* **23**(1): 54-66.

Guerra-Crespo, M., Charli, J.L., Rosales-Garcia, V.H., Pedraza-Alva, G., and Perez-Martinez, L. 2003. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* **127**(2): 179-192.

Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. 2006. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**: Unit 5 23.

Hitti, E.G., Sallacz, N.B., Schoft, V.K., and Jantsch, M.F. 2004. Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain. *FEBS letters* **574**(1-3): 25-30.

Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**(4): 513-525.

Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *The EMBO journal* **14**(14): 3572-3584.

Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**(1): 288-297.

Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P.M. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**(3): 403-412.

Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**(2): 195-208.

Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal* **26**(11): 2670-2681.

Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**(4): 683-696.

Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. 2000. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Molecular and cellular biology* **20**(4): 1104-1115.

Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L., and Lacaille, J.C. 2008. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology* **28**(9): 2896-2907.

Lemaire, P.A., Lary, J., and Cole, J.L. 2005. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *Journal of molecular biology* **345**(1): 81-90.

Liu, J., Hu, J.Y., Wu, F., Schwartz, J.H., and Schacher, S. 2006. Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in Aplysia sensory neurons. *J Neurosci* **26**(19): 5204-5214.

Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 479-490.

Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal* **365**(Pt 3): 817-824.

Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M.A. 2003. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(4): 2100-2105.

Marianayagam, N.J., Sunde, M., and Matthews, J.M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in biochemical sciences* **29**(11): 618-625.

Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* **19**(3): 2212-2219.

Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A., and Desgroseillers, L. 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal* **393**(Pt 1): 245-254.

Martin, K.C. and Ephrussi, A. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**(4): 719-730.

Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *The EMBO journal* **19**(6): 1366-1377.

Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., and Kindler, S. 2001. Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *Journal of neurochemistry* **76**(1): 155-165.

Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D., and Kindler, S. 2002. The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *Journal of neurochemistry* **81**(3): 557-564.

Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R., and Qin, J. 2000. A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *The EMBO journal* **19**(20): 5567-5574.

Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. 2003. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *The EMBO journal* **22**(15): 3816-3824.

Peters, G.A., Hartmann, R., Qin, J., and Sen, G.C. 2001. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Molecular and cellular biology* **21**(6): 1908-1920.

Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. 2000. RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *The EMBO journal* **19**(5): 997-1009.

Rodriguez, A.J., Czaplinski, K., Condeelis, J.S., and Singer, R.H. 2008. Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Current opinion in cell biology* **20**(2): 144-149.

Ryter, J.M. and Schultz, S.C. 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *The EMBO journal* **17**(24): 7505-7513.

Sossin, W.S. and DesGroseillers, L. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**(12): 1581-1589.

St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**(1): 51-63.

Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C.R., Nyfeler, B., Bouvier, M., and Michnick, S.W. 2007. Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(43): 16916-16921.

Valente, L. and Nishikura, K. 2007. RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *The Journal of biological chemistry* **282**(22): 16054-16061.

Vessey, J.P., Macchi, P., Stein, J.M., Mikl, M., Hawker, K.N., Vogelsang, P., Wieczorek, K., Vendra, G., Riefler, J., Tubing, F. et al. 2008. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(42): 16374-16379.

Villace, P., Marion, R.M., and Ortin, J. 2004. The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic acids research* **32**(8): 2411-2420.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. 1999. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* **19**(3): 2220-2230.

Table I

Primers used for PCR amplification

Domain	Orientation	Restriction	Sequence
Stau1$^{\Delta 2}$-*R*luc	Sense	-	5'-GAGGTGAATGGAAGAGAATCCGAA-3'
	Antisense	-	5'-CATAAGCTTGATATCCTGCAGACG-3'
Stau1$^{\Delta 5}$-*R*luc	Sense	-	5'-ATCCCACCGGCTAGAGCCACC-3'
	Antisense	-	5'-CTCAGAGGGTCTCGTGAGAGG-3'
Stau1^{4K}-*R*luc	Sense	-	5'-GCACCAACGCGGCGGTGGCCA-3'
	Antisense	-	5'-TGGCCACCGCCGCGTTGGTGC-3'
Stau1-*R*luc$^{F1/F2}$	Sense	NotI	5'-TAGCAT**GCGGCCGC**ATGAAACTTGGAAAAAAACC-3'
	Antisense	ClaI	5'- AGAGAT**ATCGAT**GCACCTCCCACACACA -3'
PABP-YFP	Sense	BamHI	5'-ACAA**GGATCC**GCCACCATGAACCCCAGTGCCC-3'
	Antisense	BamHI	5'-TTGT**GGATCC**GCAACAGTTGGAACACCGGT-3'
dsRBD2-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATC**GAATTC**GCCGCCATGGGATACCCATTTCCAG-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATA**CTCGAG**GATATCCAGGATCCTCAA-3'
dsRBD3-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATC**GAATTC**GCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATAA**CTCGAG**GATATCAACTGCAGTGCAGG-3'
dsRBD4-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATC**GAATTC**GCCGCCATGGGAAATCCGATTAGC-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATA**CTCGAG**GATATCAAGGATCTCCAG-3'
dsRBD5-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATC**GAATTC**GCCGCCATGGGACCCTCTGAGCAA-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATA**CTCGAG**GATATCGCACCTCCCACACAC-3'
TBD-pLexA	Sense	MunI	5'-TAGATATC**CAATTG**GCCGCCATGGGAAAACCCGCACT-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATA**CTCGAG**GATATCGGCAGTTACCGTGGC-3'
Stau1-pB42AD	Sense	XhoI	5'-GATG**CTCGAG**ATGAAACTTGGAAAAAAACC-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATA**CTCGAG**GATATCGCACCTCCCACACAC-3'
Arf1	Sense	-	5'-TCAACGTGGAAACCGTGGAGTACA-3'
	Antisense	-	5'-AGATCAGGCCTTGTGTGTTCTGGA-3'
PAICS	Sense	-	5'-TTTGGGACCAGTGATGTCTGGGAA-3'
	Antisense	-	5'-TTGAACAGCCAAGACCACTGGGTA-3'

Figure legends

Figure 1. Differentially tagged-Stau1s are found in common complexes. (A) HEK293T cells were mock transfected or co-transfected with Stau1-HA_3 expressor and either YFP, PABP-YFP or Stau1-YFP expressors in the absence or presence of RNase A as indicated. An aliquot of the proteins in the cell extracts was separated by SDS-PAGE (left panels - input) and the remaining extracts were immunoprecipitated using anti-GFP antibody (right panels – IP GFP). Proteins were analysed by western blotting using anti-Stau1, anti-GFP and anti-HA antibodies, as indicated. Anti-β-actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. As control for RNase A digestion, total RNAs were isolated and separated on agarose gel. Ribosomal RNAs (rRNA) were detected by ethidium bromide staining. **(B)** Bacterially expressed his_6-Stau1 or his_6-NEP (as control) fusion proteins were fixed on a Ni-NTA column and extensively washed. In vitro synthesized ^{35}S-Stau1 was loaded onto the columns. Columns were washed and then his_6-Stau1 and his_6-NEP were eluted and collected in three successively fractions (lanes 1,2,3). The co-eluted ^{35}S-Stau1 protein was separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In parallel, his_6-Stau1 and ^{35}S-Stau1 preparations were treated with RNase A before loading onto the columns. An aliquot of ^{35}S-Stau1 was also loaded on the gel (lane: load) to control for its synthesis and size.

Figure 2. Stau1 self-associates in live cells as measured by BRET. (A) Schematic representation of the BRET assay. Black and grey boxes represent the double-stranded RNA-binding domains with major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) dsRNA-binding activity, respectively; white boxes represent domains with no demonstrated RNA-binding activity (dsRBD2 and dsRBD5) and the hatched boxes represent the tubulin binding domain (TBD). The

sun and cylinder represent *R*luc and YFP, respectively. **(B-C)** Plasmids coding for Stau1-*R*luc were co-transfected in HEK293T cells with various amounts of Stau1-YFP, PABP or YFP expressors. Expression of Stau1-*R*luc and Stau1-YFP proteins is shown in **(B)** using western blotting with anti-Stau1 antibody. β-actin antibody was used as a loading control. **(C)** BRET saturation curves were generated to provide evidence of specific interactions between the proteins in live cells. BRET ratios were defined as described in Materials and Methods and plotted as a function of the excited YFP activity to total *Renilla* luciferase activity ratio. **(Left)** Comparison of BRET saturation curves when Stau1-*R*luc was co-expressed with Stau1-YFP, PABP-YFP or YFP. Error bars correspond to standard deviation. **(Right)** $GABA_B$ receptor 2-*R*luc and $GABA_B$ receptor 1-YFP, two proteins known to form strong functional dimer, were used as a BRET positive control. **(D)** HEK293T cells were co-transfected with Stau1-*R*luc and either Stau1-YFP or PABP-YFP expressors as described in B. Cell were lysed and cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes. BRET ratios at saturation in the presence (+) or absence (-) of RNase are shown. n = 3. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 3. Stau1 RNA-binding activity is involved in complex formation. (A) Schematic representation of Stau1 mutants. Symbols are described in the legend of figure 2. Stau1^{KK}, mutations K153A and K154A in dsRBD3. Stau1^{4K} mutant, mutations K153A and K154A in dsRBD3 and K256A and K257A in dsRBD4. **(B)** Plasmids coding for Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti-GFP antibody. Anti-β-actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane correspond to those in (A). **(C)** HEK293T cells were co-transfected with Stau1-*R*luc and either Stau1-YFP, Stau1$^{\Delta 3}$-YFP, Stau1^{4K}-YFP or Stau1^{KK}-YFP expressors. BRET ratios

of wild type Stau1 and RNA-binding defective Stau1 mutants were calculated as in figure 2 and relative BRET ratios were generated with the Stau1-*R*luc/Stau1-YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. n = 3. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 4. Characterization of Stau1 protein-protein interaction in live cells. (A) Schematic representation of Stau1 and mutants. Symbols are described in the legend of figure 2. **(B)** Plasmids coding for Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti-GFP antibody. Anti-β-actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane correspond to those in (A). **(C-E)** Cells were co-transfected with different combinations of Stau1 and Stau1 deletion mutants fused to either *R*luc or YFP as indicated. BRET ratios were calculated as in figure 2 and relative BRET ratios were generated with the Stau1-*R*luc/Stau1-YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. n = 3. Error bars correspond to standard deviation. **(F)** Yeast cells were co-transformed with a plasmid coding for Stau1-B42 and different expressors of Stau1 domains fused to LexA, as indicated. Cells were screened for growth on selective medium and β-galactosidase expression. Stau1-B42 interacts (+) with Stau1 dsRBD2 and dsRBD5 but not (-) with dsRBD3, dsRBD4 or TBD fused to LexA in a two-hybrid assay.

Figure 5. Sub-cellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants. COS-7 cells were transfected with plasmids coding for Stau1-YFP or Stau1-YFP mutants as indicated. YFP expression was observed 24 h later by fluorescence microscopy. Both differential interference contrast microscopy (DIC) and the YFP constructs are shown.

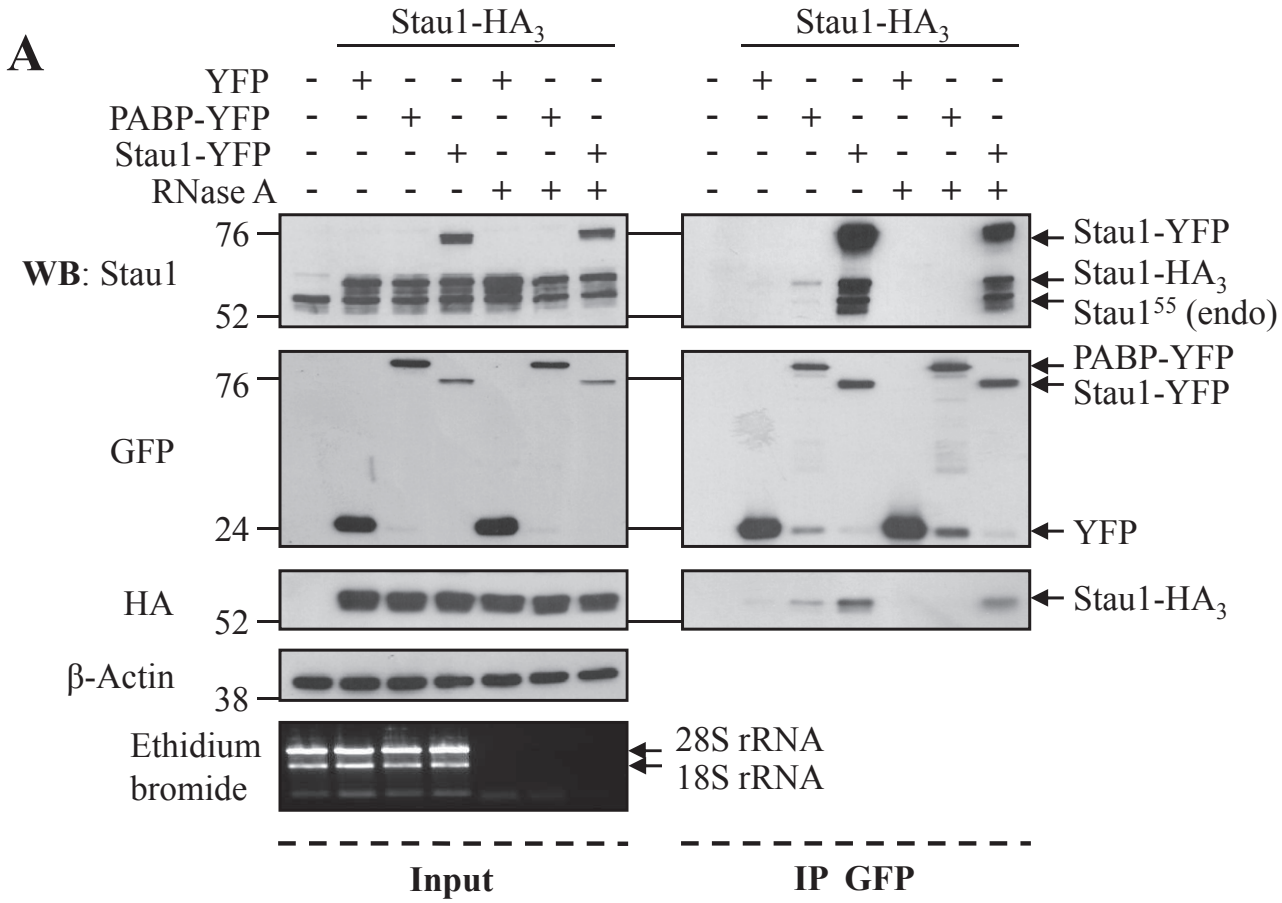
Figure 6. Stau1 forms oligomers in live cells. (A) Schematic representation of the BRET-PCA assay. Stau1 was fused to either the N-terminal (*R*luc^{F1}) or the C-terminal (*R*luc^{F2}) of *R*luc. Formation of Stau1 dimers will bring together the two *R*luc halves through protein complementation (PCA) and reconstitute a functional luciferase. This enzyme will transfer energy and generate BRET signal if Stau1-YFP is also present in close proximity suggesting formation of oligomers. **(B)** HEK293T cells were co-transfected with constant amounts of plasmids coding for Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} and increasing amounts of plasmids coding for either Stau1-YFP, PABP-YFP or YFP. The saturation curves provide evidence of specific interactions between at least three Stau1 proteins in live cells. BRET ratios were calculated as in figure 2. Error bars correspond to standard deviation. **(C)** Plasmids were transfected as in B. Cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+ RNase) or the buffer alone (- RNase) before BRET calculation.

Figure 7. Stau1 oligomers contain RNA in live cells. (A) Schematic representation of the PCA-BRET assay for protein-RNA interaction. As described in figure 7, Stau1-*R*luc^{F1} and Stau1-*R*luc^{F2} were transfected in HEK293T cells to reconstitute a functional luciferase as a consequence of Stau1-Stau1 interaction. Then cells were treated with SYTO 14, a fluorescent dye that stains RNA. Energy transfer can occur from the reconstituted *R*luc to SYTO 14 if in close proximity and generate BRET signal. **(B)** BRET ratios at saturation are indicated for each association between monomeric (*R*luc, Stau1-*R*luc) or split (Stau1-*R*luc^{F1} + Stau1-*R*luc^{F2}, PKA reg-*R*luc^{F1} + PKA cat-*R*luc^{F2}) *R*luc and SYTO 14. Error bars are standard deviation. **P < 0.01 (ANOVA and post test Dunnett. **(C)** Transfected HEK293T cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+ RNase) or the buffer alone (Ctl) before adding SYTO 14 for the BRET assay. ***P <

0.001 (T test). Note that the BRET values are higher in cell extracts than those in live cells probably due to the better availability of SYTO 14 in cell extracts.

Figure 8. Stau1 form RNA-containing high-order complexes. (A) HEK293T cells were mock transfected or co-transfected with Stau1-HA_3 expressor and either YFP, Stau1-YFP or Stau1-FLAG expressors as indicated. Proteins in the cell extracts were separated by SDS-PAGE (left panels - input) or successively immunoprecipitated using first, anti-FLAG antibody (middle panels – 1st IP:FLAG) and second, anti-GFP antibody (right panels – 2nd IP:GFP). Proteins were analysed by western blotting using anti-Stau1, anti-FLAG, anti-YFP and anti-HA antibodies, as indicated. Anti-β-actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. **(B)** Immunoprecipitates obtained after the second round of immunoprecipitation were treated with Trizol reagent to isolate putative Stau1-bound RNAs. RNAs were qRT-PCR amplified using oligonucleotide primers for ARF1 and PAICS mRNAs, two known Stau1-bound mRNAs (Kim et al. 2005). This figure is representative of 3 independent experiments.

Figure 1


A
Stau1-HA3
Stau1-HA3
YFP
PABP-YFP
Stau1-YFP
RNase A
WB: Stau1
76
52
Stau1-YFP
Stau1-HA3
Stau1^55 (endo)
GFP
76
24
PABP-YFP
Stau1-YFP
YFP
HA
52
Stau1-HA3
β-Actin
38
Ethidium bromide
28S rRNA
18S rRNA
Input
IP GFP

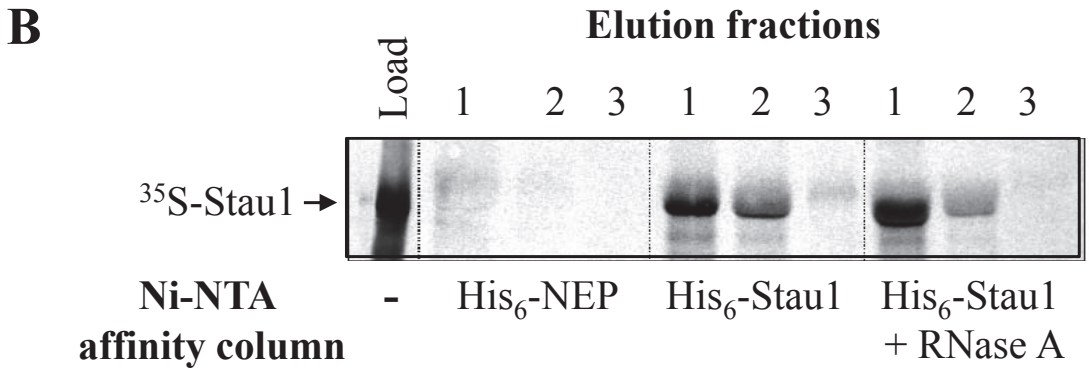

B
Elution fractions
Load
1 2 3 1 2 3 1 2 3
35S-Stau1
Ni-NTA affinity column
-
His6-NEP
His6-Stau1
His6-Stau1 + RNase A

Figure 2

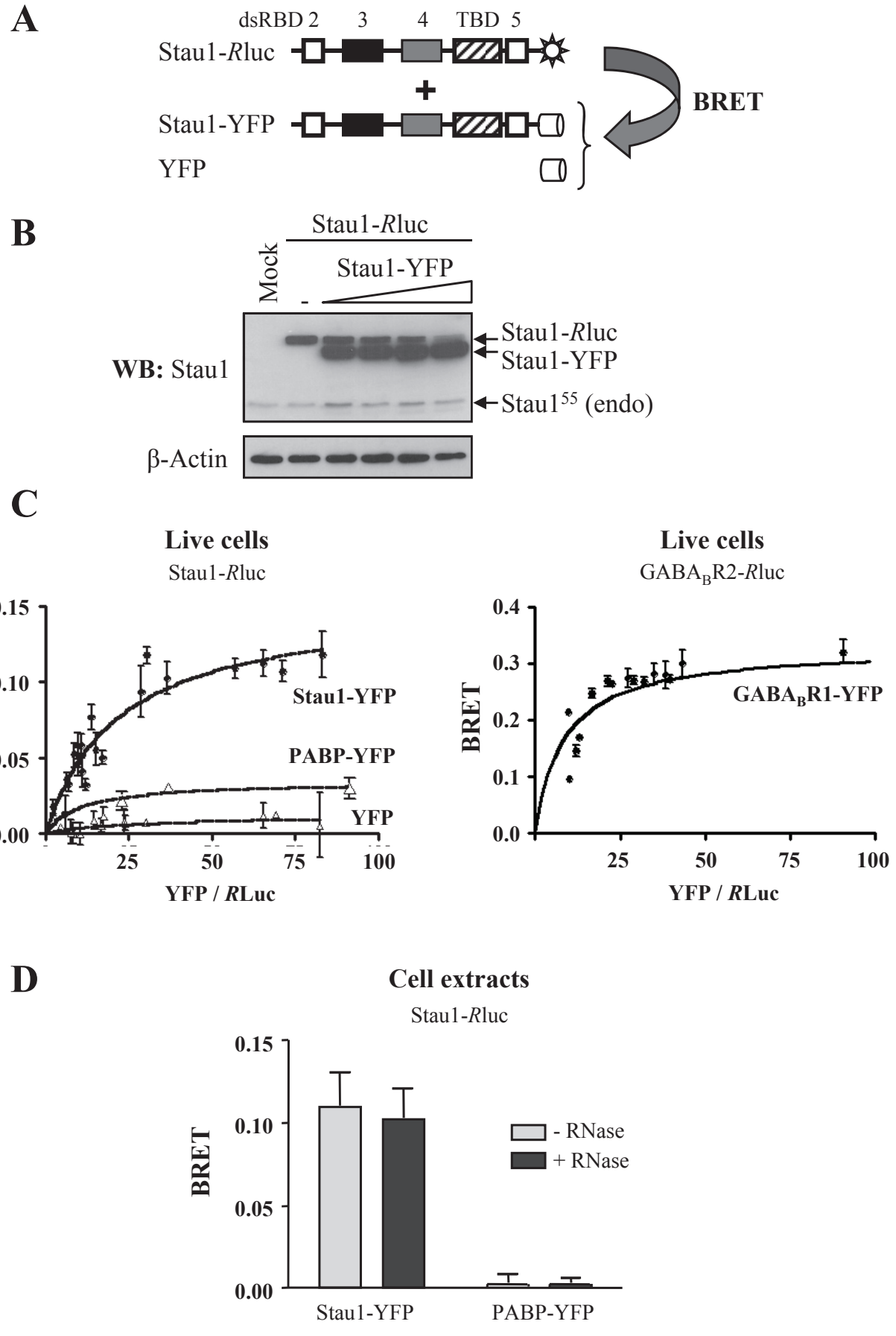

A
dsRBD 2 3 4 TBD 5
Stau1-Rluc
Stau1-YFP
YFP
BRET
B
Stau1-Rluc
Mock
Stau1-YFP
WB: Stau1
Stau1-Rluc
Stau1-YFP
Stau1^55 (endo)
β-Actin
C
Live cells
Stau1-Rluc
BRET
0.15
0.10
0.05
0.00
Stau1-YFP
PABP-YFP
YFP
25
50
75
100
YFP / RLuc
Live cells
GABA_BR2-Rluc
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
GABA_BR1-YFP
D
Cell extracts
Stau1-Rluc
- RNase
+ RNase
Stau1-YFP
PABP-YFP

Figure 3

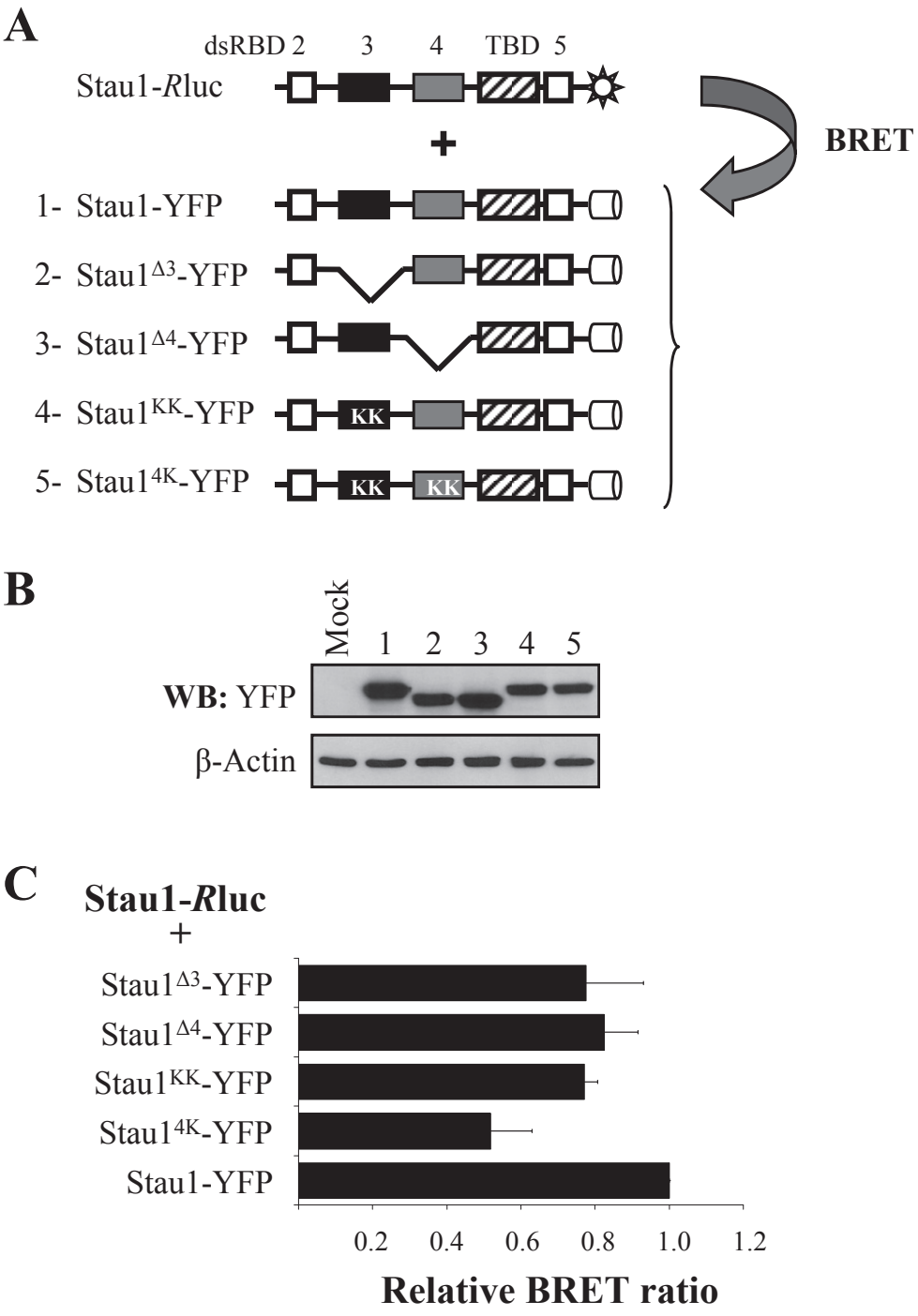

A
dsRBD 2 3 4 TBD 5
Stau1-Rluc
+
BRET
1- Stau1-YFP
2- Stau1Δ3-YFP
3- Stau1Δ4-YFP
4- Stau1KK-YFP
5- Stau14K-YFP
KK
KK
KK
B
Mock 1 2 3 4 5
WB: YFP
β-Actin
C
Stau1-Rluc
+
Stau1Δ3-YFP
Stau1Δ4-YFP
Stau1KK-YFP
Stau14K-YFP
Stau1-YFP
0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2
Relative BRET ratio

Figure 4

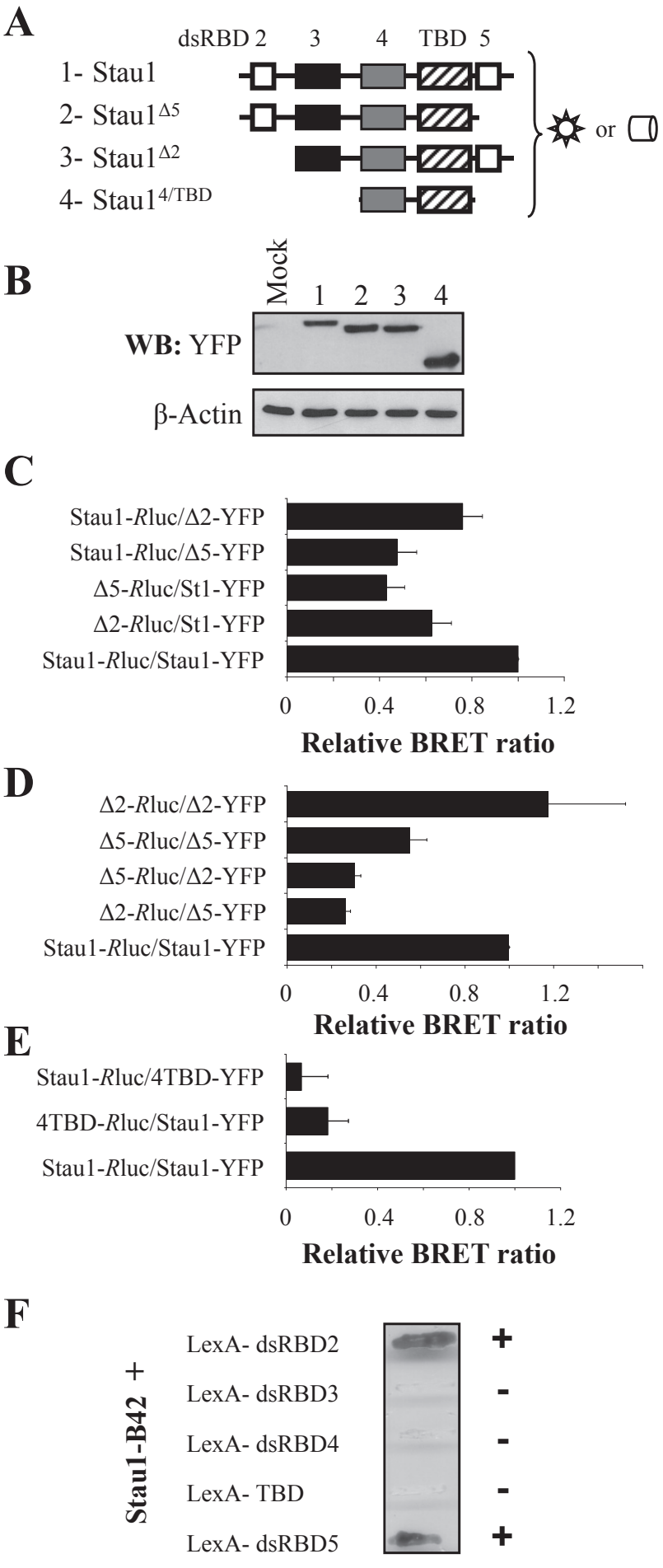

A
dsRBD 2
3
4
TBD 5
1- Stau1
2- Stau1Δ5
3- Stau1Δ2
4- Stau14/TBD
or
B
Mock
1
2
3
4
WB: YFP
β-Actin
C
Stau1-Rluc/Δ2-YFP
Stau1-Rluc/Δ5-YFP
Δ5-Rluc/St1-YFP
Δ2-Rluc/St1-YFP
Stau1-Rluc/Stau1-YFP
0
0.4
0.8
1.2
Relative BRET ratio
D
Δ2-Rluc/Δ2-YFP
Δ5-Rluc/Δ5-YFP
Δ5-Rluc/Δ2-YFP
Δ2-Rluc/Δ5-YFP
Stau1-Rluc/Stau1-YFP
0
0.4
0.8
1.2
Relative BRET ratio
E
Stau1-Rluc/4TBD-YFP
4TBD-Rluc/Stau1-YFP
Stau1-Rluc/Stau1-YFP
0
0.4
0.8
1.2
Relative BRET ratio
F
Stau1-B42 +
LexA- dsRBD2
LexA- dsRBD3
LexA- dsRBD4
LexA- TBD
LexA- dsRBD5
+
-
-
-
+

Figure 5

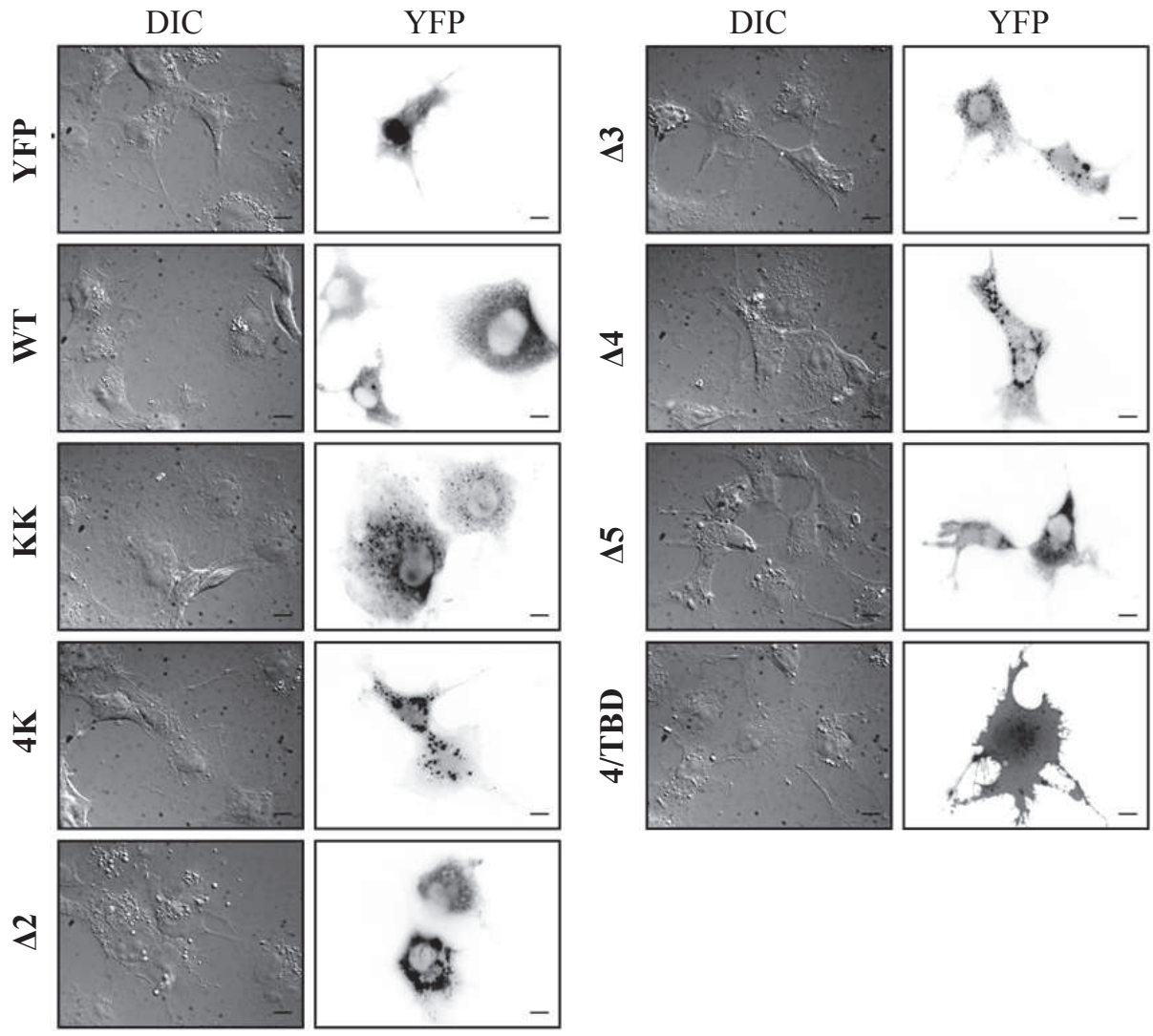


Figure 6

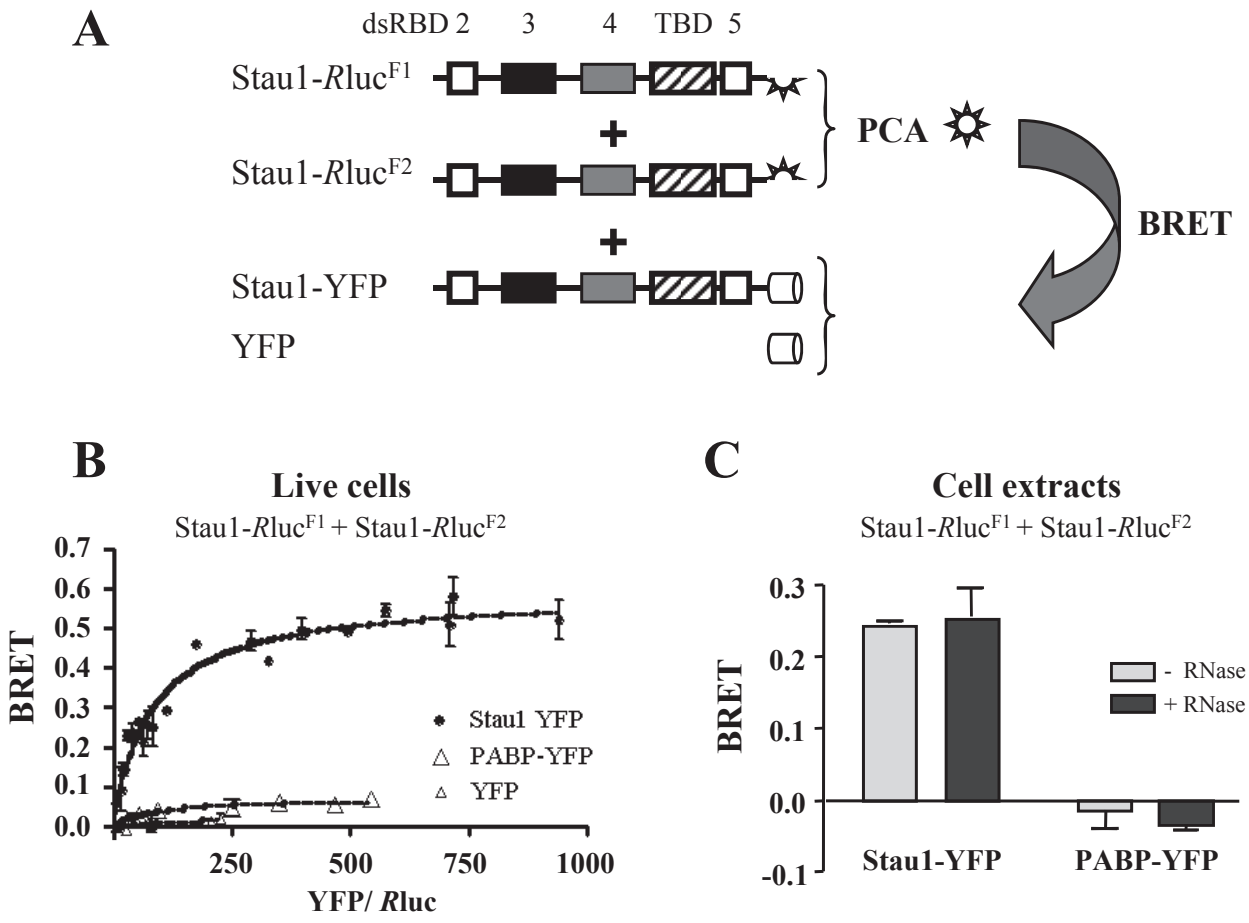

A
dsRBD 2
3
4
TBD 5
Stau1-RlucF1
Stau1-RlucF2
Stau1-YFP
YFP
PCA
BRET
B
Live cells
Stau1-RlucF1 + Stau1-RlucF2
BRET
YFP/ Rluc
Stau1 YFP
PABP-YFP
YFP
C
Cell extracts
Stau1-RlucF1 + Stau1-RlucF2
BRET
- RNase
+ RNase
Stau1-YFP
PABP-YFP

Figure 7

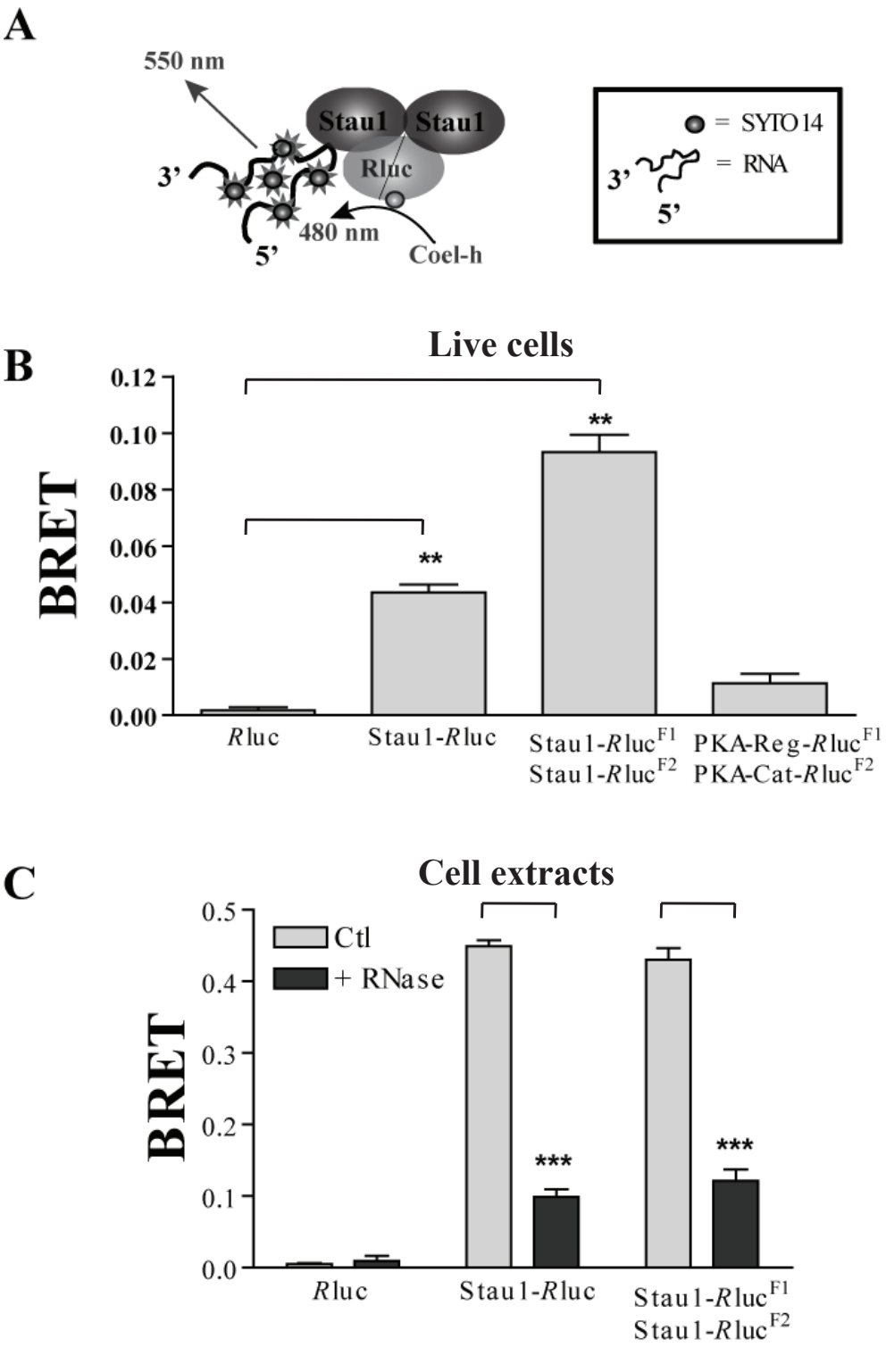
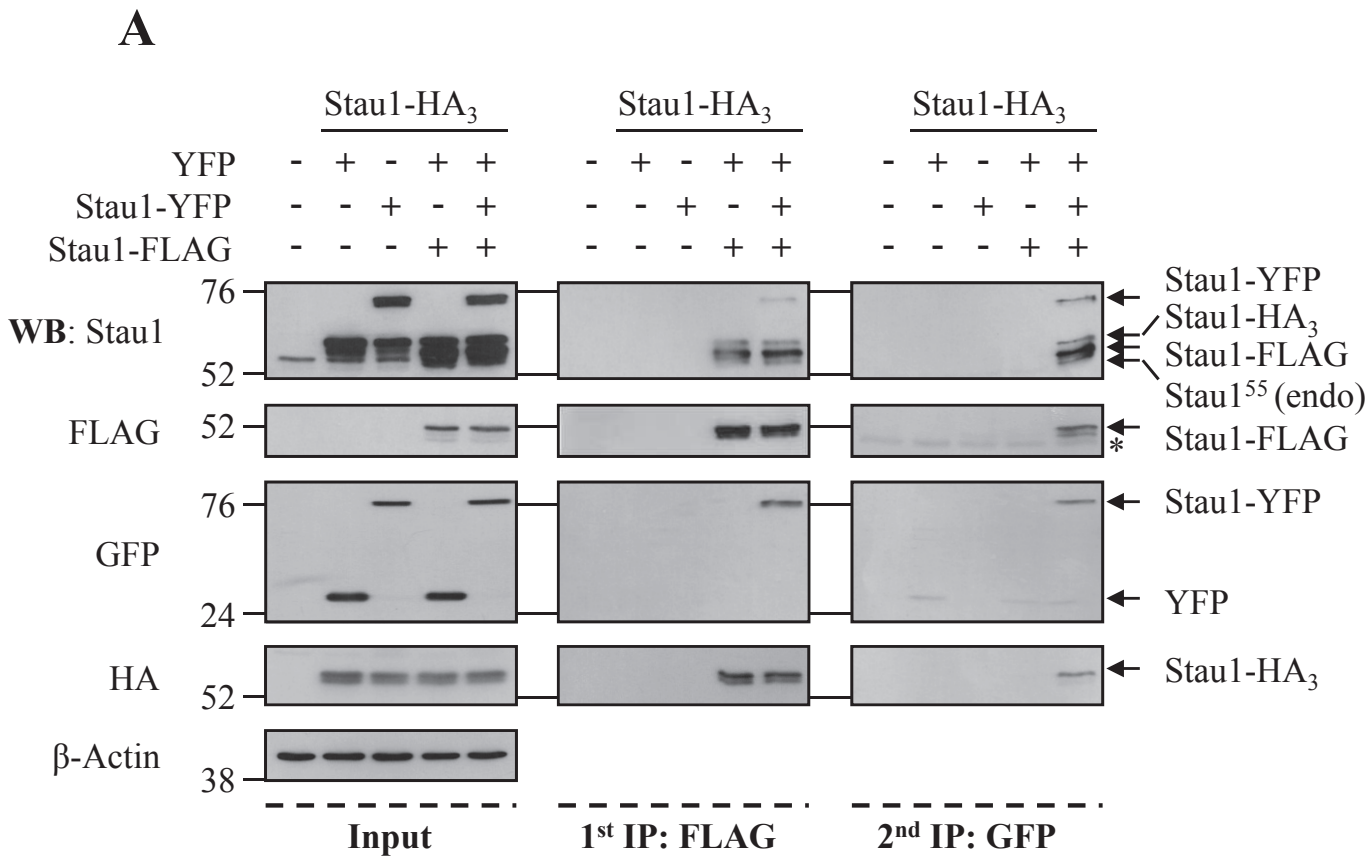
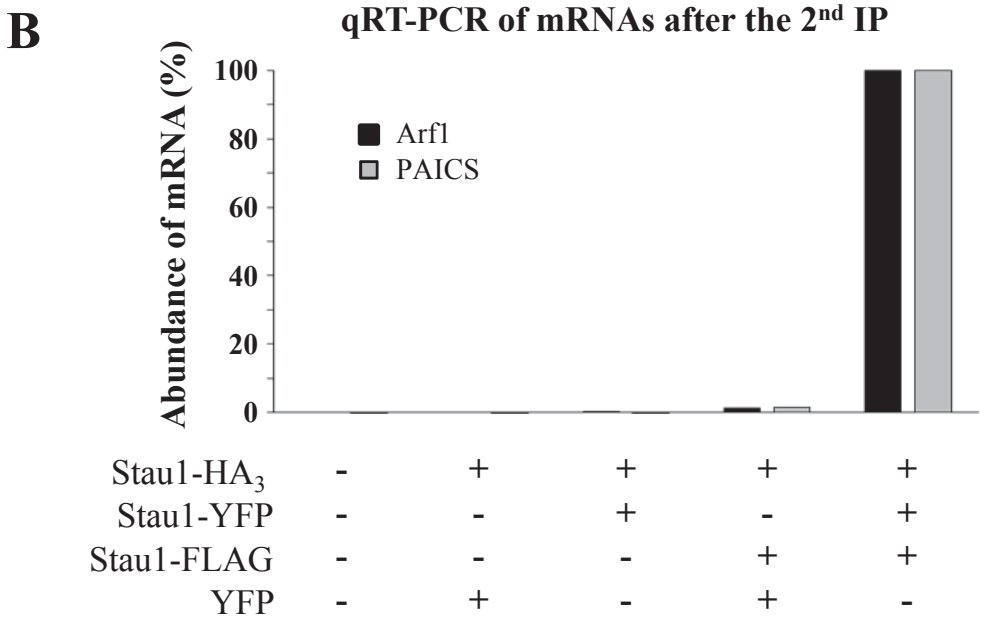

A
550 nm
Stau1
Stau1
Rluc
3'
480 nm
5'
Coel-h
= SYTO14
= RNA
3'
5'
B
Live cells
BRET
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
**
Rluc
Stau1-Rluc
Stau1-Rluc^F1
Stau1-Rluc^F2
PKA-Reg-Rluc^F1
PKA-Cat-Rluc^F2
C
Cell extracts
BRET
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Ctl
+ RNase
***
***
Rluc
Stau1-Rluc
Stau1-Rluc^F1
Stau1-Rluc^F2

Figure 8


A
Stau1-HA3
Stau1-HA3
Stau1-HA3
YFP
Stau1-YFP
Stau1-FLAG
WB: Stau1
FLAG
GFP
HA
β-Actin
76
52
52
76
24
52
38
Stau1-YFP
Stau1-HA3
Stau1-FLAG
Stau155 (endo)
Stau1-FLAG
Stau1-YFP
YFP
Stau1-HA3
Input
1st IP: FLAG
2nd IP: GFP


B
qRT-PCR of mRNAs after the 2nd IP
Abundance of mRNA (%)
100
80
60
40
20
0
Arf1
PAICS
Stau1-HA3
Stau1-YFP
Stau1-FLAG
YFP