



HAL
open science

Etude des partenaires protéiques associés aux homodimères et aux hétérodimères des récepteurs couplés aux protéines G

Abla Benleulmi-Chaachoua

► **To cite this version:**

Abla Benleulmi-Chaachoua. Etude des partenaires protéiques associés aux homodimères et aux hétérodimères des récepteurs couplés aux protéines G. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T018 . tel-01823848

HAL Id: tel-01823848

<https://theses.hal.science/tel-01823848>

Submitted on 26 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Abstract :

Melatonin is a neurohormone secreted by the pineal gland in a circadian manner. This hormone is involved in the regulation of circadian rhythms, sleep, retinal physiology, seasonal reproduction and various neuronal functions. Melatonin exerts its effects through two G protein-coupled receptors (GPCR) called MT₁ and MT₂. GPCRs are known to form homo- and heterodimers, but the physiological relevance of these complexes remains a matter of debate. An increasing number of reports show that the function of these GPCR complexes is not restricted to the regulation of heterotrimeric G proteins but include also the regulation of other proteins like transporters and ion channels. Here, we report the formation of MT₁/MT₂ heterodimers in mouse retinal rod photoreceptors and show that the enhancing effect of melatonin on light sensitivity in these cells requires the activation of the heteromer-specific Gq/PLC/PKC signaling pathway. This study demonstrates the physiological relevance of GPCR heterodimerization.

We next searched for new MT₁ and MT₂ interacting proteins in an unbiased manner by performing several proteomic and genetic screens. An interactome of 378 proteins was built. Bioinformatic analysis revealed the presence of several presynaptic proteins (voltage-gated calcium channel Ca_v2.2, SNAP25, Synapsin and Munc-18) in the MT₁ interactome. Presynaptic localization of MT₁ and spatial proximity with presynaptic proteins was confirmed in mouse and rat brains. Among these potential partners, we show that MT₁ physically interacts with Ca_v2.2 in CHO cell line and inhibits Ca_v2.2-promoted Ca²⁺ entry in an agonist-independent manner suggesting a regulatory role of MT₁ in neurotransmitter release.

Another proteins identified in the screens was the dopamine transporter DAT. Physical interaction of DAT with melatonin receptors decreased DAT cell surface expression and diminished dopamine uptake in HEK293 cell. Supporting this result we found using the in vivo model of melatonin receptors knockout mice a respective increase of dopamine uptake in synaptosomal preparations of the striatum of supporting the physiological relevance of these GPCR/transporter complexes.

In conclusion, this report shows that GPCR interactome building provides new insights into receptor function, like retinal and neuronal functions of melatonin receptors in our case. Formation of GPCR/GPCR, GPCR/ion channel and GPCR/transporter complexes may have a reciprocal functional impact, on the activity of the receptor and interacting partners thus elucidating new molecular mechanisms cellular cross-talk.

Résumé :

La mélatonine est une neuro-hormone sécrétée par la glande pinéale pour réguler les rythmes circadiens, le sommeil, la physiologie de la rétine, la reproduction saisonnière et diverses fonctions neuronales. La mélatonine exerce ses fonctions en se liant à deux récepteurs membranaires appelés MT_1 et MT_2 qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG sont connus pour former des homo- et hétérodimères mais la pertinence physiologique de ces complexes reste à démontrer. Plusieurs études montrent que la fonction de ces complexes ne se limite pas à la régulation des protéines G hétérotrimériques, mais inclue également la régulation d'autres protéines comme les transporteurs et les canaux ioniques. Dans ce travail, nous rapportons la formation d'hétérodimères MT_1/MT_2 dans les photorécepteurs de la rétine de souris et nous montrons que l'augmentation de la sensibilité de ces cellules à la lumière par la mélatonine requiert l'activation de la voie Gq/PLC/PKC qui est spécifique de l'hétéromère. Cette étude confirme alors la pertinence physiologique de l'hétérodimérisation des récepteurs de la mélatonine.

Nous avons ensuite cherché à identifier de nouveaux partenaires de MT_1 et MT_2 en effectuant plusieurs cribles protéomiques et génétiques et un interactome de 378 protéines a pu être construit. L'analyse bioinformatique a révélé la présence de plusieurs protéines présynaptiques (canaux calciques voltage-dépendants $Ca_v2.2$, SNAP25, Synapsin et Munc-18) dans l'interactome MT_1 . Parmi ces partenaires, nous avons montré dans les cellules CHO que le récepteur MT_1 interagit avec la protéine $Ca_v2.2$ et inhibe l'entrée du calcium d'une manière indépendante de la stimulation par l'agoniste, ce qui suggère un rôle régulateur de MT_1 dans la libération des neurotransmetteurs.

Un autre partenaire caractérisé est le transporteur de la dopamine DAT. L'interaction physique de DAT avec les récepteurs de la mélatonine diminue l'expression de DAT à la surface cellulaire et diminue l'absorption de la dopamine dans les cellules HEK293. La pertinence physiologique de ces observations a été appuyée par l'augmentation de la recapture de la dopamine dans les synaptosomes du striatum de souris knock-out pour les récepteurs de la mélatonine.

En conclusion, ce rapport montre que la construction des interactomes des RCPG offre de nouvelles perspectives pour la découverte de nouvelles fonctions de ces récepteurs, comme les fonctions rétinienne et neuronales des récepteurs de la mélatonine dans notre étude. La formation de complexes RCPG/RCPG, RCPG/canaux ioniques et RCPG/transporteurs peut avoir un effet fonctionnel réciproque au niveau de l'activité du récepteur et de ces partenaires, mettant ainsi en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires de cross-talk cellulaire.

A toi ma maman...

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie le président Pr Hervé DANIEL et mes deux rapporteurs : le Dr Philippe MARIN et le Dr Eleni TZAVARA, je vous adresse mes sincères témoignages de gratitude pour avoir accepté d'analyser et corriger mon mémoire. Je remercie chaleureusement le Dr Philippe DELAGRANGE et le Dr Hervé ENSLEN qui m'ont accompagné tout au long de ma thèse et qui ont accepté d'évaluer mon travail à mi-chemin de mon parcours et également maintenant.

Mon respect et mes sincères gratitudes vont à Dr Ralf JOCKERS. Je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir si bien conseillée et encadrée. Je vous remercie chaleureusement pour la confiance que vous m'avez accordée et pour m'avoir laissé développer mes propres idées depuis le début. Ce travail n'aurait pas été sans votre sourire généreux et votre compréhension.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein de l'Institut Cochin ainsi que petites stagiaires et mes collaborateurs à St Anne. A force de changer de bureau et d'étage chaque année, j'ai bien fini par tous vous connaître tous et vous apprécier :

Abdel/Agnès/Alain/Alice/Anais/Angeliki/Anissa/Anne/Anne-Lise/Anne-Sophie/Antoine/Audrey/Azedine/Ayako/Boris/Cecile/Cedric/Chantal/Christian/Christophe/Clara(s)/Claudine/Eva/Evelyne/Fabienne/Fateh/Florence/François/Gabriel/Haniaa/Hervé/JeanLuc/JeanMichel/Johanna/John/Julie(s)&Julls/Kaya/Laëtitia/Lorence/Marjorie/Marie/Marine(s)/Mark/Maryline/Matiew/Maud/Michèle/Monique/Morgane/Nadia/Nathalie/Nawal/Olivier/Ouassila/Pascal/Patricia/Patty/Raise/Romain(s)/Sabrina/Samuel/Sandrine/Shazihna/Stéfanie/Stéphane/Stephano/Tarik/Tim/TuVan/Véronique/Virginie(s)/Zhicheng// et une pensée particulière pour toi Khemwanteen ...Je vous remercie pour les moments que l'on a passé ensemble à manipuler, à faire des réunions, à manger, à rigoler, à rire, à s'intoxiquer avec de la PFA, à sacrifier des souris, à attendre les centri, à se geler les doigts « à l'azote », à faire les commandes, à corriger ce rapport, à ranger les commandes, à rire aux larmes, à pleurer, à danser, à boire du café, à faire des pauses, à se faire des confidences, à dire des bêtises, à faire le ménage, à faire les soldes, à organiser les anniversaires, à jouer aux cartes, à cuisiner, à cheval, à la plage, en Italie, à Barcelone, à Ikéa, chez moi, chez vous, au restaurant...merci pour tout !

Arrive le temps pour moi de remercier ma famille, on devrait d'ailleurs commencer par remercier sa famille! Je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. Dans les bons moments comme dans les moins bons, vous avez tous su m'encourager et me soutenir, chacun à son niveau. Papa, Maman, Louisa, Malik, Rafik, Samir & mon fils Adam (MERCIE), merci d'avoir veillé si tard pour essayer de corriger ce rapport. Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue, vous mes oncles Ahmed, Mokhtar, AbdelKader, Said, Mezhoud, Miloud et l'ensemble de mes professeurs d'école, de collègue et de lycée.

Liste des abréviations :

- 4-P-PDOT: 4-phenyl-2-propionamidotétralin
- 5HT-R: Récepteur sérotonine
- A2AR: Récepteurs adénosine
- aa KDL: Ligand du récepteur
- aa: Acide aminé
- AANAT: Arylalkylamine N-acetyltransferase
- ACTH: adeno cortico tropic hormone
- ADN: Acide désoxyribonucleique
- AFMK: N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine
- AGS : receptor-independent activators of G-protein signaling
- AMK: N1-acetyl-5-methoxykynuramine
- AMP_c: Adénosine monophosphate cyclique
- AP-1: Activating protein-1
- AR: adrenergic receptor
- ARF: ADP-ribosylation factor
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- AT: Angiotensine
- ATR : récepteur de l'angiotensine
- BIM: N-Bromoacetyl-1-2-iodo-5-methoxytryptamine
- BL1: Récepteur des leukotriènes
- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- CaMK: Calmoduline Kinase
- CaR: Récepteur senseur de calcium
- CBR: Récepteurs canabinoïdes
- CGL: Corps genouillé latéral
- CHO: Chinese hamster ovary cells
- CIPP: channel-interacting PDZ domain protein
- CREB: cAMP response element-binding protein
- Cter: C terminal
- CTR: Récepteur de la calcitonine
- CXCR4, 5: Récepteur aux chimiokine 4, 5
- D2: Récepteur de la dopamine
- DAG: diacylglycérol
- DAT: Transporteur de la dopamine
- DOR: Δ-opioid receptor
- DUB: dé-ubiquitinases
- e1, e2, e3 : Boucles externes
- ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation
- ERK : Extracellular signal-regulated kinases
- ETA: Récepteur de l' endothéline
- FLA: Fluorescence lifetime Analysis
- FPR: N-formyl peptide
- FRET : Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer
- FSH: Folliculo Stimulating Hormone
- G.O : gene ontology
- GABA:Acide γ-amniobutyrique
- GAIP : G Alpha Interacting Protein
- GAP : GTPase-activating protein
- GASP : G-protein coupled receptor associated sorting protein
- GAST: G-protein coupled receptor associated sorting protein
- GDP: Guanosine diphosphate
- GEF: Guanine Exchange Factor
- GFAP: Glial fibrillary acidic protein
- GIP: G-protein coupled receptors interacting partners
- GIPC : GAIP interacting protein
- GMF-β : Glia maturation factor- β
- GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone
- GPCRDB : GPCR data base
- GRK: GPCR Kinase
- GRP78: Glucose-regulated protein 78
- GTP: Guanosine triphosphate
- H8: Hélice 8
- HDL: High-density lipoprotein
- HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cells
- Hsp: heat shock protein
- HVA; High Voltage Activated
- i1,i2,i3: Boucles intracellulaires
- IP3: Inositol-1,4,5-triphosphate
- KOR : κ-opioid receptor
- LH: Luteinizing Hormone
- LHR: Récepteurs de l'hormone luteinique
- LPAR2: Lysophosphatidic acid receptor 2
- LTP: long terme potentiation
- MALDI-TOP: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight
- MAP : Microtubule-associated protein
- MAPK: Mitogen-activated protein kinase
- MD: Modélisation moléculaire dynamique
- mGluR: Récepteur métabotrope du glutamate
- MOR : Récepteur μ-opiodes
- MT (MTR) : melatonin receptors
- NHERF : Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor
- NK1: Neurokinine
- NMDA: N-méthyl-D-aspartate
- NMR: Résonance magnétique nucléaire
- NOS: Endothelial nitric oxide synthase
- NSC: noyaux suprachiasmatiques
- NSF: N-éthylmaleimide sensitive factor
- NSF: N-éthylmaleimide-sensitive-factor
- Nter:Nterminal
- NTSR1: Récepteur de la neurotensine
- PACAP: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
- PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1
- PAR1,PAR2: Proteases-activated receptor 1
- PDI: Protein disulfure isomerase
- PH: Pléckstrine Homology domain
- PIP2: phosphatidyl-inositol-diphosphate
- PKA, PKC: Proteine Kinase A/C
- PLA: Proximity ligation assay
- PLC: phospholipase C
- PLD: Phospholipase D
- PT: pars tuberalis
- PTH: Hormone parathyroïde
- PTH1R:parathyroid hormone 1 receptor
- PTHR: Récepteur hormonal
- PTHrP: Parathyroid hormone-related protein
- QR2: Enzyme quinone reductase
- RAMP : receptor activity-modifying proteins
- RCPG: Récepteurs couplés aux protéines G
- RE: Réticulum endoplasmique
- REM: Rapid eye mouvement
- RER: Réticulum endoplasmique rugueux
- RGS: Regulator of G-protein signalling
- SAP102: Synapse-associated protein 102
- SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- SIPI: Récepteur sphingosine-&-phosphate
- SM : spectrométrie de masse
- SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
- SNP: Single nucleotide polymorphism
- SNX: Sorting Nexin
- SSTR : Récepteurs de la somatostatine
- STOP: stable tubule-only polypeptide
- TAAR10 : trace amine-associated receptor 1
- TAP: Tandem Affinity Purification
- TEV: Tobacco etch virus
- TGfb : transforming growth factor b
- THR: Tyrotropin-releasing hormone receptor
- TIRF-M: Total internal reflection fluorescence microscopy
- TRH: Tractus rétinéo-hypotalamique
- tSNARE: Target SNARE
- VFTM: Venus flytrap mechanism
- VGCC: pour Voltage-Gated Calcium Channels
- VIP: vasoactive intestinal polypeptide
- VMAT2 : vesicular MonoAmine transporter
- VS: vésicules synaptique
- vSNARE: vesicular SNARE
- V_xR: Récepteur de la vasopressine
- Wt ; Wild type

Liste des figures :

Figure 1 : Cristallisation des rhodopsine, β 2-AR, CXCR4 et la structure en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de CXCR1 (page 7)

Figure 2 : Structure de la rhodopsine bovine (page 10)

Figure 3 : Les principales sous-unités de la protéine G hétérotrimérique et leurs effecteurs cellulaires (page 14)

Figure 4 : Les effecteurs cellulaires canoniques et non canoniques des sous-unités $G\beta\gamma$ (page 16)

Figure 5 : Représentation schématique de la potentiation calciques dépendante des protéines $\beta\gamma$ (page 16)

Figure 6: Le cycle d'activation de la protéine G hétérotrimérique (page 18)

Figure 7 : Structure de la β -arrestine-1 à l'état inactif (page 27)

Figure 8 : Adressage endosomale dépendant et indépendant de l'ubiquitination (page 29)

Figure 9 : La conformation active d'un RCPG nécessite la présence de la protéine G et de l'agoniste (page 36)

Figure 10 : Principe du senseur d'activation des RCPG par FRET (FRET intramoléculaire) (page 37).

Figure 11 : Les différentes interfaces de dimérisation entre les protomères du récepteur β 1-AR (page 45).

Figure 12 : Conséquences de la dimérisation des RCPG au niveau de la stoechiométrie et dans l'asymétrie de couplage avec les partenaires solubles (page 47)

Figure 13 : Spécificité de la signalisation des RCPG (page 53)

Figure 14 : Les principales techniques génétiques et protéomiques utilisées pour l'identification des partenaires d'interaction associés aux récepteurs couplés aux protéines G (page 55)

Figure 15 : Principe de la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert) (page 59)

Figure 16 : Organisation des différents partenaires synaptiques du récepteurs 5-HT_{2C} (page 68)

Figure 17 : Biosynthèse et dégradation de la mélatonine (page 73)

Figure 18 : Voies de signalisation des récepteurs MT₁ et MT₂ (page 81)

Figure 19 : Effet de la mélatonine au niveau des photorécepteurs (Page 91)

Figure 20 : Principe général de la technique MYTH appliquée aux protéines transmembranaires (page 122)

Figure 21 : Organisation moléculaire des protéines Cav2.2, SNAP25 et Munc-18 au niveau de la zone active (page 124)

Figure 22: Les différents isoformes de la synapsine I et II (page 126)

Figure 23 : A) Topologie membranaire des sous-unités de Cav2.2 à l'état natif (page 169)

Figure 24 : Modélisation moléculaire du micro-environnement du canal Cav2.2 au niveau de la zone active (page 173)

Figure 25 : Structure du transporteur de la dopamine (page 206)

1 Sommaire

<u>AVANT-PROPOS</u>	6
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G</u>	2
1) <u>Généralités</u>	3
2) <u>Histoire des RCPG</u>	3
3) <u>La Structure moléculaire des RCPG</u>	5
3.1) <u>L'analyse des domaines transmembranaires</u>	5
3.2) <u>L'analyse des domaines extracellulaires</u>	5
3.3) <u>L'analyse des domaines intracellulaires</u>	6
3.4) <u>Les modifications post-traductionnelles de la région interne des RCPG</u>	8
4) <u>La classification des RCPG et les récepteurs orphelins</u>	8
4.1) <u>La classification selon le système A-F</u>	8
4.2) <u>La classification selon le système GRAFT</u>	9
4.3) <u>Les récepteurs orphelins, une classe à part ?</u>	12
5) <u>Les RCPG : des complexes à trois partenaires</u>	13
5.2) <u>Les protéines G hétérotrimériques</u>	13
5.3) <u>Le cycle d'activation de la protéine G</u>	17
5.4) <u>Les bases structurales de la spécificité de l'interface récepteur-protéine G</u>	17
5.5) <u>Les modulateurs de la protéine G</u>	19
6) <u>Le Cycle de vie d'un RCPG</u>	21
6.1) <u>La néosynthèse des RCPG</u>	21
6.2) <u>Le transport antérograde vers la surface cellulaire</u>	22
6.3) <u>Les RCPG à la surface cellulaire</u>	23
6.4) <u>L'endocytose des RCPG et leur re-sensibilisation (recyclage)</u>	26
<u>CHAPITRE II : LA PHARMACOLOGIE DES RCPG</u>	31
1) <u>Introduction à la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G</u>	32
2) <u>Le mécanisme d'activation des RCPG</u>	33
2.1) <u>A la recherche d'un modèle mathématique qui décrit le mécanisme d'activation des RCPG</u>	33
2.2) <u>Les différences conformationnelles entre l'état actif et l'état inactif du RCPG</u>	34

3)	<u>La régulation de la signalisation des RCPG par des molécules pharmacologiques</u>	38
	<u>Les agonistes :</u>	38
	<u>Les agonistes inverses :</u>	38
	<u>Les antagonistes</u>	38
	<u>Les ligands allostériques :</u>	38
4)	<u>La compartimentation de la signalisation des RCPG</u>	39
	<u>LA DIMERISATION DES RCPG</u>	42
1)	<u>Les RCPG : seuls, en couple, ou à plusieurs ?</u>	42
2)	<u>Le RCPG dans tous ses états</u>	42
3)	<u>L'interface de dimérisation entre les RCPG</u>	44
4)	<u>Stœchiométrie RCPG-partenaires et asymétrie de couplage</u>	46
5)	<u>La dimérisation à travers le cycle de vie du RCPG</u>	48
6)	<u>Les effets allostériques au sein du dimère et les conséquences sur la signalisation</u>	48
7)	<u>Les hétérodimères in vivo</u>	50
	<u>LE COMPLEXE D'INTERACTION DES RCPG</u>	51
1)	<u>Généralité sur le complexe protéique associé aux RCPG</u>	52
2)	<u>Les techniques utilisées pour l'identification du complexe protéique associé aux RCPG</u>	54
	2.1) <u>L'identification des partenaires protéiques à grande échelle</u>	54
	2.2) <u>Les techniques protéomiques couplées à l'analyse en SM (Spectrométrie de Masse)</u>	56
3)	<u>Les partenaires d'interaction des RCPG dans la cellule</u>	59
	3.1) <u>Les protéines chaperonnes</u>	59
	3.2) <u>Les oligomères de RCPG</u>	59
	3.3) <u>Les protéines accessoires RAMP (Receptor Activity Modifying Proteins)</u>	60
	3.4) <u>Les protéines d'échafaudage</u>	60
	3.5) <u>Les protéines de dégradation et de recyclage</u>	62
	3.6) <u>Autres types de régulation RCPG-GIP</u>	64
4)	<u>L'identification des complexes de protéines associées aux RCPG</u>	64
	<u>CHAPITRE III : LA MELATONINE ET SES RECEPTEURS</u>	68
	<u>La mélatonine :</u>	69
1)	<u>Physiologie de la mélatonine</u>	69

2)	<u>La synchronisation de l'horloge biologique interne par la photopériode</u>	70
2.1)	<u>Relais de l'information lumineuse de la rétine jusqu'aux NSC</u>	70
2.2)	<u>Relais de l'information nerveuse du SCN jusqu'à la glande pinéale</u>	70
3)	<u>Synthèse, diffusion et dégradation de la mélatonine</u>	71
	<u>Les récepteurs de la mélatonine</u>	73
1)	<u>La famille des récepteurs de la mélatonine couplés aux protéines G : MT1, MT2 et GPR50</u>	73
2)	<u>La structure protéique des récepteurs de la mélatonine</u>	73
2.1)	<u>D'un point de vue génomique</u>	73
2.2)	<u>Les récepteurs de la mélatonine appartiennent à la superfamille des RCPG</u>	74
3)	<u>Le déterminisme moléculaire responsable de la reconnaissance de la mélatonine par MT₁ et MT₂</u>	75
4)	<u>Le profil d'expression des récepteurs de la mélatonine</u>	75
5)	<u>La régulation de l'expression des récepteurs MT₁ et MT₂</u>	76
6)	<u>Les polymorphismes génétiques décrits pour les récepteurs humains de la mélatonine</u>	77
7)	<u>La pharmacologie des récepteurs MT1 et MT2</u>	78
7.1)	<u>La signalisation des récepteurs MT1 et MT2</u>	78
7.2)	<u>Les ligands mélatonérgiques:</u>	79
7.3)	<u>La dimérisation des récepteurs de la mélatonine</u>	81
	<u>Les fonctions physiologiques de la mélatonine et de ses récepteurs</u>	82
1)	<u>Les effets de la mélatonine sur la rythmicité circadienne</u>	82
2)	<u>La régulation des rythmes saisonniers et de la reproduction chez les animaux</u>	83
3)	<u>Les effets de la mélatonine sur le plan neuronal</u>	84
3.1)	<u>L'effet de la mélatonine sur la plasticité neuronale</u>	84
3.2)	<u>L'effet neuroprotecteur de la mélatonine</u>	85
4)	<u>La mélatonine et ses récepteurs dans la rétine</u>	85
4.1)	<u>La mélatonine et la photosensibilisation des photorécepteurs</u>	86
4.2)	<u>La mélatonine module la neurotransmission au niveau de la rétine</u>	86
5)	<u>Autres effets de la mélatonine</u>	87
	<u>LA PARTIE RESULTATS</u>	89
1)	<u>ARTICLE 1</u>	90
	<u>Introduction</u>	90

<u>Discussion</u>	113
<u>ARTICLES 2 & 3</u>	119
<u>Introduction</u>	120
<u>Discussion de l'article 2</u>	163
1) <u>Partie I : L'interactome de MT₁ vs l'interactome de MT₂</u>	163
1.1) <u>L'analyse des interactomes des récepteurs de la mélatonine</u>	163
1.2) <u>L'importance du domaine Cter dans les interactions RCPG-GIP</u>	166
2) <u>Partie II : L'interaction des RCPG avec les protéines présynaptiques</u>	166
2.1) <u>L'interaction de MT1 et des RCPG avec des partenaires présynaptiques</u>	167
2.2) <u>L'interaction fonctionnelle entre les RCPG, Cav2.2 et les protéines présynaptiques</u>	168
3) <u>Partie III : Les arguments en faveur d'une localisation synaptique des récepteurs de la mélatonine</u>	172
3.1) <u>La comparaison de l'interactome de MTR avec l'interactome des protéines présynaptiques</u>	172
3.2) <u>La comparaison de l'interactome de MTR avec le protéome d'autres RCPG :</u>	174
3.3) <u>Les effets connus de la mélatonine et de ses récepteurs qui requièrent une localisation présynaptique de MTR :</u>	175
3.4) <u>L'inhibition du relargage de la dopamine par la mélatonine</u>	176
3.5) <u>Le phénotype des souris KO pour Ca_v2.2</u>	177
3.6) <u>Certains effets neuroprotecteurs liés à la mélatonine passent par les récepteurs MTR et ne sont pas seulement dus aux propriétés anti-oxydantes de la mélatonine</u>	177
<u>ARTICLE 3</u>	179
<u>Discussion de l'article 3:</u>	205
1) <u>Généralités sur la physiologie du transporteur de la dopamine</u>	205
2) <u>La discussion des résultats expérimentaux</u>	207
<u>Discussion générale et perspectives</u>	212

AVANT-PROPOS

La mélatonine est une indolamine dérivée du tryptophane et de la sérotonine. Elle est retrouvée chez différentes espèces animales et végétales, allant des algues et des bactéries jusqu'aux vertébrés (Hardeland & Poeggeler ; 2003). Chez l'homme, cette hormone est principalement sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit et possède des fonctions physiologiques diverses, notamment la régulation du rythme circadien par l'entraînement de l'horloge biologique interne (Hardeland et al ; 2006). La mélatonine est également connue pour promouvoir le sommeil (Brzezinski et al ; 2005) et pour ses effets neuro-protecteurs, cardio-protecteurs, immuno-régulateurs et antioxydants (Kaur and ling ; 2008) (Favero et al ; 2014) (Reiter et al ; 2000) (Galano et al ; 2011). La mélatonine active deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) nommés MT_1 et MT_2 (MTR) qui semblent médier une grande partie des effets de l'hormone. Avec l'âge et dans diverses maladies psychiatriques et neuro-dégénératives, une déclinaison de la synthèse de la mélatonine et de l'expression de ses récepteurs a été décrite. A cet égard, la mélatonine apportée de manière exogène peut améliorer l'état des patients à différents niveaux (Rosales-Corral et al ; 2012) (Rossignol & Frye; 2013) (Pacchierotti et al ; 2001) (Lin et al ; 2013).

Depuis sa création en 1997, le laboratoire du Dr Ralf JOCKERS travaille sur les récepteurs de la mélatonine. Les travaux menés par l'équipe ont pour but de comprendre les régulations cellulaires des récepteurs de la mélatonine et ont participé à la validation de nouveaux concepts pharmacologiques dans le domaine des RCPG. L'équipe s'intéresse notamment à l'étude des dimères de RCPG et à la caractérisation des partenaires protéiques qui s'associent à ces récepteurs. En effet, ces partenaires influencent la localisation cellulaire et/ou la signalisation des RCPG. Aussi, mes travaux de thèse dans le laboratoire s'inscrivent dans la continuité de plusieurs lignes de recherche de l'équipe, qui sont les suivantes :

Le laboratoire a été parmi les premiers à maîtriser la technologie du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) qui permet d'étudier les interactions protéine/protéine dans les cellules vivantes. L'équipe a notamment montré que les récepteurs MT_1 et MT_2 sont capables de dimériser et que les récepteurs MT_2 forment préférentiellement des complexes hétéromériques MT_1/MT_2 par rapport aux homomères MT_2/MT_2 (Ayoub et al ; 2002) (Ayoub et al ; 2004).

GPR50 est un récepteur orphelin qui ne lie pas la mélatonine, mais qui est apparenté aux récepteurs MTR du fait de sa forte homologie de séquence avec ces récepteurs. Le laboratoire a montré que GPR50 forme des hétérodimères avec MT₁ et avec MT₂ mais que seules les fonctions de MT₁ sont inhibées au sein de l'hétérodimère. Cette inhibition est observée au niveau de liaison de la mélatonine, du couplage à de la protéine G et du recrutement des β -arrestines (Levoye et al ; 2006). Cette étude constitue l'un des premiers exemples décrivant des fonctions indépendantes du ligand pour les RCPG orphelins, fonctions médiées par des phénomènes d'interactions protéiques. Elle souligne également l'importance de l'étude de l'hétérodimérisation entre RCPG et entre RCPG et d'autres protéines régulatrices, dans le but de mieux comprendre les régulations de ces récepteurs. Aussi, l'identification du complexe protéique associé aux récepteurs de la mélatonine a constitué une ligne directrice pour les travaux de l'équipe pendant ces dernières années (Maurice et al ; 2011).

L'équipe a débuté la quête de l'identification des partenaires des récepteurs de la mélatonine en s'associant avec la société Hybrigenics. Cette société est spécialisée dans l'application du double hybride utilisée classiquement pour la mise en évidence d'interactions binaires. Le double hybride a nécessité l'expression de domaines solubles des MTR dans la levure. Ainsi, l'équipe a pu identifier la protéine à 13 domaines PDZ « MUPP1 » comme partenaire d'interaction spécifique du domaine Cter (C terminal) de MT₁, et nécessaire pour la signalisation du récepteur (Guillaume et al ; 2008).

Le laboratoire a ensuite appliqué la stratégie TAP (Tandem Affinity Purification) ou double purification en tandem. Pour ce faire, les récepteurs MT₁, MT₂ et GPR50 ont été fusionnés à des modules d'affinité puis stablement exprimés dans des cellules HEK293. Les récepteurs ont ensuite été purifiés afin d'identifier leurs partenaires d'interactions par spectrométrie de masse (Daulat et al ; 2007). Cette étude a permis de découvrir que le récepteur du TGF β (TGF β RII) est un partenaire d'interaction du récepteur GPR50. L'étude de l'interaction GPR50/TGF β R montre que GPR50 potentialise la signalisation de TGF β RII en masquant le motif d'interaction du récepteur tyrosine kinase avec son régulateur négatif FKBP12 (Wojciech et al ; en préparation).

La purification de complexes protéiques en utilisant des peptides synthétiques comme proie est une stratégie supplémentaire pour l'identification de partenaires d'interactions *ex-vivo*. Aussi, l'application de cette technique à la partie Cter de MT₁ et de MT₂ a permis d'identifier plusieurs protéines qui interagissent avec ce domaine à partir d'un lysat de cerveau de souris (Maurice et al ; 2008). L'étude a ainsi permis d'identifier la protéine régulatrice RGS20 (Regulator of G-protein Signalling 20). L'étude faite sur RGS20 a montré qu'elle est responsable de la prolongation de l'activation de la protéine G suite à la stimulation de MT₁, mais pas de MT₂. De plus, MT₂ ne recrute pas RGS20, mais son activation au sein de l'hétérodimère MT₁*/MT₂ (qui lui recrute RGS20, avec un mutant MT₁* inactif) récapitule les effets de la RGS par rapport à un récepteur MT₁ sauvage. Ceci a ainsi montré que MT₂ peut activer la RGS20 associée à MT₁ au sein du dimère MT₁/MT₂ (Maurice et al ; 2010). Cette publication a fait partie des études qui ont conforté le concept d'asymétrie de couplage au sein des

dimères de RCPG. En effet, la surface interne d'un monomère de RCPG (environ 45 Å) ne peut coupler à la fois la protéine G et une autre protéine telle que RGS20. Aussi, la dimérisation des RCPG offre une solution pour pouvoir recruter plusieurs protéines régulatrices.

L'objectif de la thèse :

Le travail présenté dans ce mémoire est matérialisé par mes travaux de thèse dans le laboratoire du Dr Ralf JOCKERS. Ce travail s'inscrit dans la continuité des axes de recherches de l'équipe, à savoir : (i) comprendre la pharmacologie des hétérodimères de RCPG *in vivo* (ii) appliquer des stratégies nouvelles pour l'identification des partenaires de RCPG (iii) caractériser les interactions entre les RCPG et quelques partenaires protéiques. A cet effet, je me suis intéressée dans le cadre de ma thèse aux aspects généraux de la régulation des récepteurs couplés aux protéines G, en portant une attention particulière aux les récepteurs de la mélatonine. Au terme de plusieurs années de recherche des partenaires protéiques associés aux récepteurs de la mélatonine, ce travail est le résultat d'une analyse globale de l'interactome de ces récepteurs qui a permis d'identifier des nouvelles fonctions physiologiques des MTR qui étaient jusque-là encore méconnues.

Titre de la thèse :

« *Etude des partenaires protéiques associés aux homodimères et aux hétérodimères des récepteurs couplés aux protéines G* »

Article scientifique publié:

I_ “*Heteromeric MT₁/MT₂ Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function*”

Kenkichi Baba*, **Abla Benleulmi-Chaachoua***, Anne-Sophie Journé, Maud Kamal, Jean-Luc Guillaume, Sébastien Dussaud, Florence Gbahou, Katia Yettou, Cuimei Liu, Susana Contreras-Alcantara, Ralf Jockers* and Gianluca Tosini*

* **co-premier et co-dernier auteur**

Science Signaling, 2013 Oct 8;6(296):ra89. doi: 10.1126/scisignal.2004302

Articles scientifiques en préparation :

1_ “Protein interactome mining defines melatonin MT_1 receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons”

Abla Benleulmi-Chaachoua, Lina Chen, Kate Sokolina, Victoria Wong, Igor Jurisica, Michel Boris Emerit, Michèle Darmon, Igor Stagljär, Petra Tafelmeyer, Gerald W. Zamponi, Philippe Delagrangé, Pascal Maurice and Ralf Jockers

2_ “Agonist-independent modulation of dopamine transporter DAT activity by melatonin receptors”

Abla Benleulmi-Chaachoua, Marine Le Boulch, Angeliki Karamitri, Kate Sokolina, Victoria Wong, Igor Stagljär, Philippe Delagrangé, and Ralf Jockers

3_ “Systematic identification of protein interactions of 50 clinically relevant human GPCRs”

Kate Sokolina*, Saranya Kittanakom*, Max Kotlyar, Pascal Maurice, Jorge Gandía, **Abla Benleulmi-Chaachoua**, Hiroyuki Kobayashi, Kenjiro Tadagaki, Victoria Wong, Diana Tacelosky, Elizabeth van Bockstaele, Beverly Reyes, Kevin R. Brown, Javier Menendez, Vuk Janjic, Lukas Buerkle, Martin Dinkler, Daniel Auerbach, Klaus Seuwen, Jason Moffat, Stephan Angers, Natasa Przulj, Robert Levenson, Michel Bouvier, Francisco Ciruela, Ralf Jockers, Igor Jurisica*, and Igor Stagljär*

* co-premier et co-dernier auteur

Liste des synthèses bibliographiques et des chapitres de livre :

1_ “G protein-coupled receptors in the spot light”

Benleulmi-Chaachoua, A., Wojciech, S., & Jockers, R. (2012).. *Biologie aujourd'hui*, 207(3), 191-200 (revue en français).

2_ “Differential Assembly of GPCR Signaling Complexes Determines Signaling Specificity. In *GPCR Signaling Complexes—Synthesis, Assembly, Trafficking and Specificity*”

Maurice, P., **Benleulmi-Chaachoua, A.**, & Jockers, R. (2012). (pp. 225-240). Springer Netherlands

3_ “GPCR-interacting proteins, major players of GPCR function”

Maurice, P., Guillaume, J. L., **Benleulmi-Chaachoua, A.**, Daulat, A. M., Kamal, M., & Jockers, R. (2011). *Advances in pharmacology*, 62, 349.

Présentation orale lors de congrès internationaux :

"Identification of new melatonin receptor functions by protein interactome mining"

Gordon research seminar – Molecular pharmacology

27-28 Avril 2013

Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort

Lucca (Barga), Italie.

INTRODUCTION

**CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES RECEPTEURS
COUPLES AUX PROTEINES G**

1) Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G ou RCPG représentent l'une des plus grandes classes de récepteurs membranaires. Ils reconnaissent divers ligands solubles et traduisent les signaux externes en cascades de signalisation intracellulaires.

Chez l'homme, les RCPG sont au nombre de 800 et la moitié sont des récepteurs olfactifs (Fredriksson et al ; 2003). Le contingent restant est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques qui est à l'image de la diversité de leurs ligands : photons, ions, molécules odorantes, nucléotides, peptides, lipides et protéines. Aussi, les dérégulations qui touchent ces récepteurs sont responsables de troubles neuroaux, métaboliques et endocriniens variés.

Les RCPG sont la cible de 30 à 40 % des médicaments mis sur le marché et qui couvrent un large panel d'indications thérapeutiques (Overington et al ; 2006). Ainsi, la quête de nouveaux principes actifs ne cesse de se développer et les grandes sociétés pharmaceutiques consacrent plus de 30 % de leur budget en recherche et développement pour le domaine des RCPG (Thomsen et al ; 2005) (Klabunde et al; 2002).

2) Histoire des RCPG

L'histoire des RCPG ne peut être dissociée de celle des neurosciences puisque plus de 90 % de RCPG sont exprimés au niveau du système nerveux (Vassilatis et al ; 2003).

La pratique de la saignée a connu une grande popularité durant plus de 700 ans, mais elle n'était d'aucune utilité pour guérir les maladies neuropsychiatriques appelées maladies du diable. Entre 1700 et 1900, les avancées faites en matière de chimie, anatomie, chirurgie et histologie encouragent la fascination des médecins et chimistes, à vouloir « guérir le cerveau ». Et c'est ainsi que l'on s'est familiarisé avec les neurones, les jonctions neuro-musculaires et les substances « à effets ». Parmi ces érudits de la science, on retrouve Camillo Golgi, Rudolph Virchow, Jan Purkinje, George Huntington et James Parkinson.

La notion de récepteur a été initialement évoquée par Claude Bernard en 1878 qui a décrit l'effet du curare sur la plaque motrice. Il émit alors la notion de spécificité et d'efficacité du récepteur sans y mettre un nom. Paul Ehrlich, biologiste allemand (Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908) introduit une dizaine d'années plus tard le terme de « récepteur » en expliquant que les toxines qui ciblent le trypanosome se fixent sur des chaînes latérales. Il nomma alors sa trouvaille « side chain theory » qui renvoie à des notions d'affinité et de déterminisme moléculaire (Ehrlich, P. 1956 & 1957). En 1926, Joseph Clark établit les premières notions de pharmacologie moderne telles que la relation dose-effet, compétition entre agoniste et antagoniste, efficacité, etc... Il expliqua que les récepteurs de l'adrénaline et de l'acétylcholine sont majoritairement exprimés à la surface des cellules du muscle

cardiaque de la grenouille. Joseph Clark est aussi le premier qui tenta de décrire les effets observés sur les tissus par des modèles mathématiques, modèles qui seront abordés dans le chapitre suivant qui concerne la pharmacologie des RCPG (Clark, A. J. 1933).

Ensuite, il a fallu patienter jusqu'au début des années 1980 pour la description du premier RCPG qui est l'opsine bovine. L'opsine est un récepteur particulier conjugué à un chromophore sensible à la lumière, le 11-cis-retinal. Le complexe est appelé rhodopsine et s'active suite à l'isomérisation du rétinal en présence d'un photon. La rhodopsine représente près de 90 % des protéines des cellules en bâtonnet de la rétine avec une concentration d'environ 3 mM, chose qui a indéniablement facilité l'étude de cette protéine (Hargrave et al ; 1983). Peu de temps après, les récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -AR) ont été purifiés par chromatographie d'affinité dans le laboratoire du Dr Robert J. Lefkowitz en 1979 (Prix Nobel de chimie en 2012) (Caron et al ; 1979). Le récepteur a ensuite été cloné par Dixon en 1986 (Dixon et al ; 1986).

L'étude de la structure des récepteurs β_2 -AR a montré une grande similarité avec celle de la rhodopsine. Ceci a encouragé l'émergence de la notion de classe de récepteurs à sept domaines membranaires qui partagent des structures et des mécanismes d'activation similaires (Lefkowitz ; 2000).

La recherche dans le domaine des RCPG n'a cessé d'être récompensée. Le prix le plus récent est le prix Nobel de chimie discerné conjointement aux Pr Robert Lefkowitz et Pr Brian Kobilka en 2012 pour l'ensemble de leurs travaux sur les RCPG. En effet, les études du laboratoire de Lefkowitz ont permis de découvrir les kinases des RCPG et les protéines β -arrestines, deux composantes majeures dans la signalisation des récepteurs (Benovic et al ; 1986) (Luttrell & Lefkowitz ; 2002). Ensuite en 2007, Kobilka et ses collaborateurs réussissent à cristalliser la structure du récepteur β_2 -AR à l'état actif (Cherezov et al ; 2007) (Rasmussen et al ; 2007).

Fait intéressant dans l'histoire des RCPG : la structure des RCPG a été résolue bien après la découverte de leurs ligands, des protéines G et du plus connu de leurs seconds messagers : l'AMPc (Adénosine Monophosphate Cyclique). En effet, dans les années 1950, Earl W. Sutherland (Prix Nobel en 1971) étudiait la glycogénolyse au niveau du foie de chien quand il découvrit que la production du glucose sous l'action de l'adrénaline dépendait de la production d'une petite molécule soluble qui est l'AMPc. Sutherland continua ses recherches et découvrit aussi l'adénylate cyclase (Berthet et al; 1957) (Sutherland et al; 1962). Ensuite, dans les années 1970, Martin Rodbell décrit le rôle des protéines G dans la régulation de l'adénylate cyclase (Salomon et al ; 1975) ; ses travaux ont été confirmés par Alfred Gilman qui a fini par purifier et caractériser les protéines G (Northup et al ; 1980). Pour l'ensemble de leurs travaux, les deux chercheurs américains Rodbell et Gilman ont reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1994.

3) La Structure moléculaire des RCPG

Les RCPG partagent une architecture étonnamment conservée malgré la grande hétérogénéité de leurs ligands. La structure des RCPG a été soupçonnée dès les premières études faites sur la rhodopsine. Son analyse par rayon-x a donné beaucoup de renseignements sur sa taille et sur sa forme (Sardet et al ; 1976). En ajoutant à cela les résultats du clonage en 1983, on a découvert que cette protéine présentait sept segments hydrophobes. Par la suite, à partir des années 2000, la résolution de la structure de la rhodopsine bovine a beaucoup aidé dans la classification des RCPG et dans la compréhension de la relation structure/fonction relative à ces protéines.

Il est admis de nos jours que les critères d'inclusion d'un récepteur dans la superfamille des RCPG sont : (i) la présence de sept séquences de 25 à 35 acides aminés à caractère hydrophobe qui constituent les domaines transmembranaires (TM), (ii) une forte homologie de séquence avec un RCPG déjà identifié et (iii) la capacité de la protéine à interagir avec la protéine G (bien que ce dernier point n'a pas encore été validé pour tous les récepteurs notamment les récepteurs orphelins et ceux récemment découverts) (Nathans et al ; 1983). La taille des RCPG est aussi variable que les ligands qu'ils reconnaissent. Chez l'homme, on estime que GPR169 est le plus petit récepteur avec 289 acides aminés et que l'EGF-like protéin 1 possède la plus longue chaîne peptidique composée de 3312 acides aminés. La disparité la plus importante se retrouve au niveau de l'extrémité N terminale (Nter) et des boucles extracellulaires e2 et e3 ; alors que cette divergence est plus restreinte du côté interne en terme de longueur de séquence (Mirzadegan et al ; 2003).

3.1) L'analyse des domaines transmembranaires

Les sept hélices transmembranaires sont délimitées de part et d'autre par une extrémité Nter extracellulaire et une extrémité Cter cytoplasmique. Les hélices ne sont pas toutes perpendiculaires par rapport au plan de la membrane plasmique mais présentent des angles d'inclinaison différents selon le récepteur et selon l'état d'activation de celui-ci. L'angle d'inclinaison le plus important est celui de l'hélice 3, ce qui semble être conservé chez tous les RCPG.

3.2) L'analyse des domaines extracellulaires

En plus d'un rôle très déterminant dans la spécificité au ligand, la partie Nter peut avoir une taille très variable d'un récepteur à l'autre. C'est aussi la partie qui subit le moins de changements conformationnels suite à l'activation du récepteur par son ligand.

Les 7 TM délimitent trois boucles extracellulaires qui participent à la liaison du ligand. La boucle e1 est généralement de petite taille avec seulement 6 résidus chez la rhodopsine (Mirzadegan et al ; 2003) (Clark et al ; 2010). Le domaine Nter présente des sites de glycosylation dont les N-glycosylations qui sont les plus fréquentes. Ces glycosylations permettent de stabiliser le récepteur et sont nécessaires

pour le trafic (Cho et al ; 2012). Pour certains récepteurs, les glycosylations constituent une partie intégrante du motif de liaison au ligand (Zhang et al ; 2001).

3.3) L'analyse des domaines intracellulaires

Les boucles intracellulaires qui sont au nombre de trois i1, i2 et i3 jouent un rôle important dans la régulation de la signalisation des récepteurs : (i) elles se lient à différents partenaires protéiques membranaires et solubles (Maurice et al ; 2011) (ii) elles participent à l'hétérodimérisation des RCPG (Piechowski et al ; 2013) et (iii) elles sont responsables de la liaison et de l'activation des protéines G hétérotrimériques (Yamashita et al ; 2000).

La longueur de la boucle i3 est très variable et peut être constituée d'une centaine d'acides aminés. L'instabilité conformationnelle de cette boucle constitue un frein à la cristallisation des RCPG, problème généralement évité par l'introduction de mutations ou de protéines de fusion plus stables. Aussi, la cristallisation des récepteurs $\beta 1$ -AR a conduit à la résolution de deux structures distinctes au niveau de la boucle i3 dont l'une qui peut s'organiser en hélice α allongeant le TM5 et 6 (Moukhametziano et al ; 2011).

L'extrémité Cter joue un rôle important dans le trafic du récepteur, les phénomènes d'hétérodimérisation entre RCPG et aussi dans l'interaction avec de nombreux partenaires cytoplasmiques. Par exemple, le Cter de l'isomère mGluR1b contient un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique RRKK qui régule sa localisation cellulaire et son profil d'hétérodimérisation (Remelli et al ; 2008).

Pour la plupart des RCPG cristallisés, l'extrémité Cter comprend une partie proximale en forme d'hélice α parallèle au plan de la couche lipidique appelée hélice 8 ou H8 (par allusion à un huitième domaine transmembranaire) (Figure 1).

L'hélice 8 est une chaîne amphipatique dont le motif semi-conservé est F(R/K)xx(F/L)xxx(L/F). Elle est généralement ancrée à la membrane plasmique par palmitoylation et présente des contacts avec les TM1 et TM7 ainsi qu'avec la boucle i1. Dans la rhodopsine, l'hélice 8 serait une structure dynamique qui contribuerait à la stabilisation et au fonctionnement du récepteur. Elle change de conformation suite à l'activation de la rhodopsine et recrute directement les arrestines visuelles (Verzijl et al ; 2006) (Maeda et al ; 2010) (Kirchberg et al ; 2011). Pour les récepteurs muscariniques de l'Acétylcholine M1 et M3, l'hélice 8 subit également un changement de conformation suite à l'activation par le ligand et serait importante pour le précouplage de M1 avec la protéine G (Kaye et al ; 2011).

L'hélice 8 constitue également une interface de dimérisation pour la rhodopsine et d'oligomérisation pour le récepteur D2 de la dopamine (Guo et al ; 2008). Elle est aussi un site privilégié de recrutement des partenaires régulateurs du récepteur de la mélatonine MT₁ et du récepteur de la calcitonine-like entre-autres (Maurice et al ; 2010) (Kuwasako et al ; 2011).

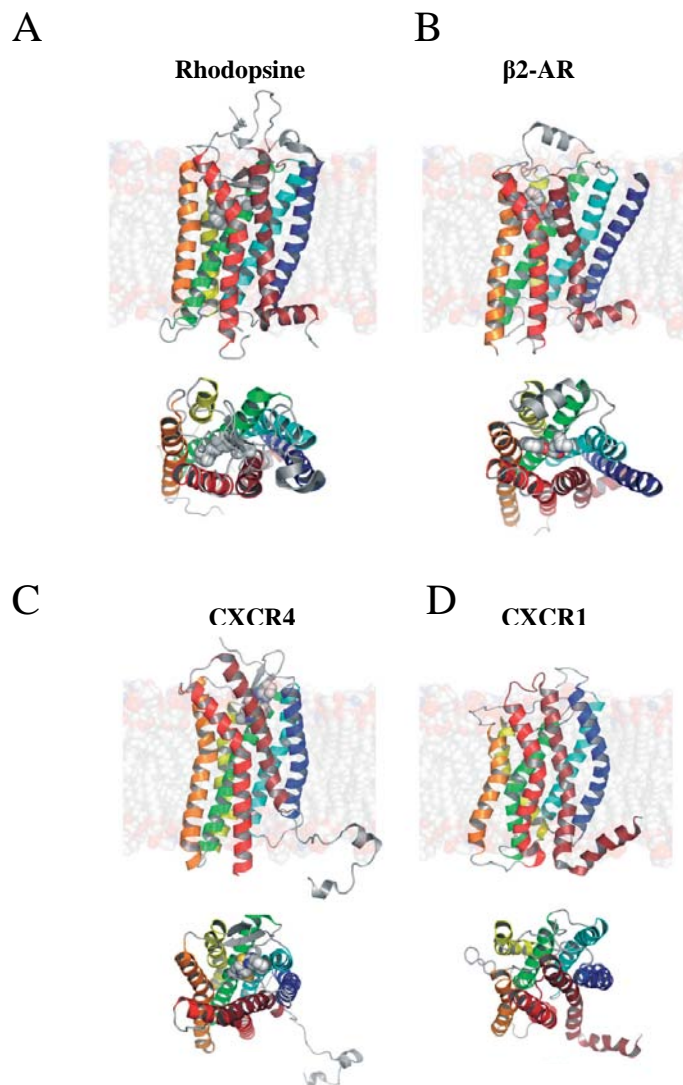


Figure 1 : Cristallisation des récepteurs (A) rhodopsine, (B) β 2-AR, (C) CXCR4 et (D) la structure en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de CXCR1. Figure du haut : vue face à la membrane plasmique. Figure du bas. Vue du côté extracellulaire. D'après (Latek et al ; 2012). A noter : l'absence de l'hélice 8 chez le récepteur CXCR4.

Par ailleurs, l'hélice 8 est absente dans certains récepteurs comme PAR1 (proteases-activated receptor1) (Zhang et al ; 2012) et le récepteur aux chimiokines CXCR4 (Wu et al ; 2010), à moins que ce ne soit un artefact dû aux conditions de cristallisation. En effet, la résolution de la structure du récepteur mGluR2 au sein d'une membrane riche en cholestérol stabilise l'hélice 8, tandis que sa cristallisation en conditions déplétées en cholestérol perturbe la formation de cette hélice (Bruno et al ; 2012). De plus, Egloff *et al.* ont démontré que la cristallisation du récepteur de la neurotensine NTSR1 purifié dans un système procaryotique (en absence de palmitoylation) présente une hélice 8 contrairement au variant thermostable GW5 de ce récepteur, purifié dans des cellules eucaryotes, chez qui l'hélice 8 est déstructurée (White et al ; 2012) (Egloff et al ; 2014).

3.4) Les modifications post-traductionnelles de la région interne des RCPG

La région interne des RCPG est un site privilégié d'interaction avec une multitude de partenaires régulateurs. C'est aussi la cible de différentes modifications post-traductionnelles et chacune dicte une fonction précise (phosphorylation, palmitoylation, ubiquitination). Cependant, le devenir d'un RCPG est plutôt nuancé et dépend d'une balance entre toutes ces modifications. En plus de ces modifications communes, des études récentes font part que la S-nitrosylation du RCPG, des β -arrestines et de plusieurs protéines régulatrices joue également un rôle dans la régulation de l'expression et la signalisation du récepteur (Daaka et al ; 2012) (Penela et al ; 2010).

4) La classification des RCPG et les récepteurs orphelins

Les RCPG sont classifiés selon deux méthodes : une classification selon l'homologie de séquence appelée système A-F et une classification tenant compte du degré de parenté au cours de l'évolution connue sous l'acronyme GRAFT.

4.1) La classification selon le système A-F

Lefkowitz confia que l'établissement d'homologie de séquences entre les deux protéines membranaires β 2-AR et rhodopsine était quelque chose de totalement inattendu qui a marqué la naissance de la famille des RCPG : « *When we realized that the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin were the first two numbers of what was probably a large gene family, we were shocked. When we published the findings, so was everyone else...* » (Lefkowitz; 2000).

Les premières tentatives de classification prenaient en considération le pourcentage d'homologie de séquences et en 1990 Attwood et ses collaborateurs ont classifié les RCPG en 5 classes : A, B, C, D, E et F (Attwood et al : 1991 & 1994) au sein de chaque classe, les RCPG présentent au moins 25 % d'homologie de séquence au niveau des domaines transmembranaires.

4.2) La classification selon le système GRAFT

Les RCPG existent depuis une cinquantaine de millions d'années et leur présence dans le génome de diverses espèces constitue un argument en faveur du caractère évolutif de ces protéines. A titre d'exemple, toutes les classes de RCPG se retrouvent parfaitement chez les mycètes (Champignons) (Krishnan et al ; 2012) et chez des organismes primitifs unicellulaires (Nordström et al ; 2011). Classifier les récepteurs selon des analyses phylogénétiques présente un avantage pour comprendre les liens fonctionnels entre les RCPG de différentes espèces et entre les RCPG au sein d'une même espèce. Ces études permettent aussi de rendre compte de la pertinence des modèles animaux, chose qui constitue les fondements de la recherche translationnelle pour l'homme. Selon cette classification qui concerne seulement les récepteurs humains, les RCPG se regroupent en 5 sous-familles : Glutamates, Rhodopsine-like, Adhésion et Frizzled/Taste.

Les résultats des deux classifications A-F et GRAFT se rejoignent sur plusieurs points et sont présentés conjointement ci-après (Lagerström et al ; 2008) (Fredriksson et al ; 2003) (Vassilatis et al ; 2003) (Mirzadegan et al ; 2003).

Classe A/ les récepteurs rhodopsine-like (670 membres)

C'est la classe qui compte le plus grand nombre de récepteurs dont près de 400 sont des récepteurs sensoriels olfactifs. La longueur de la séquence des membres de cette classe varie entre 290 et 951 acides aminés, la moyenne étant de 350 acides aminés (Figure 2).

Cette famille se caractérise par un domaine Nter généralement court et par plusieurs motifs conservés dont les plus importants sont : (i) le motif E/DRY localisé entre le TM3 et la boucle i2 important dans la régulation de l'état conformationnel des RCPG (ii) le motif NPXXY dans le TM7 essentiel à l'activation et à l'internalisation des récepteurs (Barak et al ; 1995) et (iii) une cystéine conservée proche de la surface du TM3 qui forme un pont disulfure avec une seconde cystéine dans la boucle e2, le pont entre les deux résidus est essentiel pour la cohésion des domaines transmembranaires (Rovati et al ; 2007).

Phylogénétiquement, cette classe se compose de 4 embranchements :

Le cluster α : il comprend les récepteurs dont le ligand est une amine qui se lie dans une poche profonde au sein des TM. C'est le cluster le plus important en termes de cibles pharmacologiques (médicaments pour le système cardiovasculaire, antipsychotiques et antihistaminiques). Ce cluster est représenté par les récepteurs de la mélatonine, de la dopamine et par les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine à titre d'exemple.

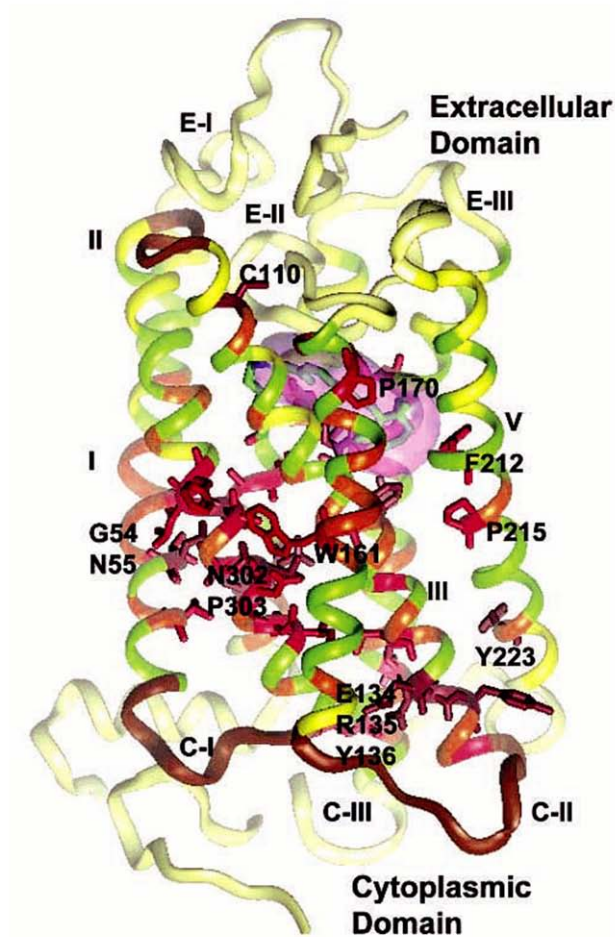


Figure 2 : Structure de la rhodopsine bovine. Degrés de similitude de la séquence peptidique analysés chez 270 récepteurs de la classe A des RCPG et représentés sur le squelette de la rhodopsine. Les pourcentages des résidus conservés sont présentés selon le code couleur suivant : (10 – 20 %) jaune pâle, (20 – 40 %) jaune, (40 – 60 %) vert, (60 – 80 %) orange, (80 – 100 %) rouge (Mirzadegan et al ; 2003).

Les clusters β et γ : ils sont représentés par les récepteurs hormonaux et les récepteurs aux chimiokines.

Le cluster δ : il regroupe majoritairement les récepteurs olfactifs qui ont la propriété de ne pas être spécifiques à une seule molécule odorante. En effet, une molécule odorante peut être reconnue par plusieurs récepteurs, de la même façon qu'un récepteur peut reconnaître plusieurs molécules odorantes.

Classe B/ les récepteurs d'adhésions (33 membres) et les sécrétines (15 membres)

C'est une famille atypique chez laquelle la moitié de structure est un RCPG (avec 7 domaines TM) et l'autre moitié est un domaine extracellulaire des protéines d'adhésion. L'extrémité Nter est en effet un domaine très imposant (entre 200 et 2800 aa) plutôt rigide et riche en glycosylations et en résidus prolines et cystéines (Harmar ; 2001).

Les récepteurs sécrétine forment une classe qui descend phylogénétiquement de la famille des récepteurs d'adhésion (Nordström et al; 2009). Le ligand est plutôt volumineux : hormones peptidiques comme la calcineurine ou le glucagon.

Classe C/ les récepteurs Glutamates (22 membres)

Cette classe est majoritairement représentée par les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR, l'acide γ -aminobutyrique GABA_BR et quelques récepteurs orphelins. Le domaine Nter est composé de deux lobes qui délimitent une cavité centrale pour la liaison du ligand. La cavité est connue sous le nom de VFTM (Venus FlyTrap Mechanism). Cette famille est particulièrement la cible de ligands allostériques qui se lient ailleurs que dans la formation VFTM et constitue un exemple de choix de l'hétérodimérisation constitutive entre RCPG.

Classe D et E (une centaine de membres)

Ces deux classes ne contiennent pas de gènes chez l'Homme et ne font pas partie de la classification GRAFT. Ce sont essentiellement des récepteurs aux phéromones et des senseurs de l'AMPC (Nakagawa et al ; 2005) (Prabhu et al ; 2006).

Classe F : Frizzled/Taste2 (31 récepteurs)

Le cluster frizzled comprend 10 protéines Frizzled et le récepteur Smoothened impliqué entre-autres, dans le développement embryonnaire et dans le maintien de la polarité tissulaire (Wang et al ; 2006). Le cluster Taste2 regroupe 25 récepteurs gustatifs dont plusieurs sont orphelins.

Les classifications des RCPG, leurs séquences, leurs ligands, les récepteurs désorphelinisés, les résolutions de structures ainsi que les polymorphismes génétiques sont renseignés en temps réel dans plusieurs bases de données accessibles au grand public tels que GPCRDB (Horn et al; 1998), IUPHARE : www.iuphar-db.org et GPCR mutant database <http://tGRAP.uit.no> (Edvardsen et al; 2002).

4.3) Les récepteurs orphelins, une classe à part ?

Les RCPG orphelins sont des protéines à sept domaines transmembranaires pour lesquelles des ligands naturels ou synthétiques ne sont pas encore découverts et ce malgré le fait qu'ils présentent de fortes homologies de séquences avec des RCPG non orphelins. Ils sont moins d'une centaine de récepteurs répartis dans toutes les classes de RCPG.

Certains RCPG orphelins sont constitutivement actifs, comme démontré pour GPR39 (Depoortere : 2012). Pour d'autres, leur expression est importante dans le maintien de différentes fonctions cellulaires. Par exemple, l'extinction de GPR97 dans les cellules intestinales lymphatiques humaines en culture perturbe l'adhésion et la migration cellulaire (Valtcheva et al ; 2013) et les souris invalidées pour le gène du récepteur GPR88 présentent des altérations au niveau du système dopaminergique nigrostriatal (Logue et al ; 2009).

Les tentatives de désorphelinisation à haut débit par criblage de chimiothèques naturelles ou synthétiques ont connu un bond à partir de 1995 et ont abouti à la découverte de ligands pour plus de 50 RCPG orphelins en moins d'une dizaine d'années (Szekeres et al ; 2002). En particulier, plusieurs RCPG ont été ainsi désorphelinisés par des neuropeptides (Orexin, ghréline, etc...) (Civelli et al, 2013). Cependant depuis 2005, le nombre de récepteurs désorphelinisés a considérablement baissé. Il faudrait donc probablement recourir aux nouvelles technologies basées sur l'étude de la signalisation intracellulaire en l'absence du ligand par exemple (Oakley et al ; 2006) (Beets et al ; 2011).

Rôles indépendants de l'activation par le ligand

De nouvelles données soulignent l'importance des fonctions indépendantes du ligand pour les RCPG orphelins. Par exemple, RGS7 est une protéine qui régule l'activation de la protéine G hétérotrimérique. Les études protéomiques sur cerveau de souris ont montré que la RGS7 interagit avec le RCPG orphelin GPR158. En effet, l'expression de GPR158 dans les cellules HEK293 potentialise le recrutement du complexe RGS7/G β 5 à la membrane. Ce recrutement influence la signalisation de tout autre RCPG non orphelin exprimé dans les mêmes cellules. Par exemple, l'activation du récepteur μ -opioïde par son agoniste résulte en l'activation de G α o dont la cinétique de désactivation est accélérée par RGS7, qui est recrutée à la surface suite à la simple expression de GPR158 dans les mêmes cellules (Orlandi et al ; 2012).

D'autres fonctions dépendent d'un contact étroit avec d'autres protéines. A ce sujet, nous avons décrit dans l'avant-propos l'effet inhibiteur de GPR50 sur la signalisation du récepteur de la mélatonine MT₁ par des interactions protéine/protéine (Levoye et al ; 2006). Un autre récepteur orphelin est l'isomère du récepteur métabotrope de l'acide γ -aminobutyrique GABA_BR2. Pour ce récepteur, l'isomère GABA_BR1 contient le site de liaison du GABA, et l'isomère orphelin GABA_BR2 est nécessaire pour l'adressage du complexe GABA_BR1/2 à la surface cellulaire (White et al ; 1998).

5) Les RCPG : des complexes à trois partenaires

Les RCPG sont des senseurs qui relaient les informations externes en des signaux internes par un processus non catalytique. Plusieurs intervenants protéiques participent à cette réponse cellulaire qui se traduit par différentes interactions moléculaires, échanges catalytiques, changements ioniques et transcriptionnels. Le signal transduit est en grande partie défini par l'isotype de la protéine G couplée au récepteur. Cependant, il pourrait sembler que le nombre de protéines G responsables de l'intégration des signaux de milliers de RCPG est limité ; ceci est sans compter sur la diversité signalétique engendrée par les récepteurs et qui est finement régulée par différents effecteurs à différents niveaux.

De nos jours, il est admis qu'à l'instar d'autres récepteurs tels que les récepteurs enzymes, les RCPG forment des complexes moléculaires dynamiques. Aussi, le dogme général veut que l'unité fonctionnelle minimale soit composée d'un RCPG, du ligand et d'une protéine G.

5.2) Les protéines G hétérotrimériques

La protéine G hétérotrimérique comme son nom l'indique, se compose de trois sous-unités α , β et γ . Il existe plusieurs isoformes clonées pour chaque sous-unité dont au moins 28 sous-unités α , 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ (Kristiansen et al ; 2004) (Figure 3).

La spécificité de la signalisation dépend en partie d'une combinaison entre différentes isoformes des différentes sous-unités. Cependant, toutes les combinaisons ne se réalisent pas et dépendent en fait du profil d'expression tissulaire et de la localisation subcellulaire définie par des modifications post-traductionnelles des sous-unités (Oldham and Hamm ; 2008).

5.2.1) Les sous-unités α

Ces protéines présentent une grande variabilité et sont réparties en 4 groupes (Gs, Gi/o, Gq et G12/13) selon leur homologie de séquence, les effecteurs ciblés et selon la sensibilité à certaines toxines (Simon et al ; 1991)

Sous unité	Famille	Sous-types	Effecteurs
α	α_s	Gas, Gao	Adénylate cyclase 1-9
			Canaux Ca ²⁺ , K ⁺
			Tubuline
	α_i/o	Gai-1, Gai-2, Gai-3	Adénylate cyclase
			Phospholipase A2
			Canaux K ⁺
		Gao	Canaux Ca ²⁺
			Canaux K ⁺
		Gat	GMPC phosphodiesterase
			Phospholipase A2
			Canaux Ca ²⁺
Gaz		GMPC phosphodiesterase	
	Phospholipase C		
	Canaux K ⁺		
$\alpha_q/11$	Gaq, Ga11, Ga14, Ga15, Ga16	Phospholipase C- β 1-4	
α_{12}	Gaa12, Ga13	P115-RhoGEF	
β	β_{1-5}	Diverses	Adénylate cyclase 1-7
			PLC β_{1-3}
			Phosphatidylinositol 3-kinase g
γ	γ_{1-11}	Non identifié	GIRK
			Protéine kinase D
			Rho & Rac
			Canaux Ca ²⁺ , K ⁺ et Na ⁺

Figure 3 : Les principales sous-unités de la protéine G hétérotrimérique et leurs effecteurs cellulaires. D'après (Kristiansen et al ; 2004).

Toutes les isoformes présentent un site de liaison au GTP (Guanosine Triphosphate) dont la structure est conservée chez toutes les protéines à activité GTPasique. Ce site se compose de trois boucles flexibles (Switch I, II et III) et sa conformation change lors de la liaison du GDP (Guanosine Diphosphate) ou de l'analogue nonhydrolysable GTP γ S (Coleman et al ; 1994) (Noel et al ; 1993). Les sous-unités α présentent également un domaine hélicoïdal composé de 6 hélices- α qui se juxtaposent au site GTPasique, ainsi qu'un domaine Nter cible de modifications post-traductionnelles qui régulent l'ancrage à la membrane plasmique et la liaison avec les unités β et γ . Les différentes modifications peuvent être des myristoylations (C : 14) sur un résidu glycine, une ou deux palmitoylations (C : 16) réversibles sur un résidu cystéine et des phosphorylations par différentes kinases (Chen and Manning 2001).

5.2.2) Les sous-unités β et γ

Les deux sous-unités β et γ forment un complexe de haute affinité qui lie la protéine α à l'état inactif. G β et G γ interagissent ensemble par leurs domaines N-terminaux qui forment un motif coiled-coil (entre deux hélices α). Outre son hélice α , G β présente sept feuillets β structurés en escargot, tandis que G γ possède une seconde hélice α (Lambright et al ; 1996).

G β subit des modifications post-traductionnelles assez limitées qui semblent jouer un rôle dans la signalisation telles que quelques phosphorylations sur des résidus histidines (Cuello et al ; 2003) ainsi que des mono-ADP- ribosylations (Lupi et al ; 2002).

La sous-unité γ quant à elle, est la cible de modifications covalentes qui régulent la localisation sub-cellulaire du complexe G $\beta\gamma$. G γ est prénylée au niveau de la partie Cter par un farnésyl (C :15) ou par un géranyl-géranyl (C :20). Cet acide gras est important pour l'adressage vers la membrane plasmique (Kino et al ; 2005) et un complexe G $\beta\gamma$ non prénylé peut présenter une localisation nucléaire au lieu d'être localisé à la surface cellulaire (Milligan & Kostenis ; 2006).

Les fonctions propres à G $\beta\gamma$ ont longtemps été négligées par rapport à celles de G α . A l'état actuel des connaissances et hormis la liaison avec différentes cibles cellulaires (Figure 4), de plus en plus d'études éludent un rôle important des G $\beta\gamma$ dans la régulation spatiotemporelle de la réponse cellulaire. Il a été montré que la cinétique de dissociation du complexe G $\alpha\beta\gamma$ dépend du récepteur, de la combinaison G $\beta\gamma$ et de l'isoforme G α activée (Digby et al ; 2008) (O'Neill et al ; 2012). Aussi, tous les complexes G $\beta\gamma$ quittent la membrane plasmique suite à l'activation du RCPG, avec une cinétique de translocation qui dépend du récepteur activé et du ligand mis à contribution (Ajith Karunarathne et al ; 2012).

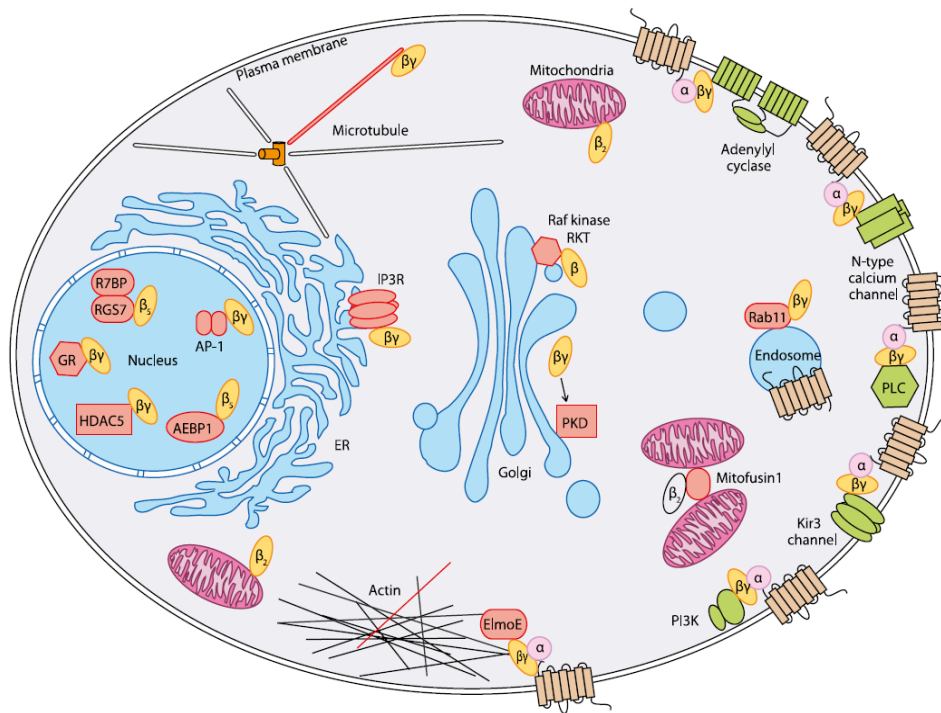


Figure 4 : Les effecteurs cellulaires canoniques et non canoniques des sous-unités Gβγ. D'après (Khan et al ; 2013).

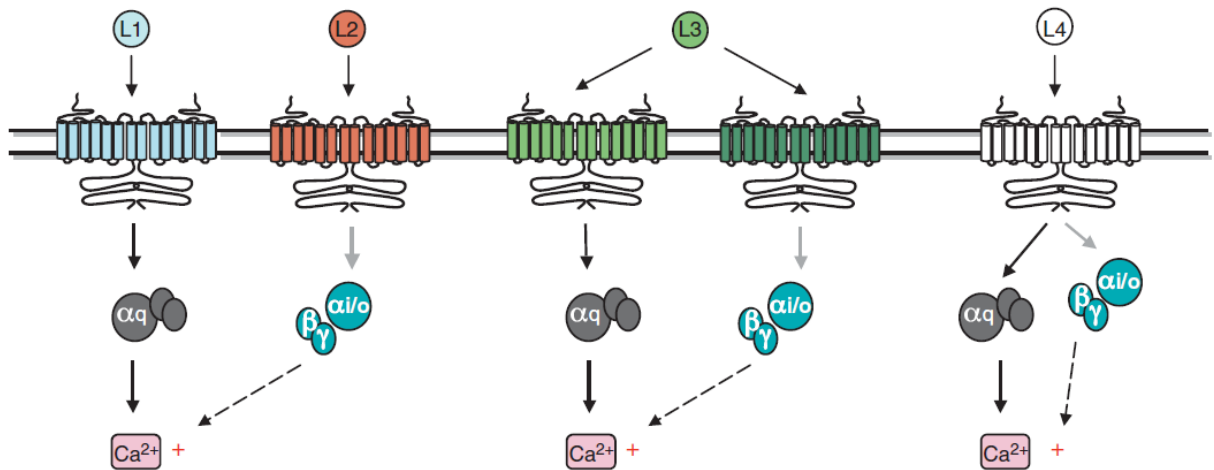


Figure 5 : Représentation schématique de la potentiation calciques dépendante des protéines Gβγ. Cross-talk entre les différentes cascades de signalisation des RCPG et ce de manière indépendante de l'hétérodimérisation des récepteurs. D'après (Rives et al ; 2009). Lx : ligand

Par ailleurs, $G\beta\gamma$ se lie directement à plusieurs types de canaux ioniques pour réguler différentes fonctions physiologiques telles que le relargage des neurotransmetteurs à partir du compartiment pré-synaptique (Khan et al ; 2013), ce rôle est notamment décrit dans la discussion des résultats de ce mémoire. Ils sont aussi des intervenants dans un nouveau genre de cross-talk entre récepteurs qui est indépendant de l'hétérodimérisation entre RCPG et dépendant de l'intégration de deux cascades de signalisation intracellulaire issues de deux récepteurs activés en même temps. Le complexe $G\beta\gamma$ a alors été montré à l'origine de la potentialisation de la réponse calcique générée par le récepteur mGluR1a (couplé $G\alpha_q$) suite à l'activation de GABA_BR (couplé $G\alpha_i/o$) dans les fibres de Purkinje. Les auteurs ont ainsi montré que la libération de $G\beta\gamma$ par un récepteur activé influence directement la signalisation du second récepteur. Ils montrent aussi que ce type de cross-talk est généralisable à plusieurs RCPG couplés $G\alpha_q$ et/ou $G\alpha_i/o$ (Rives et al ; 2009) (Figure 5).

5.3) Le cycle d'activation de la protéine G

A l'état inactif, les trois sous-unités $G\alpha\beta\gamma$ sont solidaires et $G\alpha$ fixe une molécule de GDP. Une fois le récepteur activé, ce dernier change de conformation et déstabilise le site de liaison du GDP au niveau de la protéine G qui lui est associée. Le récepteur agirait ainsi comme un catalyseur pour favoriser l'échange GDP/GTP selon le modèle des protéines GEF (Guanine Exchange Factor). Ensuite, ce mouvement est suivi d'une réorientation des sous-unités $G\beta\gamma$ qui se désolidarisent de $G\alpha$. Cependant, les changements à l'origine de ces arrangements protéiques sont encore sujets à débat. Pour plus d'informations cf (Denis et al ; 2012) et (McIntire ; 2009) (Figure 6).

5.4) Les bases structurales de la spécificité de l'interface récepteur-protéine G

Outre la disponibilité cellulaire et les profils d'expression des différentes sous-unités de la protéine G, la détermination du couplage récepteur-protéine G fait intervenir des motifs à la fois au sein du récepteur, mais aussi au niveau de la protéine G.

Grâce à des études de compétition avec des peptides synthétiques, de mutations, de cross-link ainsi que la résolution du cristal (β 2AR) - $G\alpha\beta\gamma$, les données montrent que plusieurs motifs au sein de la protéine G interviennent dans la liaison avec le récepteur. Ainsi pour la $G\alpha$, les parties Cter, Nter et le domaine hélicoïdal et GTPasique sont incriminés et les isoformes des protéines $G\beta$ et $G\gamma$ contribuent également dans la formation et dans la stabilisation du complexe récepteur-protéine G (Taylor et al ; 1994) (Yu et al ; 2008) (Hou et al ; 2000) (Rasmussen et al ; 2011a & b).

Du côté du récepteur, plusieurs études réalisées sur des protéines chimériques ainsi que différentes mutations montrent que plusieurs parties solubles sont responsables de l'interaction avec la protéine G comme la boucle i2 et notamment le motif DRY pour la classe A (Moro et al ; 1993), la boucle i3 (Conchon et al ; 1997) et plusieurs résidus dans la partie Cter (Liggett et al ; 1991).

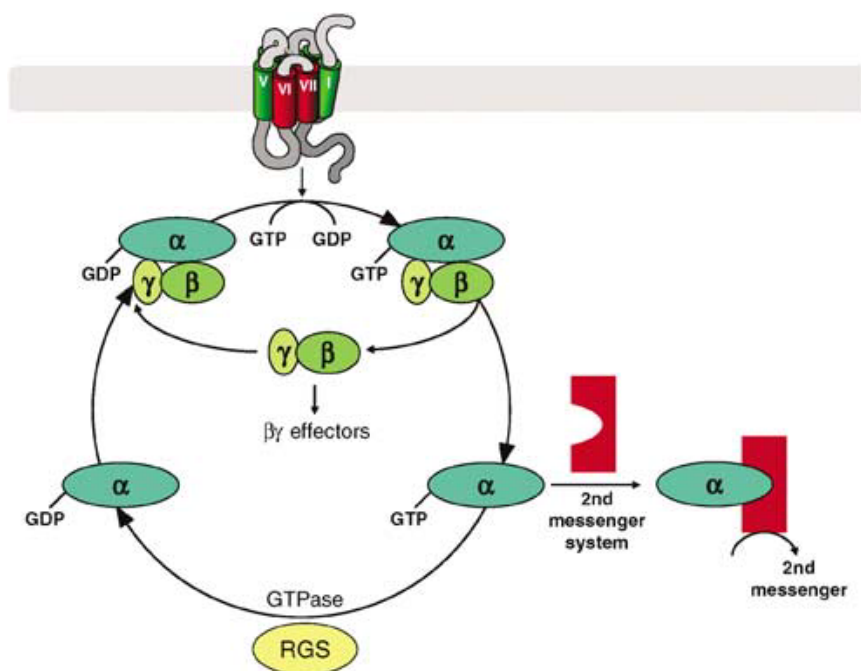


Figure 6: Le cycle d'activation de la protéine G hétérotrimérique. La conversion de la protéine G hétérotrimérique de l'état inactif (liant le GDP) à l'état actif (liant le GTP) se fait par le récepteur qui agit en tant que protéine GEF. Ensuite le domaine GTPasique de la protéine $G\alpha$ hydrolyse le GTP pour retourner à l'état inactif. L'activité GTPasique peut être accélérée par les protéines RGS et la réassociation des protéines $G\alpha$ -GDP avec les sous-unités $G\beta\gamma$ marque la fin du cycle (Milligan & Kostenis; 2006).

Ces conclusions ont notamment été validées par la cristallisation du récepteur $\beta 2$ -AR sous la forme active (Rasmussen et al ; 2011a). Cependant, les déterminants « consensus » de la spécificité à un isoforme de protéine G n'existaient pas. Ceci dépendrait du récepteur considéré et de la configuration structurale de sa poche interne (Kostenis et al ; 2005) (Wong ; 2003) (Rasmussen et al ; 2011a).

Il faut noter qu'environ 10 % des RCPG non olfactifs sont capables de coupler à G_{ai} ainsi que G_{aq} pour donner naissance à deux voies de signalisation différentes (Wong ; 2003). Cependant, on parle d'un switch moléculaire quand il s'agit d'un changement entre $G_{ai/q}$ et G_{as} , deux protéines qui régulent inversement la même voie de signalisation. Ce changement peut s'opérer suite à des modifications post-traductionnelles au niveau du récepteur. Par exemple, la phosphorylation du récepteur $\beta 2$ -AR (couplé à G_{as}) par la PKA conduit non seulement à sa désensibilisation, mais aussi à une réversion du signal par couplage de la G_{ai} (Daaka et al ; 1997). Sur ce même modèle, Hasseldine *et al.* montrent que $\beta 2$ -AR peut être pré-couplé aux deux isoformes de la protéine G, mais que la phosphorylation par la PKA déstabilise l'interaction avec la protéine G_{ai} mais pas avec la G_{as} , favorisant ainsi la signalisation dépendante de G_{ai} (Hasseldine et al; 2003).

Le switch de la protéine G peut aussi se produire dans des conditions normales ou physiopathologiques. En effet, le récepteur des prostaglandines EP2 se couple à G_{as} pour assurer la relaxation du myomètre pendant la grossesse en maintenant des taux d'AMPc élevés. A l'approche de l'accouchement, le profil d'expression des protéines G change et EP2 interagit avec G_{ai} . Ceci s'accompagne d'une mobilisation des réserves calciques intracellulaires afin de promouvoir les contractions utérines. Cette nouvelle signalisation promeut la néosynthèse du ligand d'EP2 qui agit en autocrine sur le récepteur EP2 dans un but d'accentuer les contractions du myomètre (Kandola et al ; 2013). Par ailleurs, le récepteur senseur de calcium CaR interagit avec G_{ai} dans les cellules mammaires non pathologiques et inhibe la production de PTHrP (Parathyroid Hormone-Related Protein). Dans les cellules mammaires murines immortalisées ainsi que dans la lignée humaine de cancer du sein MCF-7, CaR couple la protéine G_{as} et produit des effets inverses sur la production de PTHrP (Mamillapalli et al ; 2008).

5.5) Les modulateurs de la protéine G

5.5.1) Les protéines RGS

Les protéines RGS (Regulator of G protein signaling) sont connues pour être des régulateurs négatifs de la plupart des protéines G. Elles sont des accélérateurs moléculaires de l'activité GTPasique jusqu'à 2000 fois, conduisant à une diminution de l'amplitude du signal et à un achèvement plus rapide de la signalisation dépendante à la fois des G_{α} et des $G\beta\gamma$. Par exemple, le temps de demi-vie de l'hydrolyse du GTP est de 15 secondes pour la transducine (G_{α} de la rhodopsine) purifiée *in vitro*, mais n'est que de 100 millisecondes dans les cellules photoréceptrices *in vivo* en présence des RGS endogènes (Ross & Wilkie; 2000). De plus, il faut distinguer deux niveaux

de régulation des RGS : l'accélération de la cinétique d'hydrolyse du GTP et la précipitation de la fin de signal en diminuant l'amplitude de celui-ci. Ces deux aspects de régulation sont indépendantes l'un de l'autre (Maurice et al; 2010).

Les protéines RGS constituent une partie intégrante du modèle de RCPG à 4 partenaires (ligand/RCPG/protéine-G/RGS). Ce complexe semble stable et plusieurs études montrent que la présence de RGS augmente l'affinité de la protéine G envers le récepteur et potentialise l'activité GTPasique au sein du complexe (Benians et al; 2005) (Posner et al; 1999) (Mukhopadhyay et al; 1999). A ce titre, la protéine RGS20 co-immunoprécipite de façon constitutive avec le récepteur de la mélatonine MT₁ dans les cellules HEK293 et interagit également avec un peptide synthétique recouvrant l'hélice H8 de MT₁, interaction révélée par pull-down à partir d'un lysat de cerveau de souris (Maurice et al; 2010).

Concernant les motifs de reconnaissance, les données structurales montrent que la RGS interagit avec la protéine G principalement au niveau du domaine GTPasique pour exercer un contrôle direct et rapide sur cette poche. Un autre point d'ancrage se situe au niveau du domaine hélicoïdal de G α qui est impliqué dans les interactions protéine G-RCPG et protéine G-effecteurs. Ceci suggère un effet modulateur supplémentaire de RGS sur l'activité de la protéine G via des effets stériques au niveau de la liaison avec le récepteur et avec les effecteurs de G α (Baltoumas et al; 2013).

L'expression des RGS est régulée positivement ou négativement par la signalisation des RCPG (Burchett et al; 1999) (Taymans et al; 2005). Dans le cerveau de souris, l'ARNm de la RGS est rapidement synthétisé (pic à 0.5 heure) en réponse à l'administration de plusieurs psychostimulants hautement addictifs tels que la méthamphétamine et la cocaïne. Cet effet contribue à la réponse neuroadaptative, généralement matérialisée par une tolérance aux psychotropes. Cependant, le temps de demi-vie court des ARNm ne fait pas des RGS des modulateurs neuronaux à long terme (Ingi et al ; 1998), bien que plusieurs études suggèrent que les RGS pourraient constituer des cibles pharmacologiques intéressantes dans certaines pathologies d'actualité telles que la maladie de Parkinson, la schizophrénie, l'addiction aux drogues et les troubles circulatoires (Roman et al ; 2011) (Bosch et al ; 2012) (Traynor et al ; 2005) (Zhang et al ; 2011).

Par ailleurs, les RGS ne sont pas les seules GAP des protéines G. En effet, l'isoforme β de la PLC (Phospholipase C) est également une GAP spécifique de G α et la protéine Rho GEF (GTP exchange factor) spécifique à G α 13 (Ross & Wilkie ; 2000).

5.5.2) Les protéines AGS

C'est une famille de 10 protéines connues pour activer la protéine G de manière indépendante de la présence du récepteur. Elles ne présentent pas d'homologie de séquence entre elles, mais sont classées en trois familles selon leur mécanisme d'activation étudié chez la levure *S. cerevisiae*, l'organisme dans lequel les AGS ont été découvertes (Cismowski et al ; 1999).

Le Groupe 1 : ce groupe est représenté uniquement par AGS1 qui agit en tant qu'une guanine nucleotide exchange factor (GEF) pour Gai/o et qui potentialise la liaison du GTPys avec Gai2 (Cismowski et al ; 2000)

Le Groupe 2 comprend les AGS3, AGS5 et AGS6. Le mode d'action réside dans la stabilisation du complexe Gai/o-GDP conduisant à une activation des sous-unités Gβγ (De Vries et al ; 2000).

Le Groupe 3: Le troisième groupe comporte les autres AGS qui activent la protéine G en interagissant directement avec Gβγ (Cismowski et al ; 1999).

Par ailleurs, les AGS sont également capables d'interagir avec les GRK et les PKC entre autres (Singh et al ; 2014) (Yuan et al ; 2007). D'un point de vue physiologique, les AGS semblent réguler différentes fonctions neuronales (Tse & Wong; 2012), cardiovasculaires et métaboliques (Blumer et al ; 2008) (Blumer et al ; 2014).

6) Le Cycle de vie d'un RCPG

6.1. La néosynthèse des RCPG

La synthèse des RCPG se fait au niveau du réticulum endoplasmique (RE) rugueux qui représente le point de départ de toutes les protéines destinées à la membrane plasmique, aux voies sécrétoires ou au réseau membranaire interne. Les protéines membranaires contiennent un peptide signal d'adressage au RE qui, pour la grande majorité des RCPG est appelé un « signal d'ancrage reverse ». Le peptide naissant est pris en charge par la machinerie du translocon (canal de tétramères de Sec61 et de protéines annexes) qui permet l'insertion des différentes régions hydrophobes du récepteur dans la couche lipidique (White et al ; 2008) (Higy et al ; 2004).

En même temps que la traduction évolue, la chaîne peptidique est « protégée » par des protéines chaperonnes qui évitent les interactions spontanées entre les acides aminés, protègent des ubiquitinations et veillent au bon repliement de la protéine. Au niveau du RE se fait notamment la formation des ponts disulfures et l'addition des coiffes glucidiques immatures (Hebert et al ; 2007).

Ces protéines chaperonnes constituent le premier niveau de contrôle qualité de la néo-synthèse. Aussi, les peptides mal repliés vont subir une dégradation ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Römisch ; 200) (Fritz et al ; 2013) (Ng et al ; 2007). Cette machinerie fait participer des protéines de choc thermique (Hsp) qui sont très sensibles aux conditions physiologiques. Parmi les protéines chaperonnes, Hsp 90 paraît comme une cible pharmacologique intéressante pour moduler l'expression de plusieurs RCPG (Bergmayr et al ; 2013). Par ailleurs, il a été démontré que la dégradation ERAD est à l'origine de la régulation de la fraction des récepteurs métabotropiques GABA_BR1/2 qui est disponible pour l'adressage membranaire (Zemoura et al ; 2013). En effet, plusieurs mutants naturels de récepteurs ne passent pas le point de contrôle qualité du RE, ce qui cause

des conséquences physiologiques sévères regroupées sous le nom de maladies conformationnelles (obésité, diabète insipide, et autres). L'adressage des récepteurs mutés à la surface peut être cependant « sauvé » par des ligands lipophiles qui stabilisent et/ou corrigent la conformation des RCPG. Ces ligands (souvent des antagonistes) sont des chaperons pharmacologiques qui aident les récepteurs à s'échapper du RE et constituent ainsi une nouvelle piste pour le traitement des maladies conformationnelles (Petäjä-Repo et al ; 2013) (Janovick et al ; 2007) (Bernier et al ; 2004).

6.2) Le transport antérograde vers la surface cellulaire

Les RCPG doivent traverser successivement le compartiment intermédiaire RE-Golgi, le Golgi et le réseau trans-Golgien avant d'atteindre la surface cellulaire. Ce transport est contrebalancé par un flux rétrograde des protéines chaperonnes et des protéines anormalement repliées ou immatures.

6.2.1) Les motifs impliqués dans le transport des RCPG

Tous ces motifs sont retrouvés au niveau du domaine Cter des RCPG.

Le motif di-leucine L-L or LXL: motif important dans le trafic vers ou depuis la membrane plasmique. Il est souvent suivi d'un site de palmitoylation. Le récepteur de la vasopressine V2R présente un motif di-leucine dans l'extrémité de la partie Cter (L339, L340) qui est important pour l'adressage à la membrane et les mutants de ce motifs sont retenus au niveau du RE (Schüleïn et al ; 1998). Par ailleurs, le motif di-leucine est également responsable de l'internalisation d'autres RCPG.

Le motif FxxxFxxxF : c'est un motif conservé qui semble être un signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique. Pour les récepteurs dopaminergiques D2, muscariniques M2 et de l'angiotensine AT_{2A}R, le motif FxxxFxxxF est important pour l'interaction avec la protéine DRiP75 qui, en masquant ce motif facilite l'adressage de ces récepteurs à la membrane (Bermak et al ; 2001) (Leclerc et al ; 2002).

Le domaine basic : c'est une concentration de résidus basiques (résidus H, K et R) importants pour l'adressage membranaire du récepteur CCR5 (Venkatesan et al, 2001) et pour l'adressage spécifique vers l'axone ou vers les dendrites dans le neurone des isoformes a et b de mGluR1 (Francesconi et al ; 2002).

Il existe encore d'autres motifs impliqués dans le transport rétrograde par les molécules COPI qui intervient dans le compartiment intermédiaire RE-Golgi (RXR, KDEL, KKAA, etc) (Cunningham et al ; 2012) (Aridor et al ; 1995).

6.2.2. Les modifications post-traductionnelles

Les N-glycosylations et les palmitoylations sont les principales modifications qui interviennent dans le transport d'un récepteur. 95 % des RCPG présentent une N-glycosylation sur le résidu asparagine du motif (Asn-Xaa-Ser/Thr) qui est situé dans la boucle e2 chez plus de la moitié

des récepteurs glycosylés. La maturation des coiffes glucidiques se fait au niveau du Golgi par l'enlèvement de quatre molécules de mannose. Lanctot *et al.* ont étudié la glycosylation du récepteur AT₁ au niveau de la boucle e2 et ils ont pu montrer que cette modification est cruciale pour l'adressage membranaire du récepteur. La construction de mutants du récepteur AT₁ qui présentent les mêmes sites consensus de glycosylation, cependant transférés au niveau des boucles e1 ou e3, a permis de réunir des informations supplémentaires quant à la conséquence du positionnement de la glycosylation sur la fonctionnalité du récepteur ; ainsi, la position des glycosylations n'est pas anodine d'un point de vue fonctionnel (Lanctot et al; 2005).

La palmitoylation (également appelée S-acylation ou thioacylation) est une des principales modifications post-traductionnelles lipidiques. C'est la liaison covalente d'un palmitate (C : 16) sur un résidu cystéine par liaison thioester. La présence de l'acide gras augmente l'hydrophobicité de la protéine et favorise son ancrage à la membrane. Cette modification est dynamique avec un « turnover » rapide, ainsi un récepteur peut subir au cours de sa vie plusieurs cycles de palmitoylation/dépalmitoylation (Mouillac et al ; 1992). A ce sujet Botham *et al.* montrent que la palmitoylation du récepteur humain PAR2 stabilise la protéine et module sa sensibilité envers le ligand, l'efficacité de la signalisation MAPK et l'internalisation du récepteur (Botham et al; 2011).

Il est également à noter que plusieurs régulateurs directs des RCPG subissent à leur tour des palmitoylations dynamiques, comme les protéines G et les protéines GRK et RGS (Qanbar & Bouvier ; 2003).

6.2.3) Les interactions protéine-protéine

Les RCPG interagissent avec plusieurs protéines qui régulent leur adressage à la surface de la cellule, et la dimérisation joue également un rôle important dans ce processus. Ces notions seront détaillées dans les chapitres suivants.

Un mode alternatif de recrutement à la surface a été décrit pour les RCPG qui présentent une faible expression de surface comme les récepteurs PAR1, PAR2, D1 et μ -opioïde. Après l'activation du pool des récepteurs à la surface, la fraction intracellulaire est recrutée à la surface pour accentuer la réponse cellulaire faisant suite à la liaison du ligand. Ce mode de recrutement de récepteurs « réserve » permet un relais rapide aux récepteurs de surface qui seront rapidement désensibilisés (Achour et al 2008).

6.3) Les RCPG à la surface cellulaire

L'observation de récepteurs unitaires marqués par un fluorochrome au niveau de cellules vivantes montre que l'interaction du récepteur avec les protéines du cytosquelette régule son flux au niveau de la membrane plasmique. Tandis que le récepteur GABA_BR présente une mobilité réduite du fait de son interaction avec l'actine, les récepteurs adrénergiques β 1 et β 2 diffusent librement dans la

membrane (Calebiro et al ; 2013). De plus, la localisation de certains RCPG au niveau des radeaux lipidiques stabilise leur expression à la surface et facilite également leur internalisation. Pour le récepteur récemment désorphanisé GPR37, cette localisation intra-radeaux est promue par la présence du ligand prosaposin (Lundius et al ; 2013). D'autres RCPG comme le récepteur de la neurokinine NK1 sont localisés de façon constitutive au niveau des radeaux lipidiques (Monastyrskaya et al ; 2005). La déstabilisation de ces radeaux lipidiques altère la signalisation de plusieurs RCPG, ce qui s'explique par le fait que ces radeaux sont des plates-formes au niveau desquelles se trouvent associés plusieurs intervenants de la signalisation des RCPG (Patel et al ; 2008).

6.3.1) La désensibilisation des RCPG et les protéines GRK et β -arrestines

Selon le modèle classique de désensibilisation, les récepteurs activés par le ligand sont sélectivement phosphorylés par les kinases des RCPG (GRK) au niveau de la boucle i3 et de la partie Cter. Les résidus phosphorylés diffèrent d'un récepteur à un autre et la position des phosphorylations semble avoir des répercussions sur le devenir du récepteur.

Ces phosphorylations sont reconnues par les protéines β -arrestines qui subissent une translocation vers la membrane plasmique selon un mécanisme encore non élucidé. L'interaction des arrestines conduit au découplage de la protéine G (probablement par encombrement stérique) ce qui signe l'arrêt de la signalisation dépendante de la protéine G et le début de l'internalisation du récepteur (Maurice et al; 2011).

Les protéines GRK (G protein-coupled receptor kinase)

C'est une famille de sept protéines (GRK 1 à 7) qui affichent des distributions tissulaires différentes, les plus ubiquitaires étant les protéines GRK 2, GRK3 et GRK5 (Mushegian et al ; 2012).

D'un point de vue structurel, la cristallisation de la protéine GRK6 dans une conformation « fermée », plus proche de l'état actif montre que son domaine Nter est responsable de la phosphorylation des RCPG. Ce domaine n'est pas retrouvé chez d'autres protéines kinases, ce qui souligne le rôle unique des protéines GRK dans la reconnaissance des RCPG actifs (Boguth et al ; 2010).

La localisation cellulaire des protéines GRK est propre à chaque isoforme. Les GRK5, GRK4 et GRK6 interagissent avec les phospholipides membranaires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) et sont constitutivement localisées au niveau de la membrane cellulaire, une localisation accentuée par leur palmitoylation (Pronin et al ; 1998) (Penn et al ; 2000). Cependant, la localisation des protéines GRK2 et GRK3 est plutôt diffuse dans le cytoplasme ; et elles subissent une translocation vers la membrane suite à l'activation du récepteur. Ces protéines sont également capables de lier le PIP2, la phosphatidylserine et la cardiolipine et possèdent un domaine homologue à la Pléckstrine (PH) qui lie les sous-unités $G\beta\gamma$ de la protéine G (Pitcher et al ; 1992) (Boguth et al ; 2010).

Contrairement au dogme général, quelques études montrent que seul le couplage des protéines GRK au récepteur peut diminuer son affinité envers la protéine G et ce indépendamment de la phosphorylation et du recrutement des β -arrestines. Par exemple, Dhimi *et al.* montrent que la liaison de la protéine GRK2 sur le récepteur mutant mGluR1 (ne présentant pas de sites de phosphorylation pour les GRK) suffit pour découpler la protéine G et désensibiliser le récepteur sans recrutement des β -arrestines (Dhimi *et al.* ; 2002). De plus, dans certaines situations, les protéines GRK peuvent être constitutivement actives, c'est le cas de la protéine GRK4 lorsqu'elle est couplée au récepteur D1 (Rankin *et al.* ; 2006).

Par ailleurs, le recrutement des protéines GRK peut se faire indépendamment de l'activation de la protéine G. De cette façon, l'hétérodimère des récepteurs dopaminergiques D1-D2 peut subir une désensibilisation par la protéine GRK2 suite à la liaison du composé SKF 83822 qui n'entraîne cependant pas l'activation des récepteurs dopaminergiques et de leur protéine G (Verma *et al.* ; 2010).

La désensibilisation hétérologue

Cette désensibilisation se fait via les kinases activées par les seconds messagers : les protéines PKA et PKC. La phosphorylation hétérologue ne dépend pas de la spécificité du ligand. Ainsi, un récepteur donné peut être phosphorylé par des kinases activées lors de la cascade de signalisation d'un autre récepteur. L'exemple le plus étudié est celui de la cross-désensibilisation entre la famille des récepteurs opioïdes et des récepteurs des chimiokines (Finley *et al.* ; 2008). Par ailleurs, la désensibilisation dépendante de la PKA a été rapportée, dans différents cas, comme étant plus sensible à la concentration du ligand en comparaison à celle des protéines GRK. Ainsi, Pollok-Kopp *et al.* montrent que le récepteur humain CCR5 est la cible de phosphorylations par les protéines GRK et par PKA. En effet, la PKA phosphoryle le récepteur sur le résidu sérine 337 à une concentration de ligand cinquante fois inférieure à celle requise pour la protéine GRK qui phosphoryle la sérine 349. Cependant, la phosphorylation de la sérine 349 est plus stable que celle de la PKA. Aussi, la phosphorylation de la sérine 349 est cruciale pour le recyclage du récepteur à la surface de la cellule (Pollok-Kopp *et al.* ; 2003).

Les arrestines

La famille des arrestines comprend 4 membres : les arrestines visuelles (arrestine-1 et arrestine-2) qui sont spécifiques à la rhodopsine et les arrestines non visuelles (β -arrestine-1 et β -arrestine-2) qui présentent une expression ubiquitaire.

Les arrestines sont constituées de deux domaines nommés N et C structurés en sept feuillets bêta reliés par des boucles. Ces domaines sont liés par une région charnière plus ou moins flexible de quelques acides aminés. A l'état inactif, le domaine C est refermé sur le domaine N à l'aide de liaisons hydrophobes. L'ensemble de cette structure est maintenu par un corps polaire faisant intervenir

plusieurs interactions entre les deux domaines N et C, ainsi que les extrémités Nter et Cter (Han et al ; 2001) (Zhan et al ; 2011). La conformation active des deux β -arrestines est légèrement différente ; néanmoins, le corps polaire est déstabilisé, ce qui découvre les sites de liaison à la clathrine et à AP2 (Adaptor Protein Complex 2) situés dans le Cter. C'est ainsi que le récepteur est ramené vers un puits naissant recouvert de clathrines (Laporte et al ; 2000). De plus, l'endocytose est facilitée par la capacité des β -arrestines à lier des phosphoinositides membranaires et par le recrutement de la kinase Src qui phosphoryle la dynamine responsable de la scission des vésicules d'endocytose (Ahn et al ; 1999) (Figure 7).

Enfin, les β -arrestines sont des protéines d'échafaudage et de signalisation impliquant plusieurs partenaires de voies de signalisations variées tels que RhoA, IGF-1, MAPK, JNK3, p38, etc... (DeFea et al ; 2011) (Nobles et al ; 2007). Ces différentes interactions protéine-protéine des β -arrestines peuvent être régulées par des phénomènes de dimérisation. Ainsi, le couplage avec ERK se fait sous forme de monomères de β -arrestines et le couplage avec mdm2 (E3 ubiquitine ligase) se fait sous forme de dimère (DeFea et al ; 2011).

6.4) L'endocytose des RCPG et leur re-sensibilisation (recyclage)

Les RCPG internalisés rejoignent selon des cinétiques différentes des structures vésiculaires spécialisées soit dans la rétention intracellulaire, soit dans la dégradation ou le recyclage.

6.4.1) Les motifs d'endocytose et de recyclage

Ces motifs d'endocytose sont directement reconnus par les protéines de la machinerie de l'endocytose afin d'assurer une internalisation souvent indépendante des β -arrestines et parfois même constitutive. Les motifs reconnus par AP-2 sont (i) les motifs di-leucine DXXLL et (D/E)XXXL(L/I), le motif à base de tyrosines Yxx ψ (où ψ est un acide aminé hydrophobe) et le motif de huit arginines réparties au niveau du Cter (Marchese et al ; 2008). Il existe aussi un motif d'internalisation dans les cavéoles qui ne fait intervenir ni la clathrine, ni la dynamine. Ce motif contient des acides aminés aromatiques ϕ régulièrement espacés $\phi X\phi XXXX\phi$ et $\phi XXXX\phi XX\phi$ retrouvés au niveau des récepteurs β -adrénergiques et muscariniques entre-autres (Chini & Parenti ; 2004).

En ce qui concerne le recyclage, il n'existerait pas de motifs consensus de recyclage, mais une multitude de motifs dépendants de chaque récepteur.

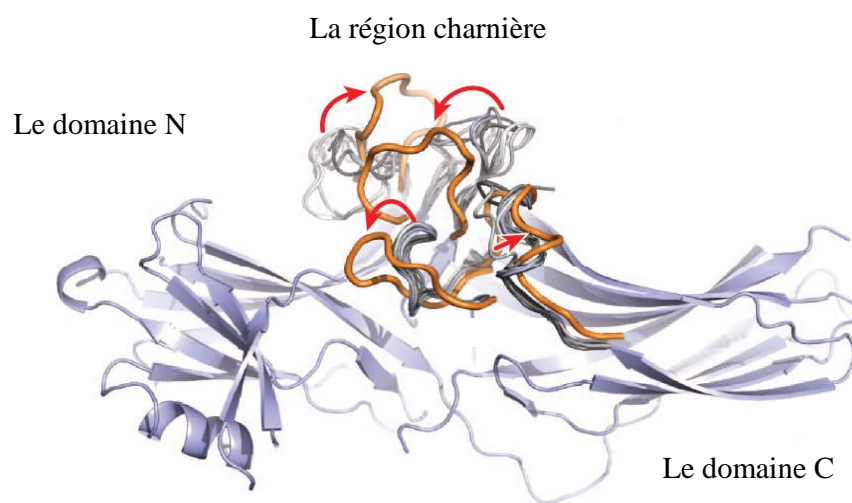


Figure 7 : Structure de la β -arrestine-1 à l'état inactif. Les domaines C et N sont reliés par une région charnière. Les mouvements de cette région sont indiqués avec les flèches rouges qui représentent la transition entre l'état inactif (en gris) et l'état actif (en orange). D'après (Shukla et al ; 2013).

6.4.2) Les modifications post-traductionnelles

Les phosphorylations

Le nombre et la position des phosphorylations définissent le devenir du récepteur (Gimenez et al ; 2012). La phosphorylation de CXCR4 par les GRK sur les résidus sérine 330, 324 et 325 sont des motifs importants pour l'ubiquitination et la dégradation lysosomale du récepteur (Marchese & Benovic ; 2001). Huit phosphorylations par la GRK2 sur le récepteur D2 assurent son recyclage à la membrane (Namkung et al ; 2009) et les phosphorylations dépendantes de PKA au niveau de $\beta 2$ -AR constituent un signal de recyclage (Vistein et al ; 2013). La phosphorylation des GRK et des arrestines est aussi importante. En effet, la protéine c-Src est connue pour avoir une dualité fonctionnelle dans la désensibilisation du récepteur $\beta 2$ -AR. Ces kinases lient directement le RCPG et phosphorylent la GRK2 qui à son tour promeut la désensibilisation de $\beta 2$ -AR (Fan et al ; 2001). Cependant c-Src est également capable de phosphoryler la β -arrestine-1, ce qui diminue son affinité avec AP-2 et résulte en une diminution de l'efficacité de l'endocytose (Marion et al ; 2007).

Les ubiquitinations / dé-ubiquitinations

L'ubiquitination est la conjugaison d'une ubiquitine (76 acides aminés) avec le récepteur, qui a lieu après la phosphorylation et avant l'internalisation de celui-ci. Ce motif est un signal « non obligatoire » de dégradation des RCPG dans le lysosome ou par le protéasome (Li et al ; 2000).

La mono- ainsi que la poly-ubiquitination sont reconnues par la machinerie ESCORT0-III, ou Alix/ESCORTIII qui redirige le récepteur vers le lysosome (Alonso & Friedman et al ; 2013) (Figure 8).

L'ubiquitination est une modification réversible par l'action des dé-ubiquitinases DUB et le sort du récepteur dépend en fait de la balance spatio-temporelle de l'ubiquitination/dé-ubiquitination : tandis que les ubiquitine-ligases favorisent la dégradation du récepteur, la liaison avec des DUB le redirige vers la voie du recyclage (Chen et al ; 2011) (Milojević et al ; 2006) (Mukai et al ; 2010). Par ailleurs, les protéines β -arrestines sont généralement requises pour réguler la dégradation du récepteur et leur état d'ubiquitination peut à son tour, influencer la signalisation et le devenir du récepteur. En effet, mdm2 est un partenaire de la β -arrestine qui possède un domaine RING. Aussi, l'ubiquitination de la β -arrestine par mdm2 est requise pour la dégradation du récepteur $\beta 2$ -AR par le protéasome (Shenoy et al ; 2001). Enfin, une étude intéressante a montré que l'ubiquitination d'un seul monomère au sein de dimères de RCPG peut suffire pour la dégradation du dimère. Cette étude montre que les récepteurs DOR (récepteur δ -opioïde) et MOR (μ -opioïde) forment un hétérodimère dans les cellules HEK293 et dans les neurones. La stimulation de DOR avec un agoniste spécifique conduit à l'ubiquitination de MOR et à la dégradation du dimère.

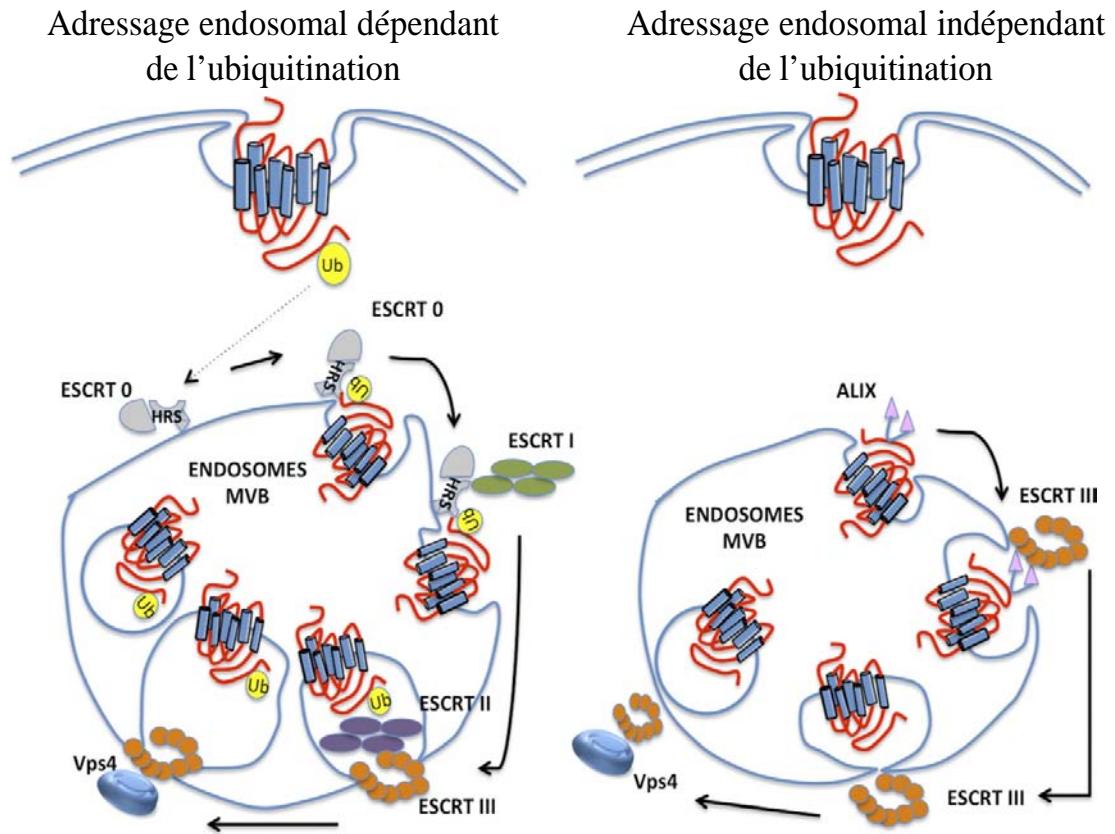


Figure 8 : Adressage endosomal dépendant et indépendant de l'ubiquitination. L'ubiquitination du RCPG entraîne la prise en charge de ce dernier par la machinerie ESCORT vers la voie de dégradation dans les lysosomes. Cependant, les RCPG non-ubiquitinylées reconnus par la protéine adaptatrice Alix peuvent également suivre la voie de la dégradation par le lysosome. D'après (Alonso & Friedman et al ; 2013).

De plus, la perturbation de l'interaction DOR/MOR par des peptides interférents les protège de la dégradation en présence du ligand de DOR et potentialise l'effet analgésique de la morphine *in vivo* (He et al ; 2011).

6.4.3) L'interaction du récepteur avec les β -arrestines

Les RCPG interagissent avec les β -arrestines de façon plus ou moins stable et avec une affinité plus ou moins importante. Partant de ce point, les RCPG sont groupés en deux classes A et B (à ne pas confondre avec la classification générale des RCPG) (Oakley et al ; 1999) (Oakley et al ; 2001).

Classe A : les récepteurs types sont les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ -AR, le récepteur μ -opioïde MOR, le récepteur à l'endothéline de type A ETA et le récepteur dopaminergique D1. Ces récepteurs affichent une affinité plus grande pour la β -arrestine-2 que pour la β -arrestine-1, mais cette interaction est transitoire et cantonnée à la surface cellulaire. De plus, l'ubiquitination de la β -arrestine n'étant pas stable, le complexe furtif récepteur-arrestine suit la voie des endosomes précoces avant d'être recyclé.

Classe B : les récepteurs les plus étudiés sont le récepteur de l'angiotensine II AT1AR, le récepteur de la vasopressine V2R, le récepteur à la neurotensine 1 et le THR (Tyrotropin-Releasing Hormone Receptor). L'affinité de ces récepteurs aux β -arrestines-1 et -2 est de même ordre. Cependant l'interaction est très stable et persiste lors de l'endocytose. Les RCPG de la classe B suivent plutôt la voie de la dégradation.

Il faut cependant noter que la classification de certains RCPG est plus complexe. En effet, le récepteur humain h5-HT_{2A} et son isoforme chez le rat partagent une forte homologie de séquence. De manière intéressante, h5-HT_{2A} contient un motif ASK au niveau du domaine Cter qui est spécifique aux primates, l'isoforme chez le rat possédant à la place le motif NCT. Cette mutation diminue l'affinité avec la β -arrestine-2 et de ce fait le récepteur humain appartient à la classe A et l'isoforme chez le rat à la classe B (Bhattacharya et al ; 2010).

CHAPITRE II : LA PHARMACOLOGIE DES RCPG

1) Introduction à la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G :

Les RCPG sont des protéines qui régulent un large éventail de processus physiologiques. De ce fait, ils constituent des cibles privilégiées pour la découverte de médicaments.

Le ciblage des RCPG par des molécules chimiques qui interagissent avec la poche de liaison du ligand endogène a largement été investi. Cependant, les récentes découvertes décrivant une conformation versatile du récepteur et une relation étroite entre sa structure et sa fonction lancent le challenge de pouvoir générer de nouvelles entités pharmacologiques capables de stabiliser le récepteur sous une conformation donnée afin d'induire l'effet souhaité. Ces molécules sont nommées ligands biaisés. Un autre challenge réside dans le fait de pouvoir moduler la pharmacologie du récepteur avec des molécules qui ciblent un site autre que le site orthostérique du ligand endogène. Ces molécules, appelées modulateurs allostériques, sont capables d'interagir avec des domaines extracellulaires, transmembranaires ou intracellulaires du récepteur. Sachant que les médicaments mis sur le marché sont des ligands orthostériques, on comprend que le développement des ligands allostériques constitue un nouveau champ d'investigation pour la découverte de nouvelles molécules à développer en recherche clinique. Par ailleurs, les interactions protéine-protéine sont un autre aspect de régulation des RCPG qui commence sérieusement à intéresser les pharmacologues. En effet, pouvoir moduler la signalisation d'un récepteur par plusieurs protéines présente autant d'opportunités de cibles pharmacologiques. Le réseau protéique associé au récepteur s'appelle le complexe d'interaction ou GIP pour (GPCR Interacting Partners). Cette boule à facette dynamique régule le signal du récepteur non seulement à la surface, mais également dans les compartiments intracellulaires. La régulation par les GIP est aussi effective lors de la synthèse et durant le trafic du récepteur associé, ce qui en quelques sortes régule la disponibilité du récepteur et donc sa pharmacologie à un niveau de considération plus général. Dans ce contexte, la dimérisation entre RCPG est de loin la plus intéressante des interactions protéiques. Ces complexes peuvent présenter une signature pharmacologique différente de celle des monomères respectifs et sont donc une piste de médication à considérer absolument.

Tous ces aspects de la pharmacologie du RCPG seront développés dans ce chapitre regroupant, entre-autres, le mécanisme d'activation des RCPG ainsi que la régulation de leur signalisation par des phénomènes de dimérisation et par les partenaires d'interactions GIP.

2) Le mécanisme d'activation des RCPG

2.1) A la recherche d'un modèle mathématique qui décrit le mécanisme d'activation des RCPG

Très tôt après la découverte des RCPG, la volonté des premiers pharmacologues à prédire les effets des molécules actives sur les tissus les avait poussés à développer des modèles mathématiques : *“The general aim...has been to determine the extent to which the effects produced by drugs on cells can be interpreted as processes following known laws of physical chemistry “* (Clark; 1937).

Le RCPG a longtemps été considéré comme un interrupteur moléculaire (activer/inhiber) et ce schéma incomplet a donné naissance à des modèles rudimentaires sans qu'aucun ne convienne à décrire le mécanisme d'activation des RCPG dans sa globalité. Ces modèles, en commençant par le plus ancien sont : le complexe ternaire très basique, le complexe ternaire étendu qui tient compte de l'activité constitutive des RCPG et le complexe cubique faisant intervenir la protéine G comme partie intégrante de l'unité fonctionnelle minimale (Weiss et al ; 1996). Cependant, bien que non précis, le modèle cubique a quand même servi à prédire l'existence d'agoniste proté¹, et ce avant sa découverte expérimentale pour le récepteur β 2-AR (Kenakin et al ; 1995) (Chidiac et al ; 1996).

A l'état actuel des connaissances, le fonctionnement d'un RCPG fait intervenir le ligand soluble, le récepteur lui-même, la protéine G hétérotrimérique et un ou plusieurs effecteurs. Le récepteur peut également médier une réponse indépendante de la protéine G qui met en jeu d'autres protéines de signalisation telles que les β -arrestines. Il est également désensibilisé, internalisé et est capable de former des dimères et des complexes avec de nombreuses protéines régulatrices.

Afin de pouvoir tenir compte de ces aspects multiples, tout tend à valider un nouveau modèle d'activation basé sur les probabilités. L'activité pharmacologique d'un récepteur selon ce modèle est définie par une multitude de conformations actives qu'il peut adopter. De toutes ces conformations, le ligand en stabiliserait une « ou plusieurs ». Les études du récepteur β 2-AR par FLA (Fluorescence Lifetime Analysis) montrent que le domaine de la liaison de la protéine G au niveau du récepteur est en continuelle oscillation autour d'une conformation donnée. La liaison d'un antagoniste ne change pas cette conformation, mais restreindrait l'amplitude des mouvements oscillatoires. Cependant, l'activation par l'agoniste plein stabilise deux configurations du domaine de liaison de la protéine G, suggérant la coexistence de deux populations actives de ce récepteur (Ghanouni et al ; 2001)

¹ Agoniste proté : agoniste pour les récepteurs sans activité constitutive, et agoniste inverse pour les récepteurs possédant une activité constitutive.

Cette représentation versatile du RCPG est notamment tout à fait adaptée pour décrire le mode d'action des antagonistes biaisés (Rajagopal et al ; 2011) ainsi que l'existence de différentes conformations des récepteurs présentant des sites de basse et de haute affinité pour le ligand.

L'activité constitutive des RCPG

L'observation d'une activité constitutive pour certains RCPG résiderait dans le fait que la différence énergétique entre les états actifs et inactifs soit assez petite pour permettre à une sous-population de récepteurs d'adopter une conformation active pendant l'oscillation. Ce qui se traduirait par une faculté de signalisation en l'absence de ligand. La liaison du ligand creuserait le delta énergétique entre les deux états actif et inactif et augmenterait la proportion des récepteurs actifs (Rosenbaum et al ; 2011).

2.2) Les différences conformationnelles entre l'état actif et l'état inactif du RCPG

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour définir un mode général d'activation des RCPG. Cependant, la diversité du positionnement de la poche de liaison du ligand laisserait présager qu'une généralisation du mécanisme ne serait pas pertinente.

Au moins pour la classe A des rhodopsines, les expériences de cross-link², de chélation³, de mutagenèse à grande échelle au niveau des récepteurs et des ligands, ont conjointement permis d'observer un mouvement des domaines TM5 et TM6 lors de l'activation du récepteur (Farrens et al ; 1996) (Sheikh et al ; 1996) (Wieland et al ; 1996). Plus tard, ces résultats ont été confirmés par des données de cristallographie.

Les RCPG sont des molécules transmembranaires hydrophobes. Il aura fallu plusieurs années pour contourner les difficultés à cristalliser ces protéines. Il a notamment été nécessaire de trouver le moyen de stabiliser ou de remplacer la boucle i3 (Rasmussen et al ; 2007) (Chien et al ; 2010), de générer des mutants thermostables pour résister aux conditions de la cristallisation (Lebon et al ; 2011), d'optimiser les conditions de solubilisation, de surexpression, de reconstitution dans des phases lipidiques et même de muter les résidus cibles de modifications post-traductionnelles. L'ensemble de ces efforts ont finalement permis d'aboutir à la résolution des structures de plusieurs récepteurs à l'état inactif à partir des années 2000.

² *Cross-link* : insertion de cystéines au sein du récepteur de manière à former des pont-disulfures.

³ *Chélation* : insertion de lysines qui forment des liaisons et chélatent les ions métalliques au sein des récepteurs et bloquent le mouvement des TM.

Pour ce qui est de la conformation active, la résolution de la cristallisation de β 2-AR lié de manière covalente à un ligand ressemble à la structure inactive notamment au niveau du domaine cytoplasmique (Rosenbaum et al ; 2011). Ce n'est qu'en présence d'un agoniste et du fragment protéique appelé Nb80 que la première cristallisation d'un récepteur à l'état actif a pu aboutir. Nb80 est un fragment d'anticorps de Lama appelé Nanobody du fait de son petit poids moléculaire. Ce nanobody stabilise la partie interne du β -AR actif de manière à mimer les interactions de la protéine Gs avec le récepteur (Rasmussen, et al ; 2011b). Ce fut alors la première cristallisation d'un récepteur dans son état actif, autre que la rhodopsine (Figure 9).

La structure du β 2-AR actif ressemble à celle de la rhodopsine active. Les TM5 et TM6 basculent de 5 à 6 Å vers l'extérieur du récepteur par rapport au TM3. Cependant, les changements au niveau de la poche de liaison paraissent rédhitoires face à une restructuration plus importante de l'espace interne. Ceci laisse à penser qu'en dépit des différences structurelles notoires entre les ligands, l'activation des RCPG n'entraîne pas de changements conséquents au niveau de l'espace externe. Il s'opérerait plus tôt un réarrangement des TM de façon assez similaire entre les récepteurs probablement pour pouvoir activer le même set de protéines G.

Les nanobodies sont générés par le Lama en réponse à une immunisation par les RCPG. L'avantage de ce système réside dans le fait de pouvoir stabiliser et cristalliser différentes conformations d'un même récepteur, correspondant à différents états d'activation de celui-ci (Staus et al ; 2014). Aussi, cet exploit technique est applicable au reste des RCPG et permettrait de résoudre la structure de plusieurs récepteurs dans les années à venir.

La dynamique d'activation des RCPG

Les principales techniques qui nous renseignent sur la dynamique d'activation des RCPG sont (i) la modélisation moléculaire dynamique conjointe avec la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et les données de cristallisation, et (ii) la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) intramoléculaire (Rosenbaum et al ; 2011) (Villardaga et al ; 2003) (Figure 10).

La dynamique d'activation diffère bien entendu d'un récepteur à un autre et dépend de la durée de la stimulation ainsi que de la concentration du ligand. Plus la concentration de l'agoniste est importante, moins il faut du temps pour stimuler le récepteur ; par là même, plus le temps de stimulation est court, moindre sera l'efficacité du ligand. Par exemple, il suffit d'environ une seconde d'exposition au ligand pour stimuler le récepteur α (2A)-AR à des concentrations pharmacologiques, mais d'environ 40 millisecondes seulement à de très fortes doses de ligand (Ambrosio et al ; 2012).

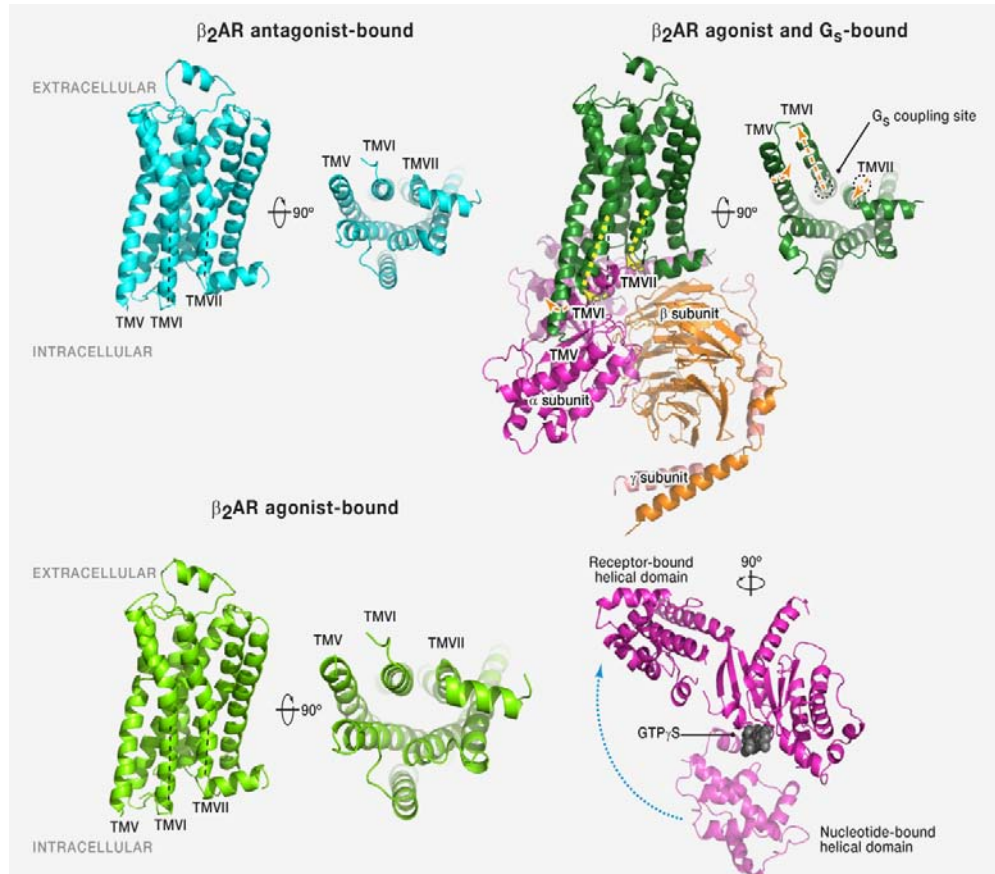


Figure 9 : La conformation active d'un RCPG nécessite la présence de la protéine G et de l'agoniste. Les structure du récepteur β_2 -AR qui lient l'agoniste ou l'antagoniste sont semblables. Noter l'alignement parallèle des TM3 et TM6. La conformation active n'est stabilisée qu'en présence de l'agoniste et de la protéine G hétérotrimérique. Noter les mouvements des TM3, TM5 et TM6 lors de l'activation (Audet et al ; 2012).

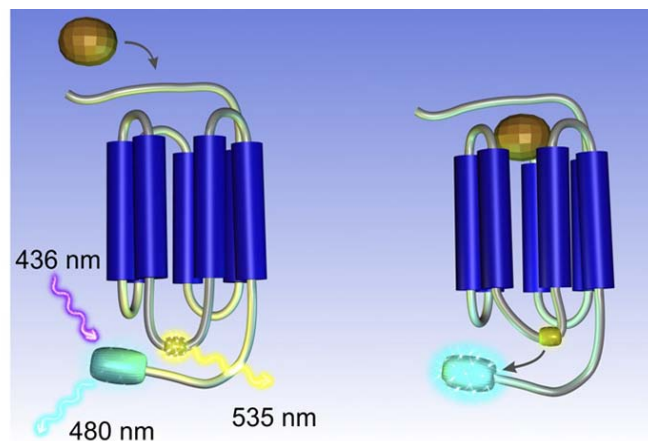


Figure 10 : Principe du senseur d'activation des RCPG par FRET (FRET intramoléculeire). Le récepteur d'intérêt est fusionné à un donneur et à un accepteur d'énergie représentés par différents variants de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le transfert d'énergie est déclenché par une onde d'excitation de la GFP donneur qui transmet l'énergie à une GFP accepteur. L'activation du RCPG entraîne un changement de conformation qui rapproche les protéines fluorescentes et permet le transfert d'énergie (Lohse et al ; 2012).

La même technique de transfert d'énergie peut être utilisée dans le but d'étudier la dimérisation des RCPG en utilisant deux récepteurs de fusion ou deux anticorps couplés à un donneur et à un accepteur d'énergie, qui sont dirigés contre deux récepteurs d'intérêt.

Par ailleurs, il faut au minimum une seconde pour activer le récepteur hormonal PTHR à de fortes doses de ligand (versus 40ms pour le récepteur $\alpha(2A)$ -AR). A ce jeu, la rhodopsine est de loin le récepteur le plus rapidement activable, sans doute du fait de son précouplage avec le rétinol et par une simple activation par les photons. En effet, il suffit de moins de 1 ms pour activer la rhodopsine qui est capable de coupler 1000 protéines G par seconde (Lohse et al ; 2012 & 2014).

3) La régulation de la signalisation des RCPG par des molécules pharmacologiques

Nous venons de voir que les RCPG oscillent entre différentes conformations et chaque conformation est potentiellement génératrice d'une signalisation donnée. Pour certains RCPG au repos, le cumul des signalisations engendrées par cette versatilité spontanée détermine l'activité constitutive du récepteur. De plus, le déplacement d'un récepteur vers une conformation donnée est médiée pharmacologiquement par de petites molécules, qui sont classés en fonction de leur effet sur la signalisation du RCPG. Les définitions relatives ci-après reprennent les termes de la classification établie par « the International Union of Pharmacology » (Neubig et al ; 2003).

Les agonistes : ce sont des molécules qui activent le récepteur. La réponse est maximale pour les agonistes pleins et est de moindre amplitude pour les agonistes dits partiels. Du fait de l'activité excessive des agonistes pleins, leur administration s'accompagne souvent d'effets indésirables qui peuvent être évités avec des agonistes partiels (Wu et al ; 2013)

Les agonistes inverses : ils concernent les récepteurs ayant une activité constitutive. Ces ligands diminuent la fraction des récepteurs ayant adopté une conformation proche de l'état actif et diminuent l'activité intrinsèque du récepteur. Pour la rhodopsine, le rétinol est considéré comme agoniste inverse naturel.

Les antagonistes : ce sont des molécules sans activité propre. Ils affichent la même affinité pour les conformations actives ou inactives du récepteur et diminuent l'effet d'autres molécules par compétition au niveau du même site orthostérique.

- Les ligands peuvent également interagir avec les RCPG au niveau de sites alternatifs de ceux ciblés par les ligands endogènes.

Les ligands allostériques : contrairement aux ligands orthostériques, les ligands allostériques se lient ailleurs que dans la poche de liaison du ligand endogène. Selon leur activité, on peut distinguer : (i) les agonistes allostériques activateurs qui produisent un effet agoniste activateur en se fixant sur un site de reconnaissance allostérique, (ii) les ligands allostériques neutres pour lesquels la liaison sur le site allostérique n'a pas d'incidence sur la liaison d'autres molécules sur le site orthostérique (iii) les

modulateurs allostériques positifs dont l'interaction avec le récepteur est sans effet, même s'ils augmentent l'affinité et/ou l'efficacité des molécules qui se fixent sur le site orthostérique, (iv) les modulateurs allostériques négatifs qui de la même manière n'ont pas d'effet propre, mais diminuent l'affinité et/ou l'efficacité du ligand orthostérique.

Il est à noter que quelques ligands allostériques sont en développement clinique à l'heure actuelle. Ces molécules offrent de réels avantages quant à leur spécificité pour RCPG en ciblant un site de reconnaissance non conservé contrairement aux poches de liaison souvent similaires entre deux isoformes du même récepteur. Ces nouvelles entités pharmacologiques présentent donc un réel avantage dans la mesure où elles pourraient permettre de s'affranchir des effets secondaires liés au ciblage des sites orthostériques.

4) La compartimentation de la signalisation des RCPG

L'activation d'un RCPG engendre une signalisation via les protéines G et les effecteurs membranaires, en concomitance avec la propagation des protéines $G\beta\gamma$ et des seconds messagers. S'en suit alors une désensibilisation rapide du récepteur pour marquer l'arrêt du signal de la protéine G à la membrane. Le ligand est quant à lui soit relargué dans le milieu externe, soit internalisé avec le récepteur. En suite la signalisation intracellulaire commence alors (Drake et al ; 2006).

En ce qui concerne la signalisation intracellulaire dépendante des β -arrestines, les expériences de surexpression d'un mutant dominant négatif de la dynamine montrent qu'il abroge le signal de la voie MAPK après l'activation du récepteur β 2-AR ; ces travaux ont constitué la première étude ayant souligné le rôle de l'endocytose dans la signalisation des RCPG (Daaka et al ; 1998).

De plus, nous avons pu voir que la classe B des RCPG (à ne pas confondre avec la classification générale des RCPG) interagit avec une forte affinité avec la β -arrestine. Les deux protéines sont co-localisées dans les endosomes et la durée de la signalisation par la voie MAPK est prolongée par rapport à celle des RCPG de la classe A (Tohgo et al ; 2003). Cette signalisation soutenue est liée au fait que les β -arrestines sont des protéines d'échafaudage pour les kinases de la voie MAPK. Les β -arrestines lient également les protéines c-Src qui activent la voie Ras, Raf, MEK, ERK1/2. Cette co-localisation est facilitée par le fait que les endosomes sont des compartiments privilégiés pour la présence des protéines de la voie MAPK (Teis et al ; 2002).

Par ailleurs et hormis les différences d'affinité des RCPG envers les β -arrestines-1 et -2, un même RCPG peut avoir recours aux deux isoformes d'arrestine pour réguler sa signalisation. Le premier exemple a été donné par l'équipe de Lefkowitz au sujet du récepteur AT_{A1} dans les cellules HEK293. Les auteurs montrent que la β -arrestine-2 active la signalisation ERK1/2 tandis que la β -arrestine-1 l'inhibe. Ils suggèrent que la régulation de l'expression cellulaire d'une arrestine ou de

l'autre est à l'origine d'une régulation spatio-temporelle de la signalisation des RCPG. Ce phénomène a été nommé « la régulation réciproque entre arrestines » et a été vérifié par la suite pour le récepteur GPR54 entre autres (Ahn et al ; 2004b) (Szereszewski et al ; 2010).

Un autre aspect de régulation spatio-temporelle et transcriptionnelle de la signalisation des RCPG réside dans le fait que les ERK1/2 phosphorylés se transloquent généralement dans le noyau. A noter que pour certains récepteurs comme PAR2, le contingent P-ERK1/2 dépendant des β -arrestines reste dans le cytosol, tandis que les ERK activés par la protéine G sont localisés dans le noyau (Defea et al ; 2008).

Revenons à la réponse dépendante de la protéine G. Assez récemment, Slessareva *et al.* ont montré que l'activation du RCPG de levure Ste2 donne lieu à une signalisation endosomale. La levure n'exprimant pas d'arrestines, cette activité kinase observée dans l'endosome a donc été directement attribuée à la protéine G (Slessareva et al ; 2006). Depuis, quelques publications intéressantes ont confirmé que certains RCPG peuvent présenter une signalisation endosomale par la protéine G. C'est le cas du récepteur de l'hormone parathyroïde PTHR (Ferrandon et al ; 2009) le récepteur THR (thyroid-stimulating hormone) (Calebiro et al ; 2010) (Werthmann et al ; 2012), le récepteur D1 (Kotowski et al ; 2011) et le récepteur sphingosine-1-phosphate S1P1 (Mullershausen et al ; 2009). Toutes ces études soulignent le fait que ce mode de signalisation nécessite l'internalisation d'un complexe stable agoniste/récepteur/protéine G et dépend de la conformation active du récepteur. Cette conformation est dictée par l'agoniste et a la propriété d'être très affine pour la protéine G.

Toujours au sujet de la compartimentation de la signalisation des RCPG, l'équipe d'Aylin Hanyaloglu vient de mettre en évidence un nouveau compartiment cellulaire intéressant du point de vue de la régulation du signal : le pré-endosome précoce (the Pre-Early Endosome ou pre-EE). L'équipe a montré que les récepteurs LHR (Luteinizing Hormone Receptor), le récepteur FSHR (Folliculo Stimulating Hormone receptor) et β 1-AR interagissent avec la protéine à domaines PDZ GIPC. Par le biais de cette protéine, les récepteurs transitent vers le compartiment pre-EE en médiant une signalisation ERK soutenue et prolongée dans le temps. Cette signalisation est dépendante de l'interaction des récepteurs avec GIPC à partir des puits recouverts de clathrine et la perturbation de l'adressage au pre-EE interrompt la signalisation ERK. Cependant, il est dommage que les auteurs n'aient pas discuté les rôles des protéines G et des β -arrestines dans la description de ce nouveau phénomène (Jean-Alphonse et al; 2014).

En définitive, les deux voies de signalisation par les protéines G et par les β -arrestines peuvent être distinctement activées l'une indépendamment de l'autre par des molécules pharmacologiques qui stabilisent le récepteur dans une conformation favorable à l'activation d'une des deux voies. Ces

molécules sont des agonistes biaisés : ils agissent comme des agonistes au niveau d'une voie et comme des antagonistes au niveau de l'autre voie. Ce sont là les bases structurelles de la signalisation biaisée. Pour plus de détails cf (Benleulmi-Chaachoua et al ; 2013).

La Signalisation atypique à parti du Golgi et du noyau:

Le récepteur KDEL-R est un RCPG nouvellement découvert qui transite entre le RE et Golgi. Il reconnaît des protéines chaperonnes exprimant les acides aminés KDEL (le ligand du récepteur) au niveau de leur domaine Cter. KDEL-R est responsable du trafic des protéines chaperonnes à partir de Golgi vers le RE. Plusieurs études montrent que l'activation du récepteur par l'interaction des protéines chaperonnes initie une signalisation Gq et une cascade de phosphorylations qui se terminent par l'activation des kinases Src et par l'accélération du transport entre le Golgi et le RE (Cancino et al; 2013).

Quelques RCPG comme le récepteur de l'angiotensine1, CCR2 et CCR4 contiennent un signal de translocation nucléaire. Don-Salu-Hewage *et al.* montrent que le récepteur CXCR4 se transloque dans le noyau tout en étant capable de provoquer une activation de la protéine G et un signal calcique nucléaire en situation pathologique dans une lignée de cancer de la prostate (Don-Salu-Hewage et al; 2013).

LA DIMERISATION DES RCPG

1) Les RCPG : seuls, en couple, ou à plusieurs ?

La question concernant la dimérisation des RCPG s'est longtemps posée, notamment pour savoir si l'observation des dimères n'est pas un artéfact lié aux conditions d'expérimentation et également pour savoir si les RCPG dimérisent *in vivo*, pourquoi ils dimérisent, est-ce que l'état de dimère est stable et quelles sont les conséquences fonctionnelles de la dimérisation sur la signalisation des récepteurs. Nous considérons aujourd'hui que la place des dimères n'est plus à faire. Parfois les dimères sont stables et constitutifs, et d'autres fois ils sont furtifs. Les complexes peuvent se former très tôt dès la synthèse des récepteurs, mais peuvent tout aussi bien être modulés au cours du cycle de vie des RCPG.

2) Le RCPG dans tous ses états

Près de 40 années auparavant, la rhodopsine a été caractérisée comme un monomère fonctionnel qui lie la protéine Gt avec une stœchiométrie de un pour un (1 : 1) et cet état monomérique a été montré être suffisant pour la transduction du signal (Vuong et al ; 1984) (Bornancin et al ; 1989). La rhodopsine étant le « modèle » de RCPG, on considérait alors que tous les RCPG se trouvent sous formes monomériques.

Il faut savoir que les techniques majeures ayant amené à la conclusion que « la rhodopsine est un monomère » sont l'utilisation de la technique du « photobleaching » (Poo et al ; 1974), des mesures de dichroïsme circulaire (Downer et al ; 1985), ainsi que des expériences de cross-link et de solubilisation dans différents détergents suivies par des analyses en SDS-PAGE (Downer et al ; 1985b) (Osborne et al ; 1974). Toutes ces techniques ont montré qu'environ 10 à 20 % des rhodopsines forment des dimères ; mais ces observations ont été aussitôt discréditées. En ce qui concerne le photobleaching, les mesures de dichroïsme circulaire et le cross-link, on considérait que le flux latéral des récepteurs était trop rapide par rapport à ce que l'on s'attendrait pour un dimère. L'observation de formations monomériques est, somme toute jugée transitoire et correspondrait à des collisions randomisées. En plus, le détergent peut causer la précipitation des protéines pouvant conduire à l'observation de complexes artéfactuels par SDS-PAGE.

Pourtant, à la même époque, plusieurs études faites sur des récepteurs non-RCPG et sur des canaux avaient suggéré que les protéines transmembranaires ont tendance à interagir ensemble (Klingenberg et al ; 1981). De plus, le laboratoire de Lefkowitz a été le premier à découvrir un effet

fonctionnel de la dimérisation en 1976 avec des études de liaison de ligands radioactifs. Les auteurs avaient alors relaté l'observation d'une interaction « site-site » entre les récepteurs β_2 -AR qui se traduit par une coopérativité négative entre les récepteurs. Cette coopérativité négative est matérialisée par la diminution du nombre de sites de liaison au fur et à mesure que la concentration des récepteurs augmente dans l'échantillon analysé (Limbird et al ; 1976).

Le premier exemple d'hétérodimérisation entre RCPG est le complexe des deux isomères du récepteur métabotropique de l'acide γ -aminobutyrique GABA_BR1 et GABA_BR2. Très vite après le clonage de GABA_BR1, les études fonctionnelles montrent qu'il est complètement inactif pour la réponse au ligand du fait de sa rétention au niveau du RE (Couve et al ; 1998). Par la suite, le test du double hybride a révélé l'interaction de GABA_BR1 avec un deuxième récepteur partageant 45 % d'identité de séquence qui a été désigné comme l'isomère GABA_BR2 (White et al ; 1998). Tandis que GABA_BR1 contient le site de liaison du ligand au niveau de l'extrémité Nter, GABA_BR2 est indispensable pour la liaison de la protéine G et pour l'adressage membranaire de GABA_BR1. GABA_BR2 agirait notamment en masquant le motif de rétention RXR de GABA_BR1 dans le RE (Robbins et al ; 2001) (Galvez et al; 2000) (Havlickova et al; 2002) (Margeta-Mitrovic et al ; 2000). En plus de cette complémentation fonctionnelle, les dimères de GABA_BR ne sont pas inertes. En effet, l'étude des récepteurs chimériques a permis à Galvez *et al.* de montrer l'existence d'un effet allostérique positif et réciproque entre les deux isomères du récepteur, conduisant à la potentialisation de la signalisation du dimère (Galvez et al; 2001).

Tout comme le récepteur GABA_B, une dimérisation constitutive a été validée pour plusieurs isotypes des récepteurs du glutamate mGluR. Ces récepteurs appartiennent à la classe C (Glutamate-like) et leur dimérisation est stable (Romano et al ; 2001).

Pour ce qui est des récepteurs de la classe A, la question quant à la formation des dimères est plus nuancée. En effet, la rhodopsine a été cristallisée en 2000 sous forme de monomères (Palczewski et al ; 2000). Ensuite, la même équipe a publié une image de microscopie à force atomique qui montre un arrangement des protomères de la rhodopsine en dimères (Fotiadis et al ; 2003) (Liang et al ; 2003). Puis, ce même récepteur a été cristallisé sous forme d'oligomères (sous certaines conditions expérimentales) (Salom et al ; 2006).

A l'égard de toutes ces observations, une explication de « juste-milieu » a été apportée pour les récepteurs de la classe A. L'observation par TIRF-M (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) des protéines à la surface de la cellule, montre que le récepteur muscarinique M1 existe sous forme monomérique et sous forme dimérique ; et que ces deux formes coexistent en équilibre (Hern et al ; 2010). De même, la technique de SFMI « Single Fluorescent Molecule Imaging » a permis de suivre les récepteurs FPR (*N*-Formyl Peptide) à l'échelle du récepteur unique. Ce récepteur aussi existerait sous forme de monomères et de dimères en équilibre, mais avec une tendance pour la

forme monomérique (Kasai et al ; 2011). Enfin, l'étude du flux latéral du récepteur $\beta 2$ -AR indique que les monomères se rencontrent, dimérisent et se dissocient continuellement. Aussi, l'état d'association dure près de 5 secondes seulement, mais dépasse largement la durée des collisions aléatoires des protéines transmembranaires à la surface cellulaire (Calebiro et al ; 2013).

Outre les monomères et les dimères, certains récepteurs sont capables de former des complexes faisant intervenir d'avantage de protomères pour ainsi former des oligomères. D'un côté, le récepteur GABA_BR forme des tétramères (Comps-Agrar et al; 2011), le récepteur α (1b)-AR forme des oligomères plutôt que des dimères (Lopez-Gimenez et al ; 2007) et le récepteur muscarinique M3 s'exprime à la surface de la cellule avec différents niveaux d'oligomérisation : on peut ainsi trouver des dimères, des tétramères, des quadrimères, etc...(Patowary et al ; 2013). D'un autre côté, il peut exister des complexes formés par des récepteurs différents : par exemple, les récepteurs adénosine A2A, dopamine D2, et le récepteur canabinoïde CB1 sont capables d'interagir dans les cellules vivantes (Carriba et al ; 2008). De même, les récepteurs du glutamate mGlu5R, dopamine D2 et adénosine A2AR forment des oligo-hétéromères dans le striatum de rat (Cabello et al ; 2009).

3) L'interface de dimérisation entre les RCPG

L'interface entre les dimères dépend des récepteurs, des ligands et des traitements physiques subis par les protéines au cours de l'expérimentation.

Le dimère du récepteur D2 présente une interface symétrique entre les monomères qui engage le TM4 (Guo et al ; 2003). La structure des récepteurs CXCR4 en présence d'un antagoniste montre une organisation symétrique des monomères avec une interface de dimérisation impliquant les TM5 et TM6 (Wu et al ; 2010). Par contre, les récepteurs μ -opioïdes MOR cristallisés en présence d'un antagoniste montrent deux interfaces de dimérisation au sein d'un quadrimère : TM5 et TM6 d'un côté et TM1, TM2 et H8 de l'autre (Manglik et al ; 2012). Concernant la rhodopsine, les rangées de dimères observées par microscopie à force atomique indiquent que l'interface est constituée par la boucle i3 d'un récepteur avec le TM4 et le TM5 du récepteur adjacent (Liang et al ; 2003). La même équipe a ensuite réussi à cristalliser des complexes oligomériques de rhodopsine qui interagissent par les TM1, TM2 et H8 (Salom et al ; 2006). De même pour le récepteur $\beta 1$ -AR pour lequel plusieurs interfaces ont été identifiées, dont le TM4, TM5 et la boucle i2 (Huang et al ; 2013) (Lopez-Gimenez et al ; 2007).

De manière intéressante, ces différentes interfaces sont dictées par l'état d'activation du récepteur et par le ligand et elles ont la propriété de ne pas présenter la même surface de contact entre les RCPG (Figure 11). De ce fait, les interactions entre les récepteurs sont plus ou moins « intimes ». A ce sujet, la dimérisation faisant intervenir les TM1/2 et H8 du récepteur $\beta 1$ et $\beta 2$ -AR serait plus stable que celle faisant intervenir les autres interfaces (Johnston et al; 2012).

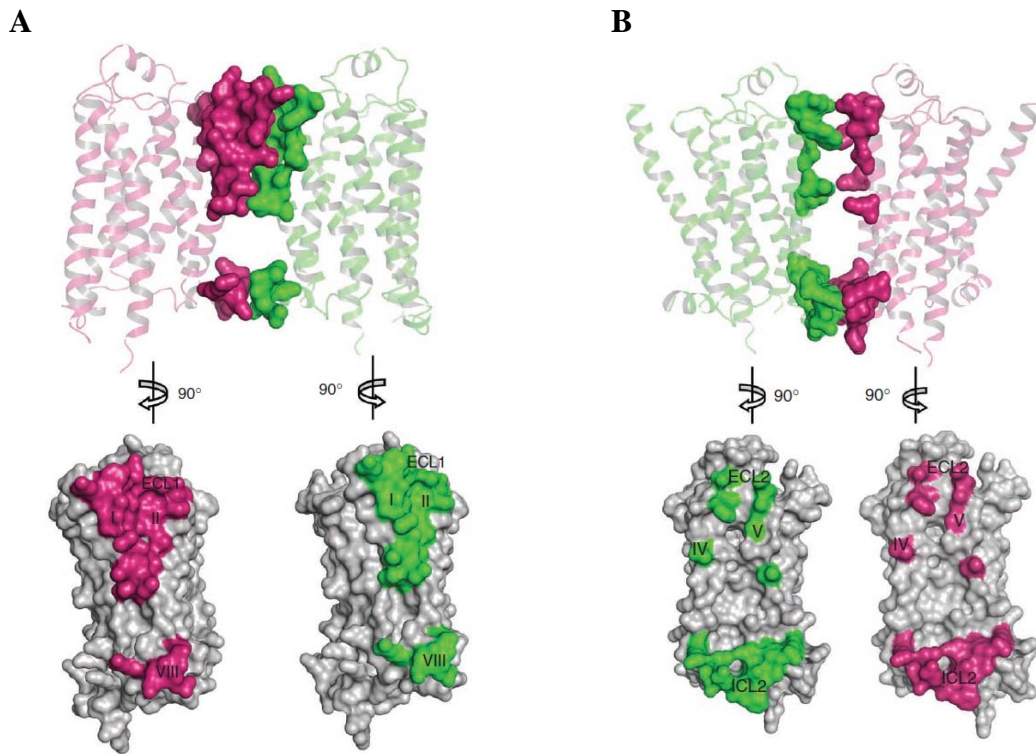


Figure 11 : Les différentes interfaces de dimérisation entre les protomères du récepteur β1-AR.
 A) Dimérisation entre deux protomères impliquant l'hélice 8 VIII et la boucle extracellulaire1 (ECL1).
 B) Dimérisation impliquant la boucle intracellulaire2 (ICL2) les domaines transmembranaires (IV) et (V) ainsi que la boucle extracellulaire 2 (ECL2). Adapté à partir de (Huang et al ; 2013). Noter que les deux interfaces de dimérisation présentent des zones de contacts différentes et définissent des surfaces internes variables selon l'interaction. Les espaces internes délimités par deux protomères peuvent prédéfinir l'interaction avec les partenaires cellulaires et l'asymétrie de couplage pour le dimère de RCPG.

Par ailleurs, les différentes configurations d'interfaces décrivent chacune un espace interne différent entre les monomères : plus l'interaction est serrée, plus la poche interne est petite (Manglik et al ; 2012) et cet espace définit (en partie) la stœchiométrie vis à vis des protéines régulatrices intracellulaires.

4) Stœchiométrie RCPG-partenaires et asymétrie de couplage

La face cytoplasmique d'un RCPG mesure environ 45 Å et cet espace est sujet à débat pour savoir si il est suffisant ou non pour coupler la protéine G (Park et al ; 2004) (Chabre et al ; 2005). Les études faites sur le récepteur leukotriène BL1 et le récepteur de la dopamine D2 montrent que ces deux récepteurs affichent une stœchiométrie (2 : 1) pour l'interaction avec la protéine G (Banères et al; 2003) (Han et al ; 2009) et la liaison du ligand au niveau de dimère BL1 sur un seul des monomères suffit pour activer le dimère. De plus, la protéine G ne lie pas de la même manière les deux récepteurs : tandis que le protomère qui lie le ligand est activé, la protéine G exerce des contraintes stériques sur le second protomère qui par conséquent n'atteint pas l'état actif. C'est le phénomène d'asymétrie d'activation au sein du dimère (Damian et al ; 2006).

Par ailleurs, une asymétrie de couplage et d'activation a été décrite pour les hétérodimères des récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂. La RGS20 est une protéine régulatrice spécifique pour MT₁. Aussi, Maurice *et al.* ont montré que MT₁ ramène la RGS20 au sein de l'hétérodimère MT₁/MT₂ pour former ainsi un quadrimère composé des récepteurs de la mélatonine, la RGS qui lie MT₁ et la protéine G qui interagit avec MT₂. Bien que MT₂ ne lie pas directement la RGS, l'activation ciblée de MT₂ au sein du dimère conduit à une cis-activation de la RGS20. RGS régule alors la signalisation médiée par MT₁ et par MT₂ à partir de l'hétérodimère (Maurice et al ; 2010) (Figure 12)

Enfin, l'asymétrie de couplage avec les protéines GRK et les β-arrestines sont également sujettes à discussion car un seul monomère de récepteur ne peut coupler à la fois la protéine G et une autre protéine régulatrice (Maurice et al ; 2011).

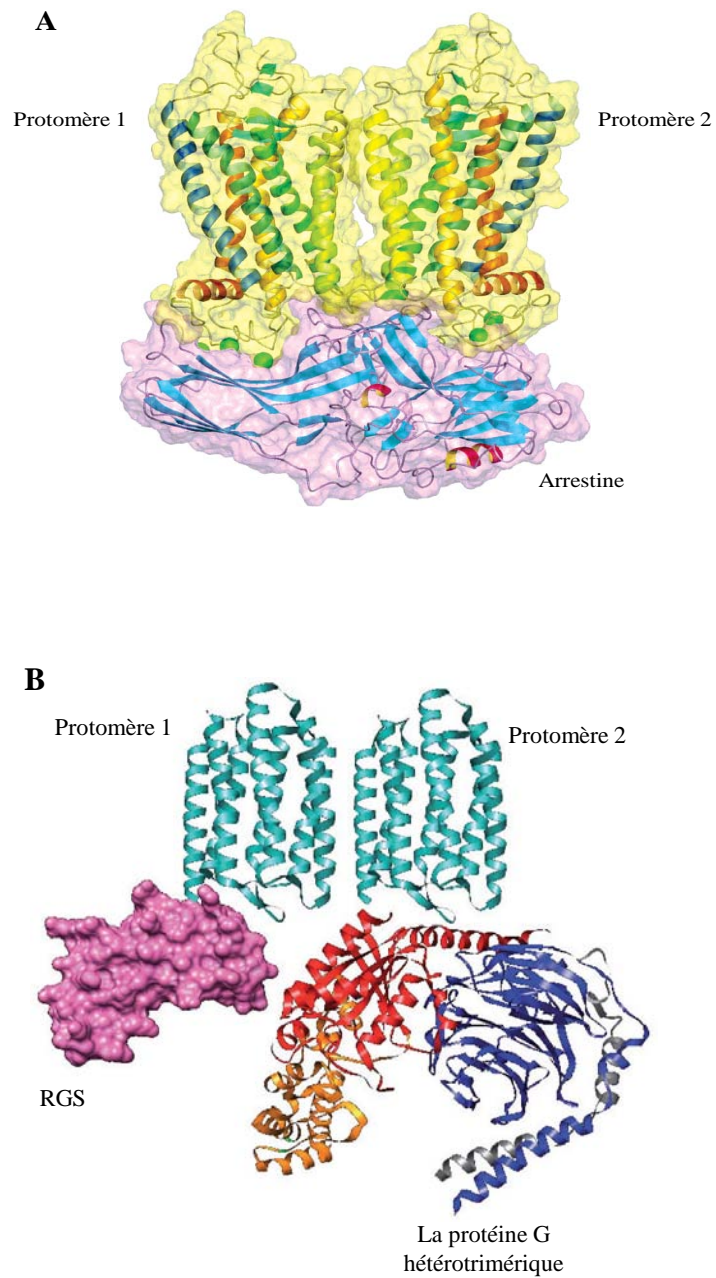


Figure 12 : Conséquences de la dimérisation des RCPG sur la stoechiométrie et sur l'asymétrie de couplage avec les partenaires solubles. A) Modélisation de l'interaction d'un dimère de rhodopsine (jaune) avec un monomère d'arrestine visuelle (rose). Les sites de phosphorylation de la rhodopsine sont représentés en vert (Park et al ; 2004). B) Modèle d'asymétrie de couplage entre les dimères du récepteur MT₁ de la mélatonine, la protéine G hétérotrimérique et la protéine régulatrice RGS 20 (Maurice et al ; 2010).

5) La dimérisation à travers le cycle de vie du RCPG

Les dimères peuvent se former très tôt dans la vie du RCPG. Salahpour *et al.* ont montré que les dimères de $\beta 2$ -AR se forment dans le RE. Pour ce récepteur, le site consensus de la dimérisation se situe au niveau du TM6 et la perturbation de ce site altère l'adressage à la surface du dimère (Salahpour et al ; 2004). Les récepteurs 5-HT_{2C} forment également des dimères au niveau du RE et ces entités ont pu être observées par microscopie confocale basée sur le principe du transfert d'énergie (Herrick-Davis et al ; 2006). Par ailleurs, le récepteur $\alpha 1$ -AR s'organise en oligomères plutôt qu'en simples dimères. Aussi, la perturbation de l'état oligomérique par l'introduction de mutations ponctuelles dans le TM1 et TM4 dissocie les oligomères et résulte en un défaut d'adressage du récepteur à la membrane cellulaire. L'étude a également montré que le traitement avec des antagonistes pharmaco-chaperons corrige l'expression à la surface des récepteurs mutants (Lopez-Gimenez et al ; 2007) (Canals et al ; 2009). La même année, l'équipe de Michel Bouvier publie une étude très similaire avec les mêmes observations pour le récepteur $\beta 1$ -AR (Kobayashi et al ; 2009).

Plusieurs études ont montré que le ligand est capable de moduler la formation des complexes de RCPG à la surface de la cellule. Cependant, ces observations restent isolées et les techniques utilisées ne permettent pas de rendre compte de la véracité des phénomènes observés (Hernanz-Falcón et al ; 2004) (Rocheville et al ; 2000). Cependant, on s'accorde à dire que le ligand n'entraîne pas de changement au niveau de la formation des oligomères de RCPG, ce qui a été validé par des observations plus récentes avec des techniques de pointe (Calebiro et al ; 2013).

En dépit de cette conclusion, les effets allostériques au niveau du dimère peuvent bien entendu moduler le trafic du dimère, c'est le cas des dimères $\beta 2$ -AR avec DOR-R et $\beta 2$ -AR avec KOR-R. L'hétérodimérisation du récepteur adrénergique avec ces récepteurs opioïdes n'altère pas la liaison de leurs ligands respectifs. Cependant, tandis que le complexe $\beta 2$ -AR/DOR-R est internalisé suite à l'activation de $\beta 2$ -AR ou de DOR-R, le complexe $\beta 2$ -AR/KOR-R n'est internalisé ni suite à l'activation de $\beta 2$ -AR ni suite à celle de KOR-R (Jordan et al ; 2001).

Par ailleurs, les complexes de RCPG semblent résister à l'internalisation, c'est le cas du récepteur δ -opioïde pour lequel la forme dimérique est essentielle pour l'internalisation (Cvejic et al ; 1997), de même pour les récepteurs de la somatostatine SST5 avec SST1 qui sont internalisés et localisés dans les mêmes compartiments intracellulaires (Rocheville et al ; 2000).

6) Les effets allostériques au sein du dimère et les conséquences sur la signalisation

L'effet attendu d'une activation de deux récepteurs au sein d'un même homodimère est le cumul de la signalisation des deux récepteurs engagés dans le complexe. C'est ce qui a été rapporté pour le

récepteur mGluR5 pour lequel l'activation d'un protomère est suffisante pour activer la protéine G, mais l'activation des deux protomères du dimère conduit à une signalisation potentialisée (Kniazeff et al; 2004). D'un point de vue mécanistique, cette potentialisation de signal peut être accompagnée d'une activation plus rapide (dans le temps) de l'hétérodimère par rapport au récepteur monomérique seul (Lohse et al; 2014).

Les conséquences de l'interaction RCPG-RCPG sur le profil de liaison du ligand a fait partie des arguments en faveur de l'existence des dimères. La modulation la plus souvent observée au sein des dimères est une coopérativité négative. Cette modulation se traduit par le fait que la liaison d'une molécule de ligand dans le dimère, influence négativement la liaison d'une seconde molécule. Cette conclusion s'est faite suite à l'observation des résultats de liaisons des antagonistes radio-marqués au niveau des récepteurs dopaminergiques et muscariniques. La liaison de l'antagoniste rend compte des sites de liaison totaux (relatifs au nombre de récepteurs) or, deux antagonistes différents qui ciblent les mêmes récepteurs se lient à un nombre de sites différents, ce qui signifie que la dimérisation module les paramètres de liaison d'un des ligands (Armstrong et al; 2001).

Par ailleurs, l'unité minimale de la signalisation du récepteur D2 est un dimère couplé à une seule protéine G. Le mode d'activation du dimère est asymétrique, avec la liaison d'une molécule d'agoniste sur l'un des deux protomères désigné par (A). De manière intéressante, la liaison d'un agoniste inverse sur le second récepteur (B) potentialise la réponse du dimère, tandis que la liaison d'un agoniste sur (B) inhibe la signalisation. Ceci signifie que le protomère B est constitutivement actif et inhibe continuellement le protomère A. Ainsi, la modulation de l'activité du protomère B par des agonistes inverses ou par des agonistes régule la signalisation du dimère (Han et al ; 2009). Enfin, cette coopérativité négative a été observée au sein de plusieurs dimères de RCPG avec ou sans activité constitutive pour l'un des protomères (Comps-Agrar et al ; 2011). Cet exemple aide à comprendre les fonctions définies de chaque protomère et ces fonctions ne sont pas interchangeables. Parfois, il existe un protomère dominant comme dans le dimère, et notre laboratoire a montré que le récepteur orphelin GPR50 en complexe avec le récepteur de la mélatonine MT_1 régule négativement les fonctions du récepteur MT_1 , que ce soit pour la liaison à la mélatonine ou pour le recrutement des molécules de signalisation. De plus, cet effet est spécifique à MT_1 par rapport à la seconde isoforme MT_2 (Levoye et al ; 2006).

7) Les hétérodimères *in vivo*

La dimérisation *in vivo* a été démontrée par plusieurs approches comme la co-immunoprécipitation (Cabello et al ; 2009), les études de complémentation intramoléculaire (Rivero-Müller et al; 2010) et les techniques basées sur le transfert d'énergie. Ces techniques ont permis de visualiser les dimères grâce à la microscopie soit en utilisant des ligands fluorescents, soit des anticorps marqués. Aussi, la proximité entre les récepteurs sous forme dimérique peut être visualisée par FRET ou par PLA (Proximity Ligation Assay). Le FRET et la PLA ont notamment permis de mettre en évidence l'hétérodimère des récepteurs ocytocine au niveau de la glande mammaire, le tétramère de GABA_BR dans le cerveau, ainsi que l'interaction entre les récepteurs adénosine et les récepteurs de dopamine dans le striatum (Albizu et al 2010) (Comps-Agrar et al ; 2011) (Trifilieff et al ; 2011).

Enfin, d'un point de vue pharmacologique, les dimères peuvent être la cible de ligands bivalents⁴ et constituent ainsi une piste prometteuse pour le développement de nouvelles molécules qui régulent la signalisation dépendante du dimère de RCPG. A ce sujet, il a été récemment rapporté que le ligand bivalent DV1 qui cible le dimère CXCR4 pourrait gêner l'entrée du virus du HIV-1 en interférant avec le site de reconnaissance de gp120 au niveau de son co-récepteur CXCR4 (Choi et al ; 2012).

D'autre part, nous avons vu dans ce chapitre que les anticorps peuvent reconnaître des conformations spécifiques de la protéine. Ainsi, le développement d'anticorps spécifiques à un dimère est désormais concevable et sera d'une grande aide pour l'étude de la localisation et la compréhension des fonctions des dimères de RCPG *in vivo* (Hipser et al ; 2010).

⁴ *Ligand bivalent : une molécule possédant deux pharmacophores séparés par un linker, de manière à ce que chaque pharmacophore cible un protomère de RCPG au sein du même dimère.*

LE COMPLEXE D'INTERACTION DES RCPG

1) Généralité sur le complexe protéique associé aux RCPG

Au niveau de la surface cellulaire, le RCPG forme une unité fonctionnelle avec la protéine G hétérotrimérique et cette dernière est sans doute l'un des partenaires les plus intimement liés au récepteur. L'interaction des RCPG entre eux peut avoir des conséquences sur le trafic et sur la signalisation. De plus, plusieurs protéines chaperonnes accompagnent les récepteurs au cours de leur maturation et d'autres protéines assurent l'internalisation, le recyclage ou la dégradation des RCPG.

Toutes ces protéines interagissent avec le récepteur soit directement, soit indirectement par le biais de protéines adaptatrices ; chaque protéine accomplit sa fonction puis cède la place à d'autres partenaires qui prendront le relais. Aussi, l'interaction d'un partenaire avec un RCPG est déterminée par les différents motifs de reconnaissance que peut exposer le récepteur, par les différentes isoformes et mutations au niveau de sa chaîne peptidique, par l'état de maturation, les différentes modifications post-traductionnelles, l'état d'activation et la conformation mais aussi par les protéines qui lui sont associées et qui influencent les interactions avec d'autres partenaires au niveau du même récepteur.

Le devenir d'un RCPG est en quelque sorte à l'image de toutes ces interactions qui sont en perpétuelle association/dissociation, définissant un nuage dynamique de protéines autour du récepteur appelé GIP (GPCR-Interacting Partners) ou GAPC (GPCR-associated protein complexes).

Au sein de la cellule, certains partenaires assurent des fonctions générales qui peuvent être communes à plusieurs protéines cellulaires. Cependant, d'autres partenaires peuvent intervenir spécifiquement dans la signalisation du récepteur et dans la détermination de son devenir dans la cellule. Ces partenaires peuvent être spécifiques à un type cellulaire, à un contexte physiopathologique particulier ou à un moment du cycle cellulaire ou du cycle circadien (Maurice et al ; 2012) (Figure 13).

Ainsi, les études limitées à la pharmacologie et à la signalisation d'un RCPG constituent une compréhension incomplète du fonctionnement d'un récepteur dans la cellule. Il apparaît donc important que l'identification des partenaires d'interaction du récepteur soit nécessaire pour mieux comprendre la régulation des RCPG.

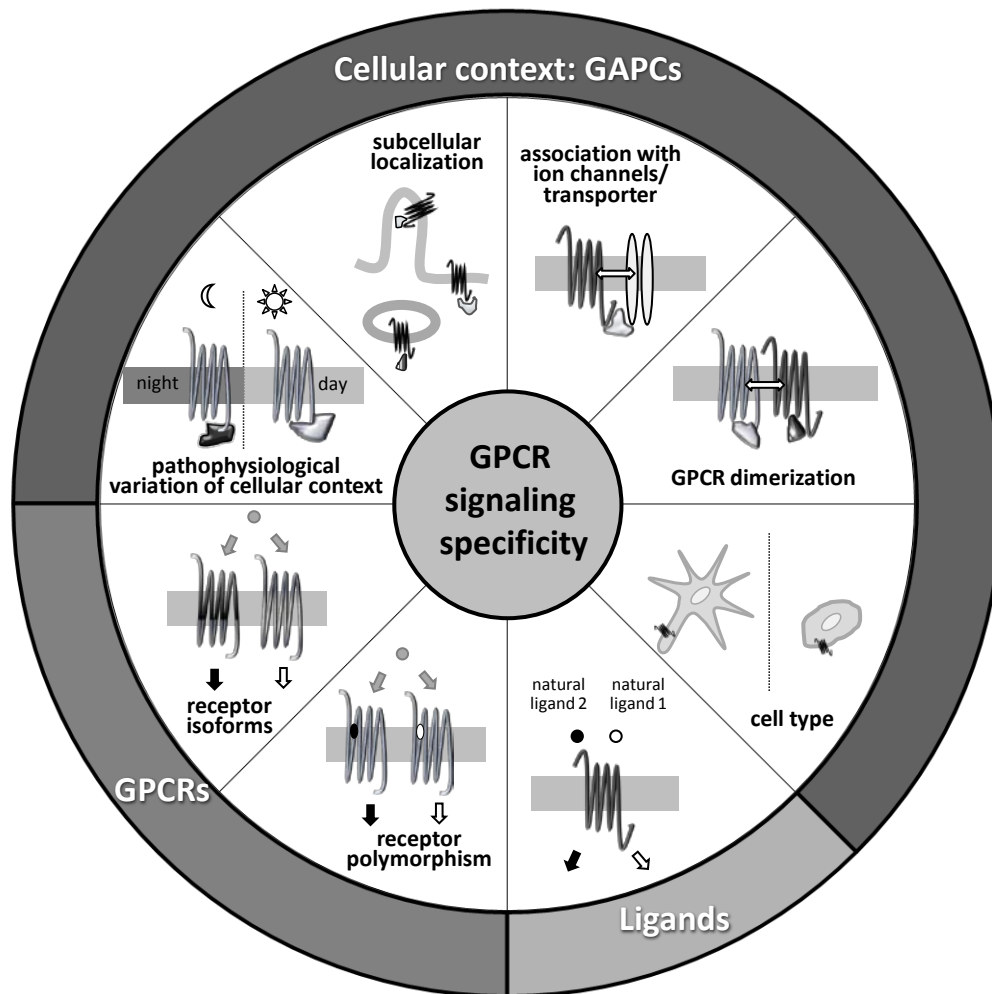


Figure 13 : Spécificité de la signalisation des RCPG. la spécificité de la signalisation d'un RCPG dépend de trois paramètres généraux : le récepteur, le ligand et les partenaires d'interaction. Aussi, les différents polymorphismes et isoformes du récepteur peuvent générer une signalisation différente en réponse à un même ligand. Le ligand à son tour détermine les voies de transduction activées et deux ligands différents génèrent alors deux signalisations différentes. La signalisation dépend également du type cellulaire et des différents partenaires régulateurs.

2) Les techniques utilisées pour l'identification du complexe protéique associé aux RCPG

Cette partie traite des principales techniques génétiques et protéomiques citées dans le chapitre « résultats » (Figure 14).

2.1) L'identification des partenaires protéiques à grande échelle

2.1.1) Le crible double hybride Y2H (Yeast-Two-Hybrid)

Cette stratégie est l'approche la plus communément utilisée pour identifier des partenaires inconnus de la protéine d'intérêt. Ce système repose sur la complémentation fonctionnelle entre deux domaines du facteur de transcription de la levure GAL4 par exemple. Ce facteur est partagé en deux parties et chacune est fusionnée à un partenaire du crible : le domaine de liaisons à l'ADN de GAL4 est fusionné aux domaines solubles de la protéine d'intérêt ; et le domaine activateur de la transcription est fusionné à une banque de cDNA d'un tissu de choix. L'interaction entre l'appât et une protéine cible entraîne la complémentation du facteur GAL4 suivie de la translocation du complexe partenaires-GAL4 dans le noyau afin de permettre l'expression d'un gène rapporteur dépendant de GAL4. Cette technique est supposée mettre en évidence des domaines d'interactions binaires « directes » en tant qu'évènements isolés sans à priori sur un contexte physiologique particulier. Cependant, le double hybride classique ne permet pas de détecter les interactions entre protéines membranaires ou les interactions dépendantes des modifications post-traductionnelles qui ont lieu chez les mammifères mais pas chez la levure (Fields & Song; 1989).

2.1.2) Le MYTH (Membrane Yeast-Two-Hybrid) ou (Split ubiquitin)

C'est une variante du double hybride qui est adaptée aux protéines membranaires. Avec cette stratégie, la protéine d'intérêt est exprimée en entier à la membrane de la levure et le crible se fait par une banque de cDNA codant pour des protéines solubles et membranaires. Le complexe des partenaires reste à la membrane et seul le facteur de transcription complétementé se transloque dans le noyau après clivage enzymatique (Snider et al ; 2010).

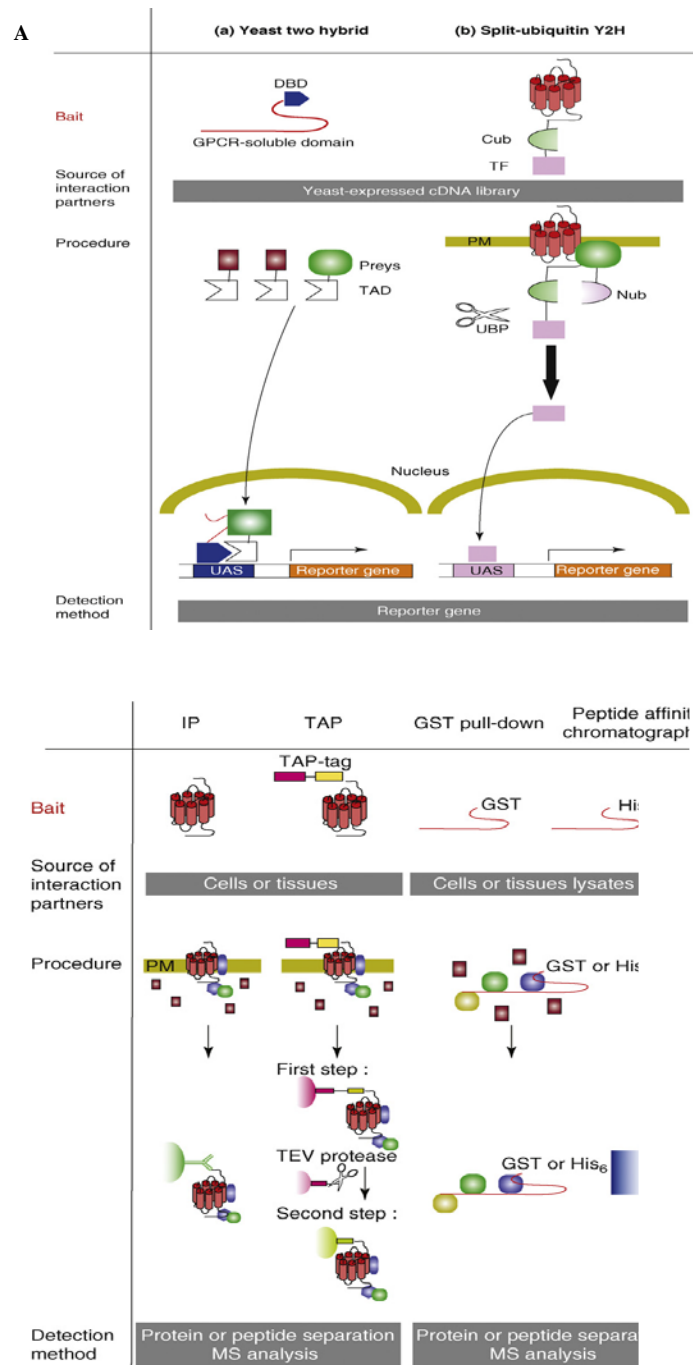


Figure 14 : Les principales techniques génétiques et protéomiques utilisées pour l'identification des partenaires d'interaction associés aux récepteurs couplés aux protéines G. A) Le crible double hybride (H2Y) pour les domaines solubles des RCPG et sa variante (MYTH) qui utilise les récepteurs entiers. Criblage avec des banques de cDNA de tissu de choix. Y2H : yeast-two-hybrid ; MYTH Membrane Yeast-Two-Hybrid ; DBD : domaine de liaison à l'ADN, TAD : domaine d'activation de la transcription. Cub : Cter de l'ubiquitine. Nub : Nter de l'ubiquitine. UBP : déubiquitinase. B) Approches basées sur la purification des partenaires des récepteurs entiers (co-immunoprécipitation et TAP = Tandem Affinity Purification) ou sur l'utilisation de peptides synthétiques recouvrant les domaines solubles du RCPG (pull-down, chromatographie d'affinité). La purification à partir des lysats cellulaires ou tissulaires est suivie d'une identification en spectrométrie de masse des partenaires liés au récepteur (Daulat et al ; 2009).

2.2) Les techniques protéomiques couplées à l'analyse en SM (Spectrométrie de Masse)

Ces techniques permettent une analyse globale des partenaires d'interaction au sein d'un complexe moléculaire avec une relevance physiologique pour le récepteur purifié. Les partenaires purifiés sont séparés par électrophorèse-1D ou 2D puis identifiés généralement par MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) et SM en tandem (SM/SM). **La technique de chromatographie d'affinité** utilise typiquement des peptides synthétiques qui recouvrent des régions solubles des récepteurs. Les peptides sont immobilisés sur des billes puis incubés avec un lysat de tissus de choix pour purifier les partenaires associés (Maurice et al ; 2008). **L'immunoprécipitation** à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt à partir d'un lysat tissulaire, permet d'identifier le complexe de protéines à l'état natif. La protéine d'intérêt est exprimée soit de manière endogène soit de façon recombinante. Cependant, le recours aux anticorps complique l'étape d'identification par SM (Ramos et al ; 2012). **La technique TAP (Tandem Affinity Purification)** est basée sur une double étape de purification à l'aide de deux modules d'affinité fusionnés au récepteur. Les modules d'affinité sont séparés par un site de clivage protéolytique non exprimé chez les protéines de mammifères, comme le site de la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). Cette technique permet l'identification de partenaires d'une protéine d'intérêt exprimée en entier dans les cellules mammifères. La procédure de la purification comprend une première précipitation des protéines, l'élution par clivage protéolytique, puis une seconde purification grâce au second module d'affinité. L'étiquette TAP peut notamment être positionnée en Nter ou en Cter de la protéine d'intérêt. Cette dernière est exprimée par une lignée de cellules de choix, ou utilisée dans la génération de souris transgéniques exprimant la protéine recombinante sous le contrôle d'un promoteur donné. Les souris TAP permettent de purifier les complexes de partenaires *in vivo* et de s'affranchir des désavantages de l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur (Li ; 2011). Par ailleurs, l'équipe de Brian Kobilka a mis au point un système de reconstitution *in vitro* basé sur l'intégration de récepteurs purifiés dans des membranes artificielles contenant du cholestérol HDL (High-Density Lipoprotein) afin de mimer la membrane plasmique et de stabiliser le récepteur d'intérêt. Ces récepteurs stabilisés, sont ensuite incubés avec un lysat cellulaire ou tissulaire avant l'étape de purification. En termes d'avantages et de désavantages, ce système est intermédiaire entre la technique TAP et la chromatographie d'affinité (Chung et al ; 2013).

2.2.1) La validation des partenaires protéiques

Ces techniques sont adaptées à la vérification ponctuelle d'interactions soupçonnées entre deux protéines d'intérêt (avec des conséquences fonctionnelles) ou pour la validation des interactions mises en évidence par des cribles à grande échelle.

2.2.1.1) La co-immunoprécipitation et le pull-down suivis par une analyse en western-blot

La co-immunoprécipitation est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines endogènes ou recombinantes, tandis que le pull-down sur colonnes d'affinités nécessite la surexpression de protéines recombinantes qui sont purifiées à l'aide de modules d'affinités. L'analyse des interactions se fait par western-blot pour chaque partenaire mis en évidence après une séparation par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

2.2.1.2) Le FRET et le BRET

Ce sont des techniques basées sur un principe de transfert d'énergie et qui rendent compte de la proximité spatiale entre les protéines étudiées, ainsi que sur la dynamique de l'interaction. **Le FRET** est basé sur le principe du transfert d'énergie entre deux fluorophores fusionnés à des protéines d'intérêt qui sont distantes de moins de 10 nm. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps eux-mêmes couplés à un fluorophore et dirigés contre deux protéines d'intérêt permet d'étudier des phénomènes *in vivo* observables sous microscopie à fluorescence (Patel et al ; 2002). **Le BRET** est une variante du FRET, qui est basée sur un phénomène naturel de bioluminescence. Il rend compte des affinités relatives entre les protéines étudiées, ce qui permet de comparer des affinités des interactions entre la protéine d'intérêt avec plusieurs partenaires potentiels (Xu et al ; 1999) (Figure 15).

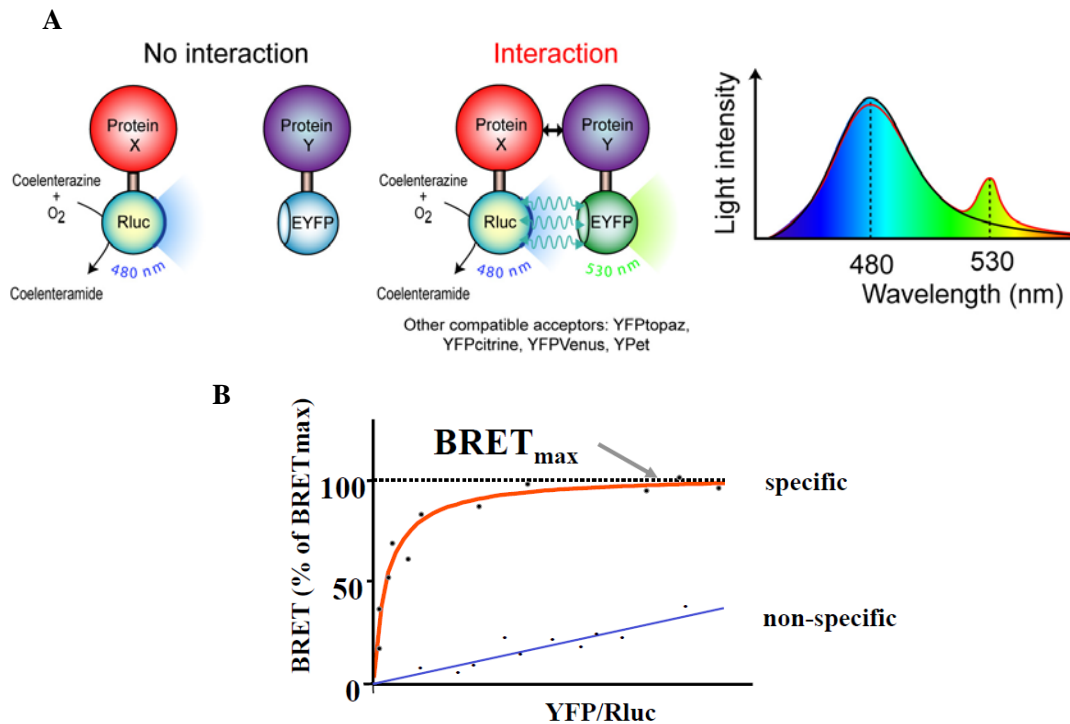


Figure 15 : Principe de la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert). Deux récepteurs d'intérêt sont fusionnés avec la luciférase (RLuc = donneur d'énergie) ou avec la yellow Fluorescent protein (YFP = accepteur d'énergie). En présence de son substrat (Coelenterazine), la luciférase émet une lumière à 480 nm. Si les deux protéines d'intérêt interagissent, la luciférase transfère de l'énergie à la YFP qui émet à son tour un signal à 530 nm. B) Détermination de la spécificité des interactions protéine-protéine avec la technique du BRET : La saturation du donneur d'énergie RLuc (dont l'expression est constante) par des quantités croissantes d'accepteur YFP se produit seulement dans le cas d'interactions spécifiques. Le $BRET_{max}$ correspond au maximum de transfert d'énergie. Le $BRET_{50}$ définit le ratio donneur/accepteur permettant d'avoir 50 % de transfert d'énergie (Bacart et al ; 2008).

3) Les partenaires d'interaction des RCPG dans la cellule

3.1) Les protéines chaperonnes

Dès la néosynthèse, le RCPG est accompagné par diverses protéines chaperonnes qui assurent le bon repliement, la maturation et l'adressage cellulaire du récepteur. En même temps que la traduction, la chaîne peptidique naissante du récepteur est « protégée » par des protéines qui évitent les interactions spontanées entre les acides aminés, protègent des ubiquitinations et veillent au bon repliement de la protéine. Les premiers partenaires du RCPG sont ubiquitaires à la synthèse de toutes les protéines membranaires, ce sont les chaperonnes classiques Bip (Binding immunoglobulin protein) Hsp40, Hsp70 et Hsp90 (Heat shock protein). Au niveau du RE se fait également : (i) la formation des ponts disulfures par les chaperonnes à activité enzymatique PDI (Protein Disulfure Isomerase), (ii) l'addition des coiffes glucidiques immatures (1 à 4 sucres, puis 3 glucose, 9 mannose et 2 N-acétylglucosamine) protégées par les chaperonnes à domaine lectine (calnexine et calréticuline), et (iii) l'isomérisation cis/trans des liens peptidiques précédant les résidus prolines et ce par les chaperonnes isomérases (Hebert et al ; 2007). Au fur et à mesure de la maturation des récepteurs, l'affinité avec ces chaperonnes diminue pour permettre l'adressage à la membrane. Ceci suggère que la modulation de l'interaction protéine-chaperonnes est une manière de réguler l'expression de surface du RCPG (Trombetta & Parodi ; 2003).

Un exemple des protéines non ubiquitaires est la Ribophorine1. C'est une enzyme oligosaccharide transférase qui N-glycosyle les protéines nouvellement synthétisées. Des études protéomiques sur le récepteur μ -opioïde MOR montrent qu'il interagit spécifiquement avec la ribophorine. Cette interaction est dépendante de la glycosylation du récepteur, mais n'est pas cantonnée au RE. En effet, ribophorine1 associée au récepteur sauvage est responsable de son adressage à la surface cellulaire ; elle corrige également l'expression de surface du mutant MOR sur le domaine Cter³⁴⁴KFCTR³⁴⁸ retenu dans le RE tant que le mutant présente des sites de glycosylations intacts par cette enzyme (Ge et al ; 2009).

Enfin, les chaperonnes présentent une spécificité de couplage qui dépend intimement du récepteur. A ce sujet, Mizrachi & Segaloff montrent que le profil d'interaction du récepteur LHR avec plusieurs chaperonnes (telles que les Bip, calnexine et calréticuline) est différent entre le récepteur sauvage et les variants de mutations LHR. Les mutants présentent notamment différentes affinités aux chaperonnes sans doutes liées à leurs différents degrés de maturation (Mizrachi & Segaloff ; 2004).

3.2) Les oligomères de RCPG

Outre les interactions avec des chaperonnes, la dimérisation des RCPG peut être un critère de passage au niveau du point de contrôle qualité du RE. A ce sujet, le récepteur de la dopamine D4 forme des complexes homomériques dès sa biogénèse et la conformation résultante du repliement

d'homodimères de D4 serait le critère majeur pour que le récepteur puisse quitter le compartiment RE. En effet, les mutants D4 présentant une capacité de dimérisation altérée, ne passent pas le point de contrôle qualité. Cependant, la dimérisation des mutants avec des protomères sauvages, confère un effet chaperonne-like qui permet d'adresser le récepteur mutant en complexe avec le récepteur sauvage à la surface cellulaire (Van Craenenbroeck et al ; 2011).

3.3) Les protéines accessoires RAMP (Receptor Activity Modifying Proteins)

Ces partenaires au nombre de trois (RAMP1, RAMP2 et RAMP3) sont des protéines à un seul domaine transmembranaire. Elles interagissent majoritairement avec les récepteurs sécrétines de la classe B des RCPG au niveau de leur hélice 8. Les récepteurs les plus étudiés sont le récepteur CTR de la calcitonine, le récepteur du glucagon, le récepteur du PTH (hormone parathyroïde) et les récepteurs du VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) VPAC1, VPAC2 et PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide 1) (Kuwasako et al ; 2013). En plus des récepteurs de la classe B, une interaction fonctionnelle a été rapportée avec le récepteur censeur de calcium de la classe C, suggérant un rôle général de ces protéines pour l'ensemble des RCPG (Bouschet et al ; 2005). Les RAMP hétérodimérisent de manière directe avec les RCPG et modifient leur signalisation. Par exemple, RAMP2 potentialise la réponse cellulaire de VPAC1. Plus important encore, le domaine Nter de RAMP participe au site de liaison du ligand. Aussi, la combinaison des RAMP et des récepteurs CTR notamment donne naissance à une nouvelle entité réceptrice avec ses propres ligands et son propre profil pharmacologique (Archbold et al ; 2011).

3.4) Les protéines d'échafaudage

3.4.1) Les protéines à domaines PDZ

Les domaines PDZ (PSD95-disc large-Zonula occludens) sont des motifs de 90 acides aminés retrouvés chez plus de 300 protéines humaines (Schultz et al ; 2000). Ces protéines peuvent présenter plusieurs domaines PDZ qui lui permettent d'interagir avec plusieurs protéines cibles. Les protéines à domaines PDZ régulent le trafic des RCPG et leur signalisation en assurant l'échafaudage de plusieurs molécules de signalisation ainsi que le tri des récepteurs entre le recyclage et la dégradation. Les motifs cibles appelés ligand PDZ sont généralement (mais pas exclusivement) les trois ou quatre derniers acides aminés du RCPG : X-S ; DXV, (T/S)-(D/S)-V ; ψ X ψ ; et X ψ X ψ (où ψ est un acide aminé hydrophobe (V, Y, F, L ou I). et il semblerait que chaque ligand interagisse spécifiquement avec un domaine PDZ qui lui est spécifique (Nourry et al ; 2003) (Bécamel et al ; 2001).

Le récepteur de la somatostatine SST5R par exemple, interagit avec plusieurs protéines à domaines PDZ dont NHERF, PIST et SNX27. SNX27 retarde l'adressage de SST5R à la membrane plasmique, tandis que la surexpression de PIST entraîne la rétention du récepteur au niveau golgien.

Cette rétention est notamment corrigée par l'expression de NHERF qui promeut l'adressage membranaire du récepteur (Bauch et al ; 2014). Par ailleurs, NHERF est connue pour lier plusieurs molécules de signalisation comme Gαq, PLCβ et les protéines kinases PKC et PKD. De plus, NHERF est généralement décrite pour sa capacité à potentialiser la signalisation de la protéine G suite à l'activation des récepteurs PTH1R (Parathyroid Hormone 1 Receptor), LPAR2 (LysoPhosphosphatidic Acid Receptor 2), P2RY1 (purinergic receptor) et mGluR5 (Ritter & Hall ; 2009).

Le récepteurβ1 -AR interagit avec la protéine à domaine PDZ PSD95 dans les cellules HEK293. En présence de PSD95, le récepteurβ1 -AR couple la protéine Gs et ne semble pas subir d'internalisation. Cependant, la perturbation de l'interaction avec PSD95 switch vers un couplage à la protéine Gi et potentialise l'internalisation du récepteur (Xiang et al ; 2002). Dans les cellules Cos-7, l'interaction de β1-AR avec MAGI-3 n'influence pas son trafic, mais inhibe sélectivement l'activation de ERK1/2 sans changement au niveau de la voie de l'AMPc (He et al ; 2006). De plus, β1-AR interagit également avec la protéine à domaine PDZ SAP97 qui fait le lien avec la protéine AKAP79 et favorise l'expression du récepteur à la surface cellulaire (Gardner et al ; 2007).

Par ailleurs, le récepteur 5-HT_{2C} de la sérotonine interagit avec une multitude de protéines à domaines PDZ et subit une régulation fine de la part de ces protéines qui sont en compétition pour un ligand PDZ unique. Par exemple, PSD95 est responsable de la désensibilisation et de l'endocytose du récepteur, tandis que MPP3 provoque l'effet inverse (Gavarini et al ; 2006).

Enfin, plusieurs partenaires peuvent coopérer pour une fonction communes comme RAMP3 qui possède un ligand PDZ et interagit avec les protéines NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor) et NHEF afin de réguler le trafic des récepteurs calcitonine (Bomberger et al ; 2005 a & b).

3.4.2) Les protéines Homer

Les protéines Homer forment une famille d'une centaine de protéines produites par trois gènes chez l'homme. Ces protéines sont exprimées de manière ubiquitaire et présentent différentes isoformes courtes et longues. Les protéines Homer sont connues pour être capables de former des complexes dimériques, tétramériques et multimériques par une interaction coiled-coil de leurs domaines Cter, domaine présent chez les isomères longs (Fagni et al ; 2002). Au niveau du système nerveux, les protéines Homers forment avec les protéines Shank et les protéines à domaine PDZ entre autres, le squelette des épines dendritiques post-synaptiques (Hayashi et al ; 2006). En ce qui concerne la régulation des RCPG, Homer1 peut interagir avec les RCPG et avec plusieurs autres protéines comme les canaux ioniques et les molécules du cytosquelette pour faciliter la signalisation cellulaire. Ces protéines régulent également la localisation cellulaire des RCPG et l'isomère Homer1b par exemple, entraîne la rétention intracellulaire des récepteurs glutamate mGluR5, tandis que Homer1a facilite l'expression membranaire de ces récepteurs (Roche et al ; 1999). Par ailleurs, les récepteurs mGluR1

et mGluR5 présentent une activité constitutive qui est inhibée suite à la liaison avec Homer3. La surexpression de Homer1a perturbe l'interaction entre ces récepteurs métabotropiques du glutamate et Homer3, ce qui se traduit par une potentialisation de l'activité constitutive de mGluR dans les neurones (Ango et al ; 2001). De plus, mGluR1 comme mGluR5 sont couplés à une signalisation calcique intracellulaire dépendante de l'inositol-1,4,5-triphosphate IP3 qui active la voie MAPK. L'activation de mGluR5 mais pas celle de mGluR1 peut également induire une cascade de signalisation MAPK indépendante de la voie calcique, qui est facilitée par une interaction spécifique de mGluR5 avec les protéines adaptatrices Homer1b/c (Mao et al ; 2005).

3.4.3) AKAP (Kinase Anchoring Proteins)

Les protéines AKAP ont été initialement décrites pour leur rôle dans la localisation membranaire de la protéine kinase PKA. Cependant, de plus en plus d'étude rapportent l'interaction de ces protéines non seulement avec des kinases, mais également avec les phosphatases PP2A et PP2B, la phosphodiesterase 4D et plusieurs senseurs calciques tels que la calmoduline, la calendrine et la calcineurine (Willoughby et al ; 2006) (Gorny et al ; 2012) (Jia et al ; 2013). D'une part, les RCPG peuvent subir une désensibilisation hétérologue par la PKA qui est amenée à la surface cellulaire par les protéines AKAP. D'autre part, AKAP amènent aussi des phosphatases pour former un complexe de phosphorylation/ déphosphorylation autour du RCPG (Li et al ; 2013). Par exemple, le récepteur β_2 - AR interagit avec AKAP250 (la gravine) via son domaine Cter. AKAP250 rassemble alors le complexe de protéines PP2A, PP2B et PKA pour ainsi réguler la désensibilisation et le recyclage du récepteur (Fan et al ; 2001b). De plus, l'activation des RCPG couplés aux protéines Gq/11 peut induire une redistribution cellulaire du complexe de protéines de AKAP250 via l'activation de la PKC et de manière sensible à l'élévation de la concentration du calcium intracellulaire. Ceci a pour conséquences d'influencer la cascade de signalisation de tout autre RCPG dans la même cellule, dans la mesure où cette signalisation est dépendante des partenaires de signalisation d'AKAP (Schott et al ; 2013).

3.5) Les protéines de dégradation et de recyclage

3.5.1) Les GASP (GPCR Associated Sorting Proteins)

C'est une famille de dix protéines issues d'un même gène qui, comme les GRK et les - arrestines, interagissent avec un large panel de RCPG. Par exemple, GASP-1 a été montrée interagir avec une trentaine de récepteurs au niveau de leurs domaines Cter et vraisemblablement par l'intermédiaire de l'hélice 8 (Abu-Helo et al ; 2010). Les GASP prennent en charge les RCPG qui subissent une dégradation rapide dans les lysosomes. Le premier exemple dans la littérature montre que GASP-1 dirige le récepteur δ -opioïde DOR vers la voie de dégradation rapide mais pas le récepteur μ -opioïde MOR qui est concerné par une dégradation lente (Whistler et al ; 2002). Par la

suite, Bartlett *et al.* ont confirmé l'implication de GASP-1 dans la dégradation rapide des RCPG tels que D2 (Bartlett et al ; 2005).

En outre, GASP-1 interagit avec le récepteur canabinoïde CB1 dans les neurones ; et l'expression d'un dominant négatif de GASP-1 inhibe la dégradation du récepteur. L'altération de l'adressage vers la voie de dégradation rapide de CB1 cause la diminution de la tolérance vis-à-vis de l'effet analgésique suite à la stimulation des récepteurs avec les canabinoïdes *in vivo*. Cet effet de tolérance est la conséquence directe de la dégradation des récepteurs CB-1 par GASP-1 (Tappe-Theodor et al ; 2007).

3.5.2) Les petites GTPases

Les petites GTPase sont majoritairement représentées par les protéines Rab et des familles Ras, Rho et ARF (ADP-ribosylation factor). Les Rab GTPases forment une soixantaine de protéines impliquées dans le processus de trafic vésiculaire. Ces protéines tapissent tout le réseau vésiculaire intracellulaire et présentent des localisations distinctes relatives à leurs fonctions. Les plus étudiées sont Rab5 qui est responsable de l'internalisation, ainsi que Rab4, Rab11 et Rab7 qui régulent respectivement le recyclage rapide, le recyclage lent et l'adressage vers le lysosome. Ces protéines interagissent au niveau des mêmes domaines du récepteur et sont donc en permanente compétition (Wang & Wu ; 2012). Suite à une brève stimulation par le ligand, le récepteur β 2-AR interagit avec Rab4 et Rab5 pour être rapidement recyclé après avoir été déphosphorylé dans le compartiment Rab4. Dans des conditions de stimulations prolongées, le récepteur β 2-AR est séquestré par Rab11 qui retarde son recyclage (Yudowski et al ; 2009) (Seachrist et al ; 2000) (Moore et al ; 2004). Pour ce qui est de la famille ARF, ARF6 est impliqué dans l'endocytose de plusieurs RCPG par exemple (Claing et al ; 2001) (Houndolo et al ; 2005). Par ailleurs, les RCPG qui sont capables d'interagir avec ARF et Rho sont également capables d'activer la phospholipase D (PLD) de manière indépendante des protéines G (Zoe et al ; 2011) (Everett et al ; 2010).

3.5.3) La protéine Hrs (Hepatocyte Growth Factor-Regulated tyrosine kinase substrate)

C'est une protéine qui régule plusieurs facettes du trafic des RCPG. Bien que longtemps considérée comme un médiateur de la dégradation lysosomale, elle peut diriger les RCPG vers une voie dépendante ou indépendante de la machinerie ESCORT et peut également intervenir dans le recyclage des récepteurs (Hanyaloglu & Zastrow ; 2008) (Hasdemir et al ; 2007).

3.5.4) Autres protéines

Comme la Hrs, d'autres protéines connues pour être spécialisées soit dans la dégradation lysosomale soit dans le recyclage, peuvent en fait être impliquées dans les deux voies. On peut citer les GAST (G protein-coupled Receptor-Associated Sorting Protein) et la SNX1 (Sorting Nexin-1).

3.6) **Autres types de régulation RCPG-GIP**

Hormis les protéines régulatrices décrites qui sont généralement communes pour plusieurs RCPG, certains partenaires protéiques sont plus spécifiques à un seul récepteur. Par exemple, la protéine Calcyon interagit avec le récepteur dopaminergique D1 dans les épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex préfrontal. Calcyon a été montrée à l'origine d'un switch de couplage Gs/Gq pour D1 ce qui conduit à la potentialisation de la signalisation calcique neuronale (Lezcano et al ; 2000). Par ailleurs, la calmoduline est une protéine activée par la signalisation calcique et la régulation des RCPG par la calmoduline dépend du récepteur. En effet, la calmoduline augmente la signalisation du récepteur 5-HT_{2C} dépendante de la β -arrestine-2, mais pas la signalisation dépendante de la protéine G (Labasque et al ; 2008).

Par ailleurs, les RCPG peuvent constituer des régulateurs pour d'autres protéines cellulaires et ce de manière dépendante ou indépendante du ligand. Aussi, le transporteur de la dopamine DAT interagit physiquement avec quelques RCPG qui modulent son activité de recapture de la dopamine : L'activité de DAT est inhibée par le récepteur GPR37 de manière indépendante de la présence du ligand (Marazziti et al ; 2007), alors que le récepteur dopaminergique D2 potentialise l'activité de DAT en présence du ligand (Lee et al ; 2007).

4) **L'identification des complexes de protéines associées aux RCPG**

Depuis plus d'une dizaine d'années, les RCPG sont le sujet de plusieurs études qui visent à identifier leurs partenaires d'interaction, avec un intérêt particulier pour les complexes associés au domaine C terminal (Bockaert et al ; 2004). L'exemple des récepteurs sérotoninergiques montre que le récepteur 5-HT_{2C} interagit avec 15 protéines au niveau de son extrémité Cter. Parmi ces protéines on compte la protéine pré-synaptique Munc-18, la calmoduline, eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) et plusieurs protéines à domaines PDZ telles que Veli3, PSD95 et Dlg3 (Bécamel et al ; 2002 a & b). De plus, la comparaison entre les partenaires d'interaction co-purifiés avec les peptides Cter de 5-HT_{2A} et de 5-HT_{2C} (deux isoformes de récepteurs partageant 50 % d'homologie de séquence) démontre que ces deux récepteurs interagissent avec des protéines différentes malgré le fait qu'ils contiennent le même ligand PDZ (SXV). En effet, 5-HT_{2A} interagit spécifiquement avec SAP102 (Synapse-Associated Protein 102) et avec le complexe Veli-3/CASK/Mint1, tandis que 5-

HT_{2C} affiche une interaction forte avec PSD95 (Bécamel et al ; 2004) (Bockaert et al ; 2004). L'analyse des interactions impliquant le Cter de 5-HT_{2C} par crible double hybride a permis d'identifier la protéine MUPP1 (Multi-PDZ-Domain Protein) comme partenaire direct de 5-HT_{2C}. De manière intéressante, l'interaction avec MUPP1 est déstabilisée si la sérine S⁴⁵⁸ du ligand PDZ de 5-HT_{2C} est phosphorylée suite à l'activation par la sérotonine, ce qui souligne un niveau de régulation supplémentaire du complexe de protéines associées aux 5-HTR (Ullmer et al ; 1998) (Parker et al ; 2003). De même, l'étude de l'interactome des quatorze derniers acides aminés de 5-HT_{4A} et 5-HT_{4E} montre que ces deux peptides recrutent respectivement 10 et 3 protéines, dont la majorité est représentée par des protéines à domaines PDZ. Aussi, 5-HT_{4A} interagit avec NHERF, Veli 1, Veli2 et Veli3 ainsi qu'avec MAGI-2. De son côté, 5-HT_{4E} interagit avec CIPP (Channel-interacting PDZ domain protein) et nNOS (Joubert et al ; 2004) (Bockaert et al ; 2004).

En définitive, l'analyse globale des partenaires des récepteurs de la sérotonine souligne le lien intime entre ces récepteurs, les protéines à domaines PDZ, les molécules de signalisation et les éléments du cytosquelette synaptique ; ce qui est en adéquation avec le rôle de ces récepteurs dans la régulation de la plasticité synaptique (Figure 16).

De manière similaire, l'étude des partenaires protéiques du récepteur mGluR5 immunoprécipité à partir de lysat de cerveau de rat a permis de valider l'interaction de ce récepteur avec des partenaires régulateurs déjà connus, comme la calmoduline et Homer3. Ces études ont également permis l'identification de nouveaux partenaires tels que plusieurs isoformes de la protéine 14-3-3 (Farr et al ; 2004). Par ailleurs, la chromatographie d'affinité utilisant le peptide Cter de mGluR4 a montré que ce récepteur interagit avec les protéines MAP-1 (microtubule associated protein-1), MAP-6 aussi connue sous le nom de STOP (Stable Tubule-Only Polypeptide) et avec la spectrine- β (Moritz, et al ; 2009). En outre, l'étude des partenaires de mGluR4 immunoprécipité à partir de lysats de cervelet de rat a permis d'identifier 183 protéines dont plusieurs composants pré-synaptiques comme SNAP25, synapsine et Munc-18. La composition du complexe de protéines suggère un rôle de mGluR4 dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs au niveau des cellules de Purkinje, en plus de sa fonction comme inhibiteur de l'entrée calcique au niveau de ces neurones (Ramos et al ; 2012).

Pour ce qui est de l'utilisation de la stratégie TAP qui permet de réduire sensiblement le nombre de partenaires non spécifiques, la purification du récepteur GABA_B à partir des souris transgéniques (Nter)TAP-GABA_B ou GABA_B-TAP(Cter) a révélé l'interaction du récepteur avec GRP78/BiP (Glucose-Regulated Protein 78) et a confirmé l'interaction avec KCTD12 (K⁺ channel tetramerization domain-containing proteins 12), identifiée également par immunoprécipitation du GABA_B natif (Schwenk et al ; 2010) (Bartoi et al ; 2010). Une autre stratégie a été développée par Borroto-Escuela *et al.* afin de s'affranchir des problèmes de solubilisation des RCPG entier, étape nécessaire en aval de la purification par la stratégie TAP. L'équipe a notamment utilisé des plasmides codant le module TAP fusionné aux domaines solubles (boucle i3 et Cter) des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine

M1 à M5, exprimés dans la lignée de neuroblastome humain SK-N-MC. L'étude a permis l'identification de 142 protéines dont plusieurs isoformes de la protéine G, des protéines RGS, des petites GTPase et plusieurs protéines adaptatrices dont 14-3-3 et AKAP79 (Borrito-Escuela et al ; 2011).

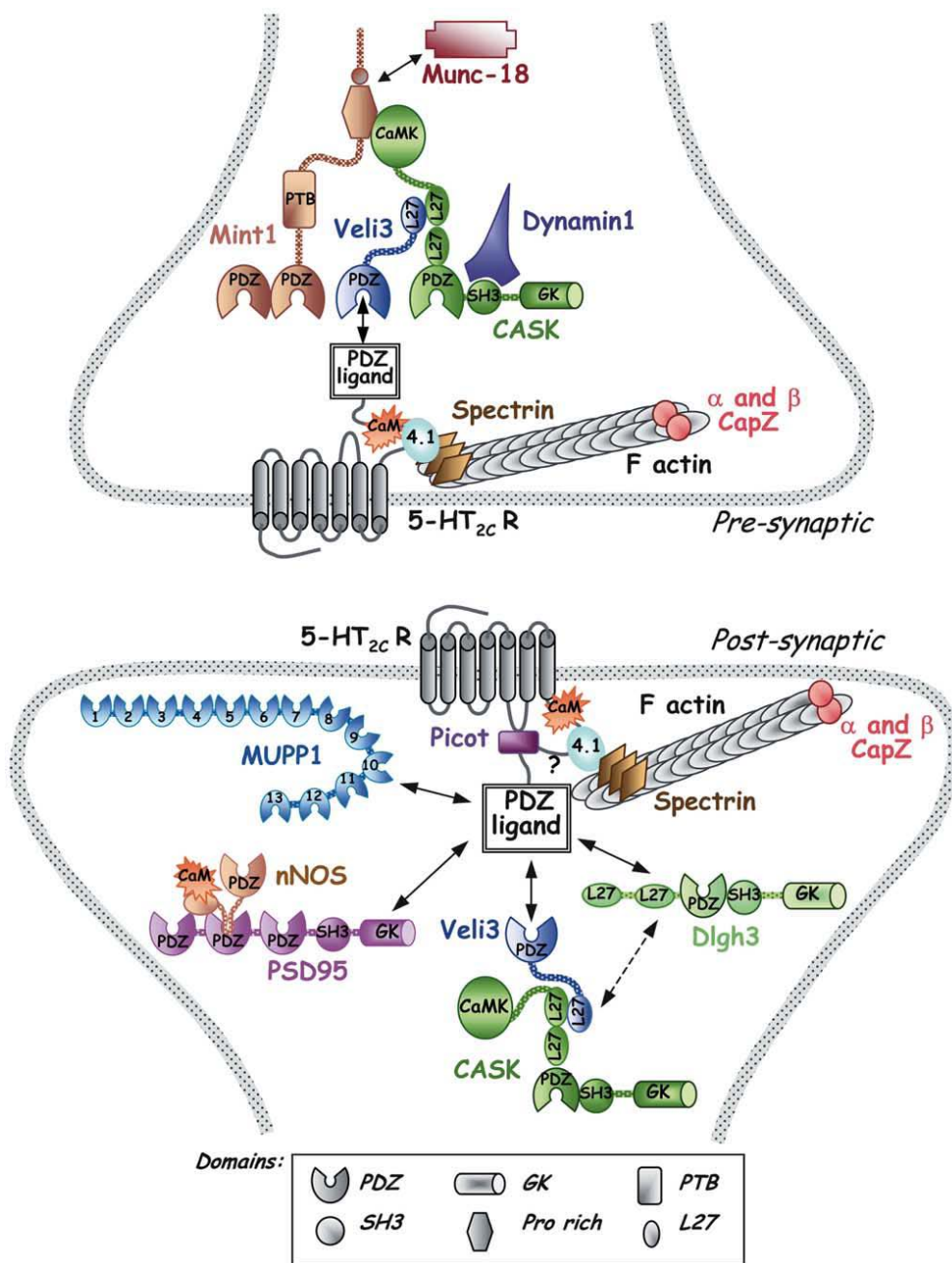


Figure 16 : Organisation des différents partenaires synaptiques du récepteurs 5-HT_{2C}. ce schéma représente le complexe de protéines associé au récepteur 5-HT_{2C}. L'ensemble de ces protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant le peptide Cter du récepteur. Les partenaires ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse (Bockeaert et al ; 2003)

CHAPITRE III : LA MELATONINE ET SES RECEPTEURS

La mélatonine :

1) Physiologie de la mélatonine

La mélatonine (N-acetyl-5-methoxytryptamine) est une molécule qui a été découverte en 1917 par McCord et Allen, puis a été purifiée par Lerner en 1958 à partir de glandes pinéales bovines. Cette substance provoquait l'éclaircissement de la peau de poissons et d'amphibiens par l'agrégation des granules de mélanine. Elle a ainsi été nommée mélatonine (Lerner et al ; 1958).

La mélatonine est présente chez tous les organismes vivants allant des algues unicellulaires jusqu'à l'Homme ; et il aura fallu attendre vingt ans pour découvrir l'un de ses principaux rôles dans l'entraînement du rythme circadien chez le règne animal (Redman et al ; 1983). La mélatonine est en effet une neurohormone synthétisée par la glande pinéale de manière circadienne sous le contrôle de l'horloge biologique interne qui siège au niveau des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC) et sa synthèse atteint un pic pendant la nuit.

Les NSC régulent la libération de la mélatonine en projetant des neurones vers la glande pinéale. Ils régulent aussi l'axe hypophyso-surrénalien pour contrôler d'autres paramètres biologiques et comportementaux, assurant ainsi les variations physiologiques notoires entre le sommeil et l'état de veille (Perreau-Lenz et al ; 2003) (Dardente & Cermakian ; 2005).

En l'absence de synchronisation environnementale (lumière, température, etc...), l'horloge biologique suit son libre cours ; c'est le cas par exemple des personnes atteintes d'une cécité provoquée par des lésions qui touchent le nerf optique (Morin et al ; 1981). L'activité de libre cours se traduit par la capacité des neurones des NSC à pouvoir assurer une régulation circadienne intrinsèque et indépendante des facteurs environnementaux (Gillette et al ; 1995). Ceci fait intervenir des boucles de rétrocontrôles impliquant plusieurs facteurs de transcription dont les plus connus sont Per (Period) et Cry (Cryptochrome), Clock et Bmal1 (Cermakian & Sassone-Corsi ; 2000). En France, l'étude la plus connue du libre cours chez l'homme a été réalisée par le spéléologue Michel Siffre en 1962. Après deux mois d'isolation à 110 mètres sous terre sans lumière naturelle, il pensait alors n'y être resté que 23 jours alors qu'il en avait passé 58.

La mélatonine exerce ses principaux effets via ses récepteurs de haute affinité MT_1 et MT_2 (MTR). Ces protéines appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils activent la voie Gi/Go et sont principalement exprimés au niveau des NSC (Hardeland et al ; 2011). La mélatonine circule dans le sang et active les récepteurs MTR exprimés au niveau du système nerveux central et au niveau des tissus périphériques. Hautement lipophile, cette hormone est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et de traverser les membranes plasmiques de manière passive, ce qui lui permet d'atteindre d'autres sites de liaison intracellulaires de basse affinité comme

l'enzyme quinone réductase QR2 (Nosjean et al ; 2000). Dans le cadre de ce manuscrit, seuls les sites de haute affinité seront traités.

2) La synchronisation de l'horloge biologique interne par la photopériode

2.1) Relais de l'information lumineuse de la rétine jusqu'aux NSC

Les signaux visuels et lumineux sont perçus par les photorécepteurs de la rétine (cônes et bâtonnets) puis sont transmis sous forme de signal nerveux à différents relais cellulaires rétiniens, avant d'être pris en charge par les cellules ganglionnaires. Ces cellules prennent naissance à partir de la couche interne de la rétine et certaines sont intrinsèquement photosensibles par l'expression d'un photo-pigment : la mélanopsine. Les cellules ganglionnaires sont donc capables de relayer une information exclusivement lumineuse et qui est indépendante de l'activation de la rhodopsine au niveau des photorécepteurs.

Les axones des cellules ganglionnaires forment les nerfs optiques qui naissent à partir de chaque œil, se croisent au niveau du chiasma optique, puis projettent vers plusieurs cibles dont le corps genouillé latéral (CGL) du thalamus et les NSC de l'hypothalamus. Tandis que l'information visuelle atteint le CGL, les ganglions projetant au niveau des NSC par la voie du tractus rétino-hypothalamique (TRH) relaient exclusivement l'information lumineuse qui est à l'origine de la synchronisation de l'horloge interne. Secondairement, le NSC reçoit également des afférences du CGL et des voies transitant par le noyau raphé. Ces voies assurent un contrôle supplémentaire pour la synchronisation de l'horloge biologique en plus du tractus rétino-hypothalamique TRH (Hannibal ; 2002). Les principaux neurotransmetteurs mis à contribution dans l'influx nerveux rétino-hypothalamique sont le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) et le glutamate (Moore ; 1995) (Johnson et al ; 1988).

2.2) Relais de l'information nerveuse des SCN jusqu'à la glande pinéale

La transmission du signal des NSC vers la glande pinéale se fait par la voie nerveuse multi-synaptiques faisant intervenir les neurones des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus qui produisent les neurotransmetteurs GABA et VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) (Moore & Speh ; 1993). Le message nerveux passe ensuite par les neurones sympathiques pré-ganglionnaires des cellules intermedio-latérales de la moelle épinière, puis par les neurones sympathiques des ganglions cervicaux supérieurs, pour enfin atteindre les neurones post-ganglionnaires qui libèrent la norépinephrine au niveau de la glande pinéale (Tamarkin et al ; 1985).

3) Synthèse, diffusion et dégradation de la mélatonine

La glande pinéale est principalement composée de cellules neuroendocriniennes appelées pinéaloctes. L'activation des récepteurs α_1 -AR et β_1 -AR des pinéaloctes par la norépinephrine déclenche une cascade de signalisation via l'activation de la protéine Gs, ce qui induit l'augmentation des taux d'AMPc intracellulaires, active la PKA et la phosphorylation de CREB et résulte en la potentialisation de la transcription du gène de l'enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) à hauteur de cent fois (Wolfe et al ; 1995) (Simonneaux & Ribelayga ; 2003). AANAT est l'enzyme clé qui détermine le taux de synthèse de la mélatonine. Son état d'activation est la résultante d'une régulation circadienne à différents niveaux : activation par l'AMPc, stabilisation par la protéine 14-3-3 et dégradation par le protéasome (Koch et al ; 2003) (Kim et al ; 2007) (Stehle et al ; 2001) (Hardeland et al ; 2006)

En plus de l'AANAT, plusieurs réactions enzymatiques sont nécessaires à la synthèse de la mélatonine à partir du tryptophane, en passant par la sérotonine et la N-acétyl-sérotonine (Figure 17).

La mélatonine est une hormone lipophile qui n'est pas stockée dans des vésicules. Elle est libérée aussitôt sa synthèse effectuée. La glande pinéale est richement vascularisée et la mélatonine est directement déversée dans la circulation sanguine par diffusion à travers la membrane des pinéaloctes (Duvernoy et al ; 2000). Chez l'Homme de jeune âge, les concentrations plasmatiques nocturnes de la mélatonine atteignent 200 pg/ml (environ 0.3 à 0.5 nM) tandis qu'elles ne sont que de 10 pg/ml dans la journée (Pandi-Perumal et al ; 2006). La glande pinéale déverse aussi la mélatonine dans le liquide céphalo-rachidien à partir du troisième ventricule où les concentrations de la mélatonine sont 20 à 30 fois plus importantes que dans le sang et diminuent au fur et à mesure de l'éloignement du site de libération (Tricoire et al ; 2002).

La demi-vie de la mélatonine est très courte (moins de 30 minutes). Chez l'homme, une grande partie de la mélatonine circulante est dégradée par le foie et secondairement par le rein en des dérivés indolamines : elle est transformée en 6-hydroxy-mélatonine par le cytochrome P450 puis conjuguée à un groupement sulfate ou à un acide glucuronique pour être éliminée dans les urines (Leone et al ; 1987). La mélatonine peut aussi être désacétylée en 5-méthoxytryptamine au niveau des cellules de la glande pinéale, dans la rétine et par les neurones (Grace et al ; 1991) ou subir un troisième type de dégradation au niveau du cerveau en des dérivés kynuréniques : le N1-acétyl-N2-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK) et le N1-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK) (Pandi-Perumal et al ; 2006).

En plus d'être libérée par la glande pinéale, la mélatonine est aussi synthétisée par plusieurs organes périphériques tels que le tractus gastro-intestinal, la rétine et les leucocytes (Pandi-Perumal et al ; 2006).

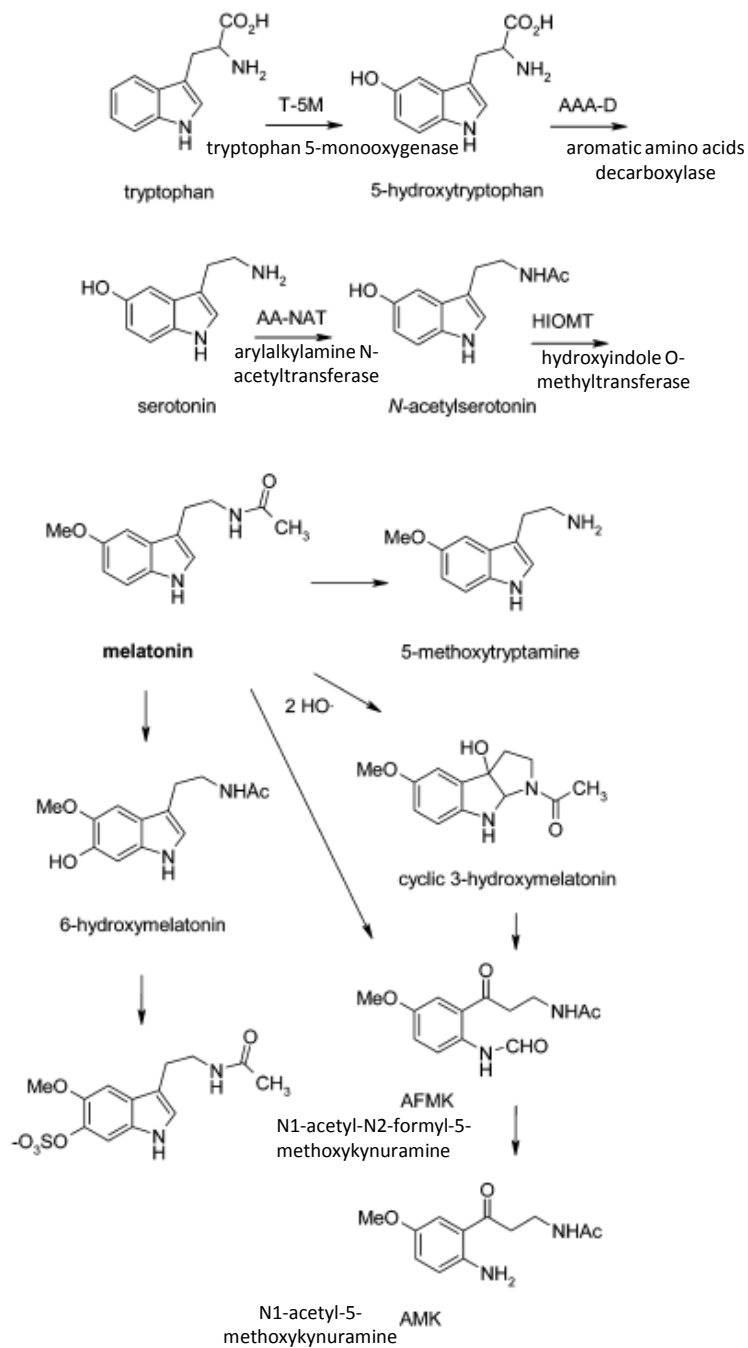


Figure 17 : Biosynthèse et dégradation de la mélatonine. (Zlotos et al ; 2013)

Les récepteurs de la mélatonine

1) La famille des récepteurs de la mélatonine couplés aux protéines G : MT₁, MT₂ et GPR50

Chez les mammifères, la famille des récepteurs de la mélatonine compte deux récepteurs de haute affinité MT₁ et MT₂ (produits des gènes *MTNR1a* et *MTNR1b*) et le récepteur orphelin GPR50 qui est apparenté à cette famille par homologie de séquence.

En 1994, le premier récepteur de la mélatonine appartenant à la famille des RCPG a été cloné à partir de mélanophores immortalisés du xénope *Xenopus Laevis* (Ebisawa et al 1994). Le clonage a montré que ce récepteur de 420 acides aminés, nommé plus tard Mel_{1C}, n'est pas exprimé chez les mammifères. La même année, le premier récepteur humain MT₁ (Mel_{1A}) a été cloné par homologie de séquence avec Mel_{1C} et l'utilisation du radio-ligand 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine a permis de confirmer qu'il s'agit d'un site de haute affinité à la mélatonine (Reppert et al ; 1994). L'année suivante, le récepteur MT₂ (Mel_{1B}) a été à son tour cloné (Reppert et al ; 1995). En 1996, Reppert *et al.* ont cloné un autre gène à partir d'une banque de cDNA humains de la glande pinéale. Ce gène encode pour une protéine de 613 acides aminés, qui affiche une forte homologie de séquence avec MT₁ et MT₂, mais qui ne lie pas la mélatonine. Cette protéine est le RCPG orphelin GPR50 (Reppert et al ; 1996). Phylogénétiquement, GPR50 s'avère être le récepteur orthologue du premier récepteur mélatonérgiques Mel_{1C} cloné chez le xénope et aurait perdu sa capacité à lier la mélatonine au cours de l'évolution (Dufourny et al ; 2008)

Les récepteurs MT₁, MT₂ et GPR50 ont été clonés chez plusieurs espèces, mais le gène *MTNR1b* donne naissance à une protéine non fonctionnelle chez le hamster, ce qui fait de ce rongeur un modèle non transgénique intéressant pour l'étude des fonctions du récepteur MT₁ (Jin et al ; 2003).

2) La structure protéique des récepteurs de la mélatonine

2.1) D'un point de vue génomique

Le génome des récepteurs de la mélatonine MT₁, MT₂ et GPR50 est composé de deux exons séparés d'environ 10 kb de nucléotides introniques. Le premier exon code pour la partie Nter jusqu'à la seconde boucle intracellulaire. L'exon 2 code pour le reste de la protéine.

Chez l'homme, les gènes codant pour MT₁, MT₂ et GPR50 sont localisés respectivement sur le chromosome 4q35.1, 11q21-22, et Xq28 (Reppert et al ; 1994) (Reppert et al ; 1995) (Reppert et al ; 1996).

2.2) Les récepteurs de la mélatonine appartiennent à la superfamille des RCPG

Chez l'homme, MT₁ et MT₂ se composent respectivement de 350 et 362 acides aminés et présentent 70 % d'identité de séquence au niveau des domaines transmembranaires (55 % au niveau de la protéine entière). GPR50 partage 45 % d'identité de séquence protéique avec MT₁ et MT₂ au niveau de leurs parties Nter communes et possède une longue queue Cter qui allonge la protéine à 613 acides aminés.

Ces récepteurs appartiennent à la famille des RCPG et constituent l'embranchement le plus proche phylogénétiquement de l'opsine (la rhodopsine inactive) (Navajas et al ; 1996) (Fredriksson et al ; 2003). Au niveau des domaines extracellulaires, MT₁ possède deux résidus asparagine sur l'extrémité Nter qui sont la cible de glycosylations. MT₂ ne possède qu'un seul site de glycosylation et GPR50 semble ne pas être glycosylé. Les trois récepteurs présentent deux cystéines sur les boucles e2 et e3 qui participent à la formation d'un pont disulfure. Ce pont est important pour la liaison du ligand et pour maintenir la cohésion des domaines TM (Mseeh et al ; 2002).

Au niveau transmembranaire et cytoplasmique, le motif consensus DRY des RCPG est remplacé par le motif NRY (l'acide aspartique D est remplacé par l'asparagine N). Ce motif est localisé entre le TM3 et la boucle i2 et forme un pont ionique avec le résidu D/E situé dans la boucle i3 adjacente (D²³² pour MT₁, D²⁴⁶ pour MT₂, et un résidu E pour GPR50). Le pont ionique est important pour le maintien de l'état inactif du récepteur en absence du ligand (Cogé et al ; 2009) (Smit et al ; 2007). Il a été montré que la mutation du motif NRY de MT₁ en motif consensus DRY des RCPG altère l'adressage membranaire, la liaison à la mélatonine et la signalisation intracellulaire de ce récepteur. Cela pourrait signifier que la mutation évolutive des récepteurs MTR leur permettant de s'adapter à la reconnaissance de la mélatonine (Nelson et al ; 2001).

Le motif NRY est suivi de deux cystéines CxxC conservées chez les RCPG. Ce motif semble être important pour l'activation de la protéine G et pour le trafic du récepteur MT₁ (Kokkola et al ; 2005).

Enfin, le motif NPXXY situé dans le TM7 des RCPG et qui est essentiel à leur activation, est remplacé par le motif NAXXY dans les trois récepteurs MT₁, MT₂ et GPR50 avec des conséquences encore inconnues.

3) Le déterminisme moléculaire responsable de la reconnaissance de la mélatonine par MT₁ et MT₂

La détermination des résidus responsable de la liaison de la mélatonine a été étudiée à l'aide d'alignements de séquences entre MT₁ et MT₂, de mutations ponctuelles, de chimères de récepteurs et à l'aide de la modélisation moléculaire. De plus, la structure de la rhodopsine, le repliement de ses domaines externes, ainsi que la détermination de résidus importants dans la liaison de ligands sur d'autres RCPG, ont contribué à la mise en évidence de plusieurs résidus impliqués dans la reconnaissance de la mélatonine par MTR. Cependant, ces résidus sont sujets à débat, possiblement du fait que la mélatonine est une molécule plutôt flexible et qui possède des groupements capables de mouvements rotatoires (Dubocovich et al ; 2010).

Plusieurs études montrent que le résidu His¹⁹⁵ de MT₁ et son équivalent His²⁰⁸ de MT₂ situés dans le TM5, sont essentiels pour la reconnaissance du groupement 5-méthoxy de la mélatonine (Navajas et al ; 1996). Aussi, l'interaction du TM5 avec des groupements méthoxy de différents ligands mélatoninergiques conduit à l'activation des récepteurs MTR par des agonistes (Mor et al ; 1998). En outre, plusieurs résidus dans les TM3, TM5, et TM7 forment des liaisons hydrogènes avec le ligand comme les Ser¹¹⁰ et Ser¹¹⁴ du TM3 de MT₁ qui interagiraient avec le groupement acétamidoethyl de la mélatonine (Conway et al ; 2001). Ces sérines ne sont pas concernées dans le cas de MT₂ pour lequel d'avantage de résidus ont été désignés (Gerdin et al ; 2003) (Mazna et al ; 2004 & 2005) (Farce et al ; 2008).

Pour le récepteur orphelin GPR50, la séquence protéique a été remodelée au cours de l'évolution par rapport au Mel_{1c} et il a perdu sa capacité à lier la mélatonine malgré le fait qu'il conserve l'histidine au niveau du TM5, qui est cruciale pour la liaison de la mélatonine. En outre, l'étude des chimères entre MT₁ et GPR50 suggèrent que le remplacement du TM4 et des boucles e2 et i1 de MT₁ dans GPR50 suffit pour restaurer une liaison de basse affinité pour la mélatonine dans le contexte de GPR50 (Conway et al ; 2000) (Gubitza & Reppert ; 2000).

4) Le profil d'expression des récepteurs de la mélatonine

Les récepteurs de la mélatonine sont majoritairement exprimés au niveau du système nerveux central, une distribution qui va de pair avec la fonction de la mélatonine comme modulateurs endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire. MT₁ et MT₂ s'expriment dans les NSC (Liu et al ; 1997) (Hunt et al ; 2001), la rétine (Alarma-Estrany et al ; 2007), le cervelet (Al-Ghoul et al 1998) et l'hippocampe (Savaskan et al ; 2002) (Lee et al ; 2010). Au niveau périphérique, ces récepteurs sont localisés au niveau du cœur, des artères coronaires et de l'aorte (Ekmekcioglu et al ; 2001 & 2003), également au niveau du foie (Venegas et al ; 2013) des poumons (Naji et al 2004) et sont exprimés par

les cellules du système immunitaires (Carrillo-Vico et al ; 2003). L'expression de MT₁ a également été rapportée au niveau du système dopaminergique (Uz et al ; 2005) et dans les cellules des glandes mammaires (Hill et al ; 2013) et des glandes surrénales (Richter et al ; 2008) tandis que MT₂ s'exprime dans les cellules adipocytaires (Brydon et al ; 2001).

GPR50 s'exprime dans l'hypophyse, l'hippocampe et dans l'hypothalamus avec une localisation plus prononcée au niveau des cellules épendimaires de l'éminence médiane et au niveau des noyaux dorso-médians de l'hypothalamus (Sidibe et al ; 2010). L'ARNm de GPR50 a également été localisé dans la rétine, le plexus choroïde, le bulbe olfactif, le cœur, l'intestin, la peau et au niveau des gonades (Drew et al ; 2001) (Hamouda et al ; 2007) (Sidibe et al ; 2010).

5) La régulation de l'expression des récepteurs MT₁ et MT₂

Plusieurs études ont révélé que la transcription de l'ARNm de MT₁ suit une rythmicité circadienne au niveau des NSC en présentant un pic qui devance celui de la synthèse de la protéine avec un délai allant de trois à huit heures (Neu et al ; 1997) (Masana et al ; 2000). Ces études démontrent également que la production de l'ARNm de MT₁ est potentialisée durant la phase obscure, tandis que l'expression de la protéine (révélée par la liaison à la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine) présenterait deux pics : un premier au début du jour et un second au moment de la transition entre le jour et la nuit. Cette rythmicité est entraînée à la fois par la photopériode, par les gènes de l'horloge interne au niveau des NSC et dépend également de la concentration de la mélatonine environnante (Poirel et al ; 2002) (Masana et al ; 2000) (Gauer et al ; 1994).

La production cyclique du messager et de MT₁ est conservée hors des NSC, notamment dans la glande pituitaire (Gauer et al ; 1994) et dans certains organes périphériques. Au niveau du cortex et des glandes surrénales par exemple, l'expression de l'ARNm est diminuée le jour, tandis que la liaison à la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine atteint un maximum à la transition entre le jour et la nuit (Richter et al ; 2008). Une variation circadienne des messagers et des récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂ a aussi été montrée chez le rat au niveau du foie et la variation d'expression est plus prononcée avec des concentrations de mélatonine plus élevées (Venegas et al ; 2013).

L'ensemble de ces études valide que l'expression des récepteurs de la mélatonine ne coïncide pas avec le pic de sécrétion de l'hormone durant la nuit. Le décalage est probablement dû à la désensibilisation des récepteurs par la mélatonine. En effet, MT₁ et MT₂ sont négativement régulés suite à une exposition prolongée à l'agoniste, sachant que les concentrations circulantes de la mélatonine aussi bien diurne que nocturne sont capables d'activer ces récepteurs (Dubocovich et al ; 2010). Gerdin *et al.* montrent ainsi qu'au niveau des NSC de rat, une exposition de huit heures à des concentrations physiologiques de mélatonine (de 30 à 400 pM) induit l'internalisation de MT₂ (Gerdin et al ; 2004a).

Sous les mêmes conditions expérimentales, MT₁ ne semble pas subir une internalisation (Gerdin et al ; 2004a) (Gerdin et al ; 2004b). Le phénomène de désensibilisation dépend en effet à la fois du récepteur, de la concentration de l'agoniste et du type cellulaire. Aussi, MT₁ subit une désensibilisation rapide dans les neurones GT1-7 après une courte exposition (quelques minutes) à 10 nM de mélatonine. Cette internalisation dépendrait de la β -arrestine-1 et serait facilitée par l'activité constitutive de MT₁ (Roy et al ; 2001).

Par ailleurs, dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), MT₁ et MT₂ subissent une internalisation suite à une exposition à des concentrations pharmacologiques de mélatonine (supérieures à 100 nM). De telles concentrations circulantes de l'hormone chez l'Homme sont facilement atteintes suite à une administration journalière de 1 mg de mélatonine (dans le cadre par exemple d'une complémentation alimentaire qui est autorisée dans de nombreux pays). A long terme, cette posologie poserait problème de part les conséquences qu'elle peut avoir sur le profil d'expression des récepteurs de la mélatonine et notamment sur la re-sensibilisation de ces derniers. D'ailleurs, internalisé par l'application de fortes doses de mélatonine, le récepteur MT₂ n'est re-sensibilisé qu'après vingt-quatre heures, comparé à la re-sensibilisation qui se produit seulement huit heures après une internalisation induite par de plus faibles doses de mélatonine (Dubocovich et al ; 2010).

6) Les polymorphismes génétiques décrits pour les récepteurs humains de la mélatonine

Selon nos connaissances actuelles, les polymorphismes décrits pour les récepteurs MT₁ et MT₂ sont différents tant par leur nombre que par leurs dérégulations physiologiques qui s'ensuivent.

Chez les personnes déclarées autistes, trois mutations ont été décrites pour le récepteur MT₁ : la mutation I49N qui entraîne un défaut de liaison de la mélatonine et G166E ainsi que I212T qui causent un défaut de recrutement de la protéine à la surface cellulaire (Chaste et al ; 2010). Cependant, ces mutations n'ont pas été directement mises en cause dans l'autisme.

Au niveau du récepteur MT₁, la prévalence des variants R54W et A157V est plus importante chez les personnes qui souffrent de troubles du sommeil par rapport à la population générale (Ebisawa et al ; 1999), (Morcuende et al ; 2003).

Pour les deux récepteurs MT₁ et MT₂ les SNP (single nucleotide polymorphism) exoniques au niveau des gènes *MTNR1a* rs7665392 (MT₁) et *MTNR1b* rs10765576 (MT₂) sont à l'origine d'un risque plus faible de développement du cancer du sein chez les femmes chinoises (Deming et al ; 2012).

Au niveau du récepteur MT₂, les variants décrits sont très nombreux et concernent notamment des maladies métaboliques : chez la population européenne, le variant commun G du SNP *MTNR1b*-rs10830963 est associé à une concentration plasmatique plus élevée de glucose à jeun et à des

altérations au niveau de la sécrétion du glucose (Lyssenko et al ; 2009) (Prokopenko et al ; 2009) (Karamitri et al ; 2013).

L'association de ce même SNP avec deux allèles différents : *MTNR1b* rs10830963-rs4753426GC et rs10830963-rs4753426GT est un facteur de risque élevé de développement de différentes formes de sclérose en plaque chez la population finlandaise (Natarajan et al ; 2012). De plus, plusieurs autres mutations sont décrites pour le récepteur MT_2 : G24E qui est associée à un indice de masse corporelle élevé (Andersson et al ; 2010) et 36 mutations rares qui sont associées à un risque élevé de développement du diabète de type II. Certains de ces mutants : A42P ; L60R et P95L ne lient pas la mélatonine et sont non fonctionnels concernant les voies de signalisations étudiées. Le mutant R128L lie la mélatonine mais n'active pas la protéine G et d'autres mutants tels que A52T et A74T n'activent pas la protéine G mais engendrent une signalisation MAPK via la voie dépendante des β -arrestines. Les mutations R128L, A52T et A74T, sont alors à l'origine d'une signalisation biaisée suite à l'activation du récepteur par la mélatonine (Bonnefond et al ; 2012).

En ce qui concerne GPR50, trois polymorphismes sont rapportés au niveau de la longue queue Cter : (Δ 502–505 ; Thr⁵³²Ala et Val⁶⁰⁶Ile). Ces mutations sont associées à la survenue de désordres mentaux tels que les troubles bipolaires et la schizophrénie (Thomson et al; 2005), des troubles métaboliques sont également décrits comme l'augmentation des taux de triglycérides et une diminution des taux de HDL (Bhattacharyya et al J Lipid Res 2006) ; et le polymorphisme rs2072621 dans l'intron du gène de GPR50 est associé avec les troubles affectifs saisonniers (Delavest et al; 2012).

7) La pharmacologie des récepteurs MT_1 et MT_2

7.1) La signalisation des récepteurs MT_1 et MT_2

L'activation des récepteurs de la mélatonine génèrent une cascade de signalisation qui passe par l'activation de la protéine G hétérotrimérique et par la dissociation de cette dernière en sous-unités G_α et $G\beta\gamma$ qui activent des effecteurs variés.

MT_1 et MT_2 inhibent l'AC (Adénylate Cyclase) par les isoformes G_{ai2} , G_{ai3} et G_{ai1} 6 de manière dépendante de la toxine pertussique (la toxine inhibe les protéines G_i et G_o par leur ADP-ribosylation) (Brydon et al ; 1999) (Lai et al ; 2002). L'inhibition de l'AC entraîne alors la diminution des taux d'AMPc, l'inhibition de la protéine kinase PKA et la baisse de phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) (Witt-Enderby et al ; 1998). Le récepteur, MT_1 régule également les canaux potassiques rectifiant entrants ($Kir3$) via l'activation de la protéine G (Nelson et al ; 1996). Aussi, dans certains types cellulaires MT_1 peut augmenter l'activité des phospholipases $PLC\beta$ et $PLC\epsilon$ par la voie G_q ou suite à la libération des $G\beta\gamma$. La PLC convertit le phosphatidylinositol PIP2 en DAG (diacylglycérol) et en inositol 1,4,5-triphosphatase IP3, s'ensuit

l'activation de la protéine kinase PKC et de la calmoduline kinase (CaMK) qui active la signalisation calcique intracellulaire et la voie MAPK notamment avec l'activation de ERK, JNK et p38. Cette voie est notamment décrite dans les cellules humaines du cancer du sein MCF-7 qui expriment MT₁ de manière endogène (Chan et al ; 2002). La cascade de signalisation classique de JNK peut engendrer la modulation de l'activité de plusieurs facteurs de transcription incluant c-Jun, ATF-2 et Elk-1, ce qui promeut l'activité transcriptionnelle d'AP-1 (Activating Protein-1) et induit la transcription c-fos (Karin et al ; 1997). Ainsi, par l'activation de CREB, AP-1, c-fos et c-Jun, la mélatonine peut réguler la transcription génétique, les processus de prolifération et de survie cellulaire ainsi que l'apoptose (Figure 18).

7.2) Les ligands mélatonérgiques:

La spécificité d'un ligand à un récepteur se traduit par une affinité et/ou efficacité supérieure d'au moins 100 fois par rapport à celle pour un autre récepteur. Ces ligands sont des outils indispensables à la caractérisation des récepteurs d'intérêt *in vivo* et *in vitro* et ce, d'un point de vue de profil d'expression des récepteurs, de régulation et de signalisation.

L'étude des profils d'expression tissulaires des récepteurs mélatonérgiques a été notamment résolue par l'utilisation d'agonistes radioactifs : la [3H]-mélatonine, et le N-Bromoacetyl-2-iodo-5-methoxytryptamine (¹²⁵I-BIM), rapidement remplacés par la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonine pour laquelle les MTR affichent une affinité de l'ordre du picomolaire (MT₁, kd = 20 pM ; MT₂, Kd =160 pM). Cependant ces ligands ne discriminent pas entre les deux sous-types de récepteurs, d'où la nécessité de développer des ligands radioactifs sélectifs (Legros et al ; 2013 a & b). En terme de ligands non radioactif et non sélectif, il existe la iodo-mélatonine qui semble être plus stable que la mélatonine et particulièrement intéressante pour les études *in vitro* (MT₁, Ki = 0.068 nM; MT₂, Ki = 0.22 nM), l'antagoniste Luzindole (MT₂, Ki = 44.7 nM ; MT₁, Ki = 603 nM) et aussi quelques agonistes commercialisés : Ramelteon/Rozerem[®] qui est utilisé pour le traitement de l'insomnie et l'Agomélatine/Valdoxan[®] qui est également un antagoniste pour les récepteurs 5-HT_{2C}, prescrite pour le traitement de la dépression. Ces ligands commercialisés affichent un temps de demi-vie 3 à 4 fois supérieur à celui de la mélatonine. Aussi, le développement d'analogues mélatonérgiques avec des temps de demi-vie encore plus longs, ou qui sont combinés à des formes de libération prolongées du principe actif, constitue un challenge pharmaceutique pour le traitement de divers troubles pour lesquels la mélatonine a des effets.

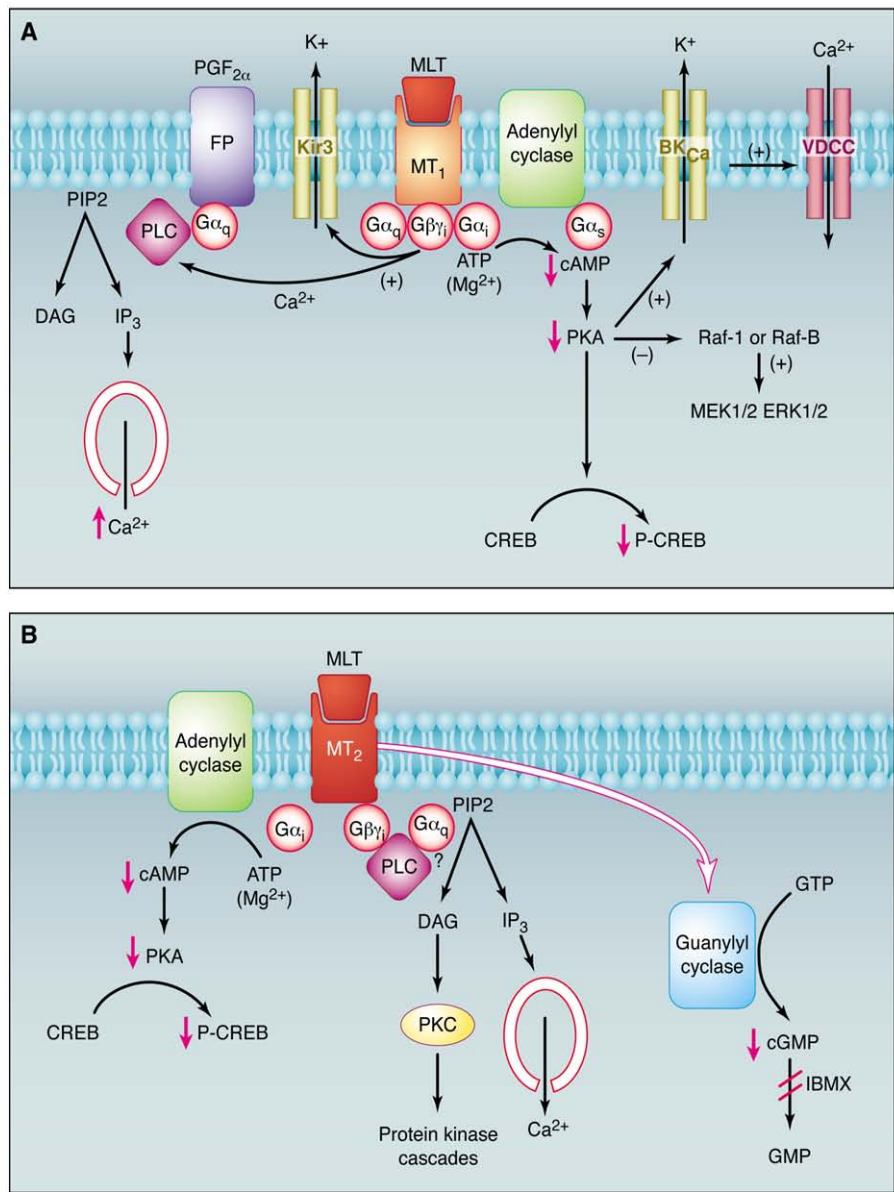


Figure 18 : Les voies de signalisation des récepteurs A) MT_1 et B) MT_2 .
D'après (Masana & Dubocovich ; 2001)

En ce qui concerne les ligands sélectifs pour MT₁ ou pour MT₂, les ligands de MT₁ sont de loin les plus rares et sont au mieux 100 fois plus affins pour MT₁ que pour MT₂. La plupart de ces ligands sont bivalents et sont composés de deux analogues de la mélatonine reliés par un linker chimique. Les plus discriminatoires sont l'agoniste partiel 58b (MT₁, Ki = 0.55 nM; MT₂, Ki = 51.3 nM), l'agoniste plein 59 (MT₁, Ki = 0.37 nM; MT₂, Ki = 4.22 nM) et l'antagoniste 57a (MT₁, Ki = 0.5 nM ; MT₂, Ki = 112 nM).

Les ligands sélectifs pour MT₂ sont plus nombreux mais largement représentés par des antagonistes ou par des agonistes inverses. En effet, MT₂ présente une poche de liaison hydrophobe qui n'est pas impliquée dans la liaison de la mélatonine et qui n'est pas retrouvée chez MT₁. Il a été montré que l'interaction de ligands avec cette poche résulte en l'inactivation de MT₂. Les ligands les plus utilisés sont l'antagoniste 4-P-PDOT (4-phenyl-2-propionamidotetralin) (MT₂, Ki = 1.5 nM ; MT₁, Ki = 501 nM), l'agoniste partiel 46a (MT₂, Ki = 0.01 nM ; MT₁, Ki = 72 nM), l'agoniste IIK7 (MT₂, Ki = 0.05 nM ; MT₁, Ki = 4.47 nM) et l'agoniste plein 50a (MT₂, Ki = 0.012 nM ; MT₁, Ki = 9.2 nM).

Tous les ligands sus- cités ont été caractérisés dans différents types cellulaires pour les récepteurs humains: NIH-3T3, CHO, Cos-7, et HEK293 ; et ont été décrits dans les publications suivantes: (Zlotos et al ; 2013), (Dubocovich ; 2007), (Dubocovich et al ; 2010) et (Faust et al ; 2000).

7.3) La dimérisation des récepteurs de la mélatonine

Les trois récepteurs MT₁, MT₂ et GPR50 sont capables de former des complexes. En utilisant notamment les techniques de co-immunoprecipitation et de BRET, on a pu montrer que les récepteurs MT₁ et MT₂ forment des homomères et des hétérodimères dans les cellules HEK293; et que MT₂ montre une préférence pour la formation d'hétérodimères avec MT₁ qui est 3 à 4 fois supérieure que celle de la formation d'homodimères MT₂/MT₂. Au sein du dimère MT₁/MT₂, le profil pharmacologique de MT₂ subit des changements. En effet, MT₁ ne lie pas les antagonistes de MT₂ 4P-PDOT et Luzindole mais MT₂ en complexe avec MT₁ affiche une affinité augmentée pour ces deux ligands par rapport à l'homodimère MT₂/MT₂ (Ayoub et al ; 2002) (Ayoub et al; 2004).

De son côté, GPR50 dimérise avec les deux récepteurs de la mélatonine et n'influence pas la signalisation de MT₂ au sein du complexe GPR50/MT₂ contrairement à GPR50/MT₁. GPR50 altère les sites de liaison de haute affinité à la mélatonine pour le récepteur MT₁ et inhibe le couplage à la protéine G ainsi que le recrutement des β -arrestines ; le tout de manière dépendante de la présence de son long domaine Cter (Levoye et al ; 2006).

Les fonctions physiologiques de la mélatonine et de ses récepteurs

La mélatonine est une hormone responsable de multiples effets à l'image de la diversité de ses sites de synthèses, de ses tissus cibles, de la distribution de ses récepteurs et de ses voies de signalisations variées.

Les principaux effets de la mélatonine sont régulés par les facteurs environnementaux et passent par l'activation de ses récepteurs MT₁ et MT₂. Cependant, d'autres effets qui dépendent des propriétés physico-chimiques de la mélatonine sont également relatés, ils concernent notamment des effets antioxydants responsables des phénomènes de protection cellulaire en conditions de stress oxydant et d'inflammation par exemple.

1) Les effets de la mélatonine sur la rythmicité circadienne

Les effets de la mélatonine dans l'entraînement du rythme circadien ont été mis en évidence chez les rongeurs maintenus dans l'obscurité. L'apport exogène de la mélatonine ajuste le rythme endogène à 24 h ; sans quoi, le libre court fait dériver les cycles, en avance ou en retard, en fonction de l'âge de l'animal, de son sexe et des stimuli externes. De plus, la fenêtre de sensibilité pour la mélatonine se situe au moment de la transition jour/nuit qui coïncide avec le pic d'expression des récepteurs MT₁ et MT₂ chez le rat (Poirel et al ; 2002).

Chez l'homme, la mélatonine stabilise et renforce la rythmicité circadienne et promeut le sommeil (Armstrong ; 1989). Wehr *et al.* montrent que le « jour biologique » correspond à un état physiologique où la synthèse de la mélatonine est au plus bas, la température corporelle est élevée et des taux de cortisol importants, amenant à un état d'éveil. La « nuit biologique » quant à elle, coïncide avec une sécrétion accrue de mélatonine, une température corporelle basse, des taux de cortisol bas et une augmentation des REM (Rapid Eye Mouvement) caractéristiques de l'état d'endormissement (Wehr et al ; 2001). Les différents paramètres qui définissent le jour et la nuit biologique se chevauchent chez les personnes souffrant de troubles de rythmes circadiens comme les sujet aveugles (ayant des lésions du nerf optique ou du tractus rétino-hypothalamique), les travailleurs de nuit et les personnes souvent sujettes au jet-lag .D'ailleurs, 75% des sujets aveugles rapportent une mauvaise qualité de sommeil (Léger et al ; 1996) et les travailleurs de nuit souffrent de fatigue, de troubles de sommeil et de troubles métaboliques. Pour ces personnes, une chrono-administration de la mélatonine ou de ses analogues, de manière adaptée au mode de vie de chaque patient, contribue à ré-ajuster le rythme endogène et à améliorer la qualité du sommeil. Chez l'homme également, la fenêtre de sensibilité pour la mélatonine se ferait au moment de la transition jour/nuit (Arendt et al ; 1997).

Le mécanisme par lequel la mélatonine entraîne le rythme endogène réside dans une action directe au niveau des quelques 30.000 neurones des deux noyaux supra-chiasmatisques. D'une part, la

mélatonine diminue l'activité électrique des neurones des NSC par un effet hyperpolarisant en potentialisant l'entrée de chlorure via les récepteurs GABA_A suite à l'activation de MT₁ (Liu et al ; 1997) (Wan et al ; 1999). D'autre part, la mélatonine entraîne l'horloge biologique et induit un décalage de phase de l'activité circadienne des neurones du NSC via MT₁ et MT₂ (Hunt et al ; 2001). Par exemple *in vitro*, le décalage induit par la mélatonine sur une culture de cellules des NSC est de 3 à 4 heures maximum et dépendant de la dose de la mélatonine appliquée (Benloucif & Dubocovich ; 1996).

Enfin, plusieurs organes périphériques possèdent une activité oscillatoire des gènes de l'horloge qui est indépendante de la rythmicité dans le NSC. Par exemple, les gènes *Per* et *Cry2* oscillent au niveau de la glande surrénale et influencent le relargage de l'adrénocorticotrophine ACTH. L'amplitude de l'oscillation est plus importante dans la souche de souris C3H qui synthétise la mélatonine, que dans la souche C57BL déficiente en mélatonine (Torres-Farfan et al ; 2006). De plus MT₁ est exprimé au niveau du cortex de la glande surrénale et l'activation de MT₁ est directement responsable de l'effet direct de la mélatonine dans l'inhibition du relargage du cortisol (Torres-Farfan et al ; 2003).

2) La régulation des rythmes saisonniers et de la reproduction chez les animaux

Chez les animaux photopériodiques, la durée de la sécrétion de la mélatonine est calquée sur la durée de la nuit qui varie tout au long de l'année. Le profil de libération de la mélatonine sert donc de repère pour la détermination des périodes favorables à la reproduction (Malpaux et al ; 1999) (Tamarkin et al ; 1985). De plus l'expression des récepteurs de la mélatonine dans les gonades (testicules et ovaires) suggère un effet direct de la mélatonine sur la reproduction (Izzo et al ; 2010) (Wang et al ; 2012).

Deux structures cérébrales sont la cible de la régulation par la mélatonine via ses récepteurs: la pars tuberalis PT de l'adénohypophyse et les noyaux hypothalamiques (termes généralisés car différents noyaux sont impliqués chez différentes espèces). La mélatonine régule la sécrétion de la prolactine en agissant sur les récepteurs MT₁ de la PT. La prolactine régule à son tour la lactation (durant les jours longs de l'année), l'activité gonadique et la mue saisonnière (Lincoln & Clarke ; 1994) (Duncan ; 2007). Au niveau des noyaux hypothalamiques, l'hormone GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) est connue depuis les années soixante-dix comme promoteur de synthèse et de sécrétion des hormones gonadotropes LH et FSH. Cependant, en dépit de nombreuses études, la modulation de la GnRH par la mélatonine est encore un sujet à controverse. Pour cause, la mélatonine peut affecter les neurones GnRH directement, ou indirectement via des circuits neuronaux variés

(Malpaux et al ; 2001). Par exemple, il a été montré que la mélatonine inhibe indirectement l'expression de la GnRH chez le hamster sibérien (Simonneaux & Ancel ; 2012) et chez la grande gerboise (El Qandil et al ; 2005) mais stimulerait la sécrétion de la GnRH *in vitro* dans la lignée de neurones à GnRH GT1-7 via l'activation de MT₁ (Kelestimur et al ; 2012).

Par ailleurs, l'hormone GnIH (Gonadotropin-Inhibitory Hormone) découverte il y a une quinzaine d'années, est décrite comme un régulateur négatif des fonctions gonadiques à l'inverse de la GnRH. Cette hormone semble subir une modulation sous l'influence directe de la mélatonine (Tsutsui et al ; 2013).

En ce qui concerne l'homme, bien que la reproduction ne soit pas influencée par la photopériode, la mélatonine peut améliorer la qualité des cellules germinales ainsi que la réceptivité de l'endomètre (Aleandri et al ; 2006).

3) Les effets de la mélatonine sur le plan neuronal

La mélatonine a souvent été décrite comme un modulateur neuronal régulant différents aspects de la survie neuronale et de la transmission synaptique. Cependant, la généralisation de ces effets n'est pas évidente et les études aboutissent à des conclusions parfois contradictoires. De manière générale, la mélatonine est considérée comme un puissant neuroprotecteur et comme un inhibiteur de la transmission synaptique. Malheureusement, les mécanismes de cette régulation sont encore inconnus, tout comme l'implication des récepteurs MT₁ et MT₂ dans la médiation de ces effets. Ce dernier point fait notamment partie des principaux résultats de ce travail de thèse.

3.1) L'effet de la mélatonine sur la plasticité neuronale

La plasticité neuronale se traduit par la capacité des neurones à s'adapter aux changements externes. A très court terme, elle concerne les modifications au niveau du profil de libération des neurotransmetteurs et à long terme elle se manifeste par la restructuration des synapses suite à des lésions neuronales ou à des traitements pharmacologiques par exemple (Benes et al ; 1985) (Ingham et al ; 1998). La mélatonine a été proposée comme modulateur de l'excitabilité neuronale au niveau de l'hippocampe en inhibant la facilitation neuronale qui est cruciale pour les processus de mémorisation et d'apprentissage (El-Sherif et al ; 2003). La facilitation neuronale se traduit au niveau pré-synaptique par la capacité du neurone à libérer d'avantage de neurotransmetteurs au deuxième stimulus par rapport au premier, car la machinerie de l'exocytose est déjà mise en place et que les taux de calcium sont encore élevés. Par ailleurs, la dépression neuronale à long terme se traduit par la capacité des neurones de l'hippocampe et du cortex à rester actifs pendant plusieurs semaines suite à une première activation par une série de stimuli à haute fréquence. Ce dernier phénomène est perdu dans les souris KO MT₂ (Larson et al ; 2006).

La mélatonine inhibe également le relargage de la dopamine et du glutamate à partir des neurones (Escames et al ; 2001) (Zisapel et al ; 1982) ainsi que la libération de la norépinephrine au niveau de la glande pinéale de rat (Chuluyan et al ; 1991).

3.2) L'effet neuroprotecteur de la mélatonine

L'excito-toxicité est un processus pathologique de dégénérescence neuronale suite à une stimulation prolongée par le glutamate ou par ses analogues (NMDA = N-méthyl-D-aspartate et l'acide kainique). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur et une concentration importante dans la fente synaptique stimule les neurones post-synaptiques et entraîne un influx massif de calcium qui perturbe le potentiel membranaire mitochondriale et conduit à l'apoptose. Cette excito-toxicité est observée lors d'accidents vasculaires et des traumatismes cérébraux, ainsi que suite à une ischémie pendant laquelle le glutamate extracellulaire n'est pas déléché par le flux sanguin.

Suite à une injection de kainate chez le rat ou suite à des dommages causés par un excès de glutamate, la mélatonine protège des dommages excito-toxiques au niveau de l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale et au niveau du cervelet, et ce par un effet antioxydant inhérent à sa structure moléculaire capable d'interagir avec plusieurs formes de radicaux libres (Giusti et al ; 1996) (Lipartiti et al ; 1996) (Uchida et al ; 2004) (Skaper et al ; 1999). Par exemple, la mélatonine protège les neurones de l'hippocampe des dommages d'une ischémie cérébrale induite expérimentalement chez le rat. Une seule administration continue à de fortes doses de mélatonine pendant 6 h seulement, protège de la dégénérescence de 75 % de neurones pyramidaux et préserve les épines dendritiques observées 120 jours après l'ischémie cérébrale (González-Burgos et al ; 2007).

La mélatonine exerce également un effet neuroprotecteur après des lésions au niveau de la moelle épinière chez le rat. Elle améliore le score neurologique des animaux et aide à préserver l'ultrastructure de la moelle spinale. La mélatonine améliore aussi les performances de mémorisation et d'apprentissage chez le rat après une hyperhomocystéinémie (Gül et al ; 2005) (Baydas et al ; 2005) et protège de la toxicité liée à la protéine β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Chyan et al ; 1999) (Pappolla et al ; 2002).

4) La mélatonine et ses récepteurs dans la rétine

Au niveau de l'œil, la mélatonine pinéale peut facilement atteindre la plupart des structures oculaires par voie sanguine, de plus d'être sécrétée localement par plusieurs structures : la rétine; l'épithélium ciliaire; le cristallin; la cornée; l'humeur vitrée; etc (Wiechmann & Summers ; 2008). Ici, nous allons focaliser les paragraphes suivants sur le rôle de la mélatonine au niveau de la rétine.

La rétine est un tissu nerveux qui tapisse la face interne de l'œil et constitue une partie intégrante du système nerveux central. Elle est composée de cellules gliales et de six types de

neurones spécialisés : cônes, bâtonnets, cellules horizontales et bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires. Au niveau de la rétine, la mélatonine est principalement sécrétée par les cellules photoréceptrices de manière circadienne (Liu et al ; 2004) (Chaurasia et al ; 2006). Comme dans les pinéaloocytes, l'enzyme AANAT détermine les taux de synthèse de la mélatonine. L'activation de l'AANAT se fait directement sous le contrôle de la PKA et sous le contrôle des facteurs de transcription Bmal1/Clock qui constituent une horloge interne indépendante des NSC (Haque et al ; 2010). La synthèse de la mélatonine est entre-autre inhibée par la dopamine qui est sécrétée par les neurones amacrines pendant le jour et qui active ses récepteurs D2/D4 au niveau des photorécepteurs afin de diminuer les taux d'AMPC et inhiber l'expression de AANAT (Jackson et al ; 2009).

Les récepteurs MT₁ et MT₂ sont exprimés dans tous les types cellulaires de la rétine, notamment par les photorécepteurs, les neurones ganglionnaires ainsi que par les cellules et amacrines et se trouvent dans la couche plexiforme qui représente les contacts synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules amacrines (Wiechmann & Summers ; 2008).

4.1) La mélatonine et la photosensibilisation des photorécepteurs

La mélatonine module la sensibilité et l'adaptation de la rétine envers les changements lumineux ambiants. La réponse de la rétine à des flashes lumineux peut être enregistrée électriquement par un électrorétinogramme ERG qui visualise une intégration des signaux allant de l'excitabilité des photorécepteurs au message nerveux relayé par les cellules ganglionnaires qui génèrent un potentiel d'action mesurable. Suite à un stimulus lumineux pendant le jour, ERG mesure la réponse des cellules en cônes responsables de la vision des couleurs. Dans l'obscurité, ERG mesure la réponse des cellules en bâtonnets responsables de la vision nocturne.

De nuit, la mélatonine augmente la sensibilité des cellules en bâtonnets à la lumière et améliore la vision nocturne dans le cadre d'une conduite de voiture à faible luminosité par exemple. Cependant une sensibilité accrue des bâtonnets à la lumière peut causer leur dégénérescence et il a été observé que la mélatonine apportée de manière exogène, augmente la sensibilité et les dommages des photorécepteurs par la lumière (Wiechmann & O'Steen; 1999). Aussi, l'application de l'antagoniste Luzindole protège de ces dommages, ce qui montre l'implication des récepteurs mélatonérgiques dans cet effet (Sugawara et al ; 1998). Ceci est notamment le sujet du premier article de ce rapport de thèse.

4.2) La mélatonine module la neurotransmission au niveau de la rétine

Au niveau de la rétine, la dopamine et la mélatonine représentent respectivement la signature chimique du jour et de la nuit. La dopamine est sécrétée par les cellules amacrines sous l'effet du glutamate qui est libéré par les photorécepteurs. Ce neurotransmetteur inhibe la synthèse de la mélatonine par les photorécepteurs durant le jour (Tosini & Dirden ; 2000). La nuit, la mélatonine inhibe le relargage de la dopamine au niveau des neurones amacrines en activant les récepteurs de la

mélatonine exprimés dans ces cellules. Ainsi, cet antagonisme mutuel entre la dopamine et la mélatonine assure la rythmicité circadienne au niveau de la rétine (Dubocovich ; 1983). De plus, la mélatonine (via MT₁ et MT₂) potentialise le relargage du GABA au niveau de la couche granuleuse interne qui inhibe la sécrétion de la dopamine (Boatright et al ; 1994) (Fujieda et al ; 1999). Cet exemple de régulation est traité dans la conclusion de ce manuscrit comme support pour nos résultats expérimentaux.

5) Autres effets de la mélatonine

Outre les fonctions sus-citées, la mélatonine exerce des effets différents de plus en plus relatés dans la littérature. En 2013, plus de 1000 citations concernant la mélatonine ont été répertoriées dans Pubmed.

Nous avons vu que la mélatonine est sécrétée par la glande pinéale mais aussi par plusieurs organes périphériques qui expriment souvent les récepteurs MT₁ et/ou MT₂: le tractus gastro-intestinal, la rétine, le foie, les reins, la thyroïde, la peau, le thymus, etc.

Cette hormone est capable de traverser la barrière hématoïétique et circule dans différents fluides corporels : le sang, le liquide céphalo-rachidien, la bile, la salive, le liquide synovial, le lait maternel et le liquide amniotique. Chez les mammifères, le pic de concentration de la mélatonine plasmatique est de 0,5 nM et peut atteindre une concentration locale de 1 µM aux alentours des organes sécréteurs (Acuña-Castroviejo et al ; 2014). La mélatonine, à faibles doses (circulantes) et/ou à fortes doses (aux abords des organes sécréteurs) exerce un rôle protecteur au niveau cardiovasculaire et prévient de la formation des plaques d'athéromes (Favero et al ; 2014). Elle est aussi impliquée dans la relaxation des cardiomyocytes par l'activation de MT₁ (Doolen et al ; 1998). La mélatonine émerge également comme un important médiateur métabolique avec des fonctions non négligeables dans le diabète de type 1 et 2, elle module la sécrétion de l'insuline à partir des cellules β -pancréatiques et régule les taux de glucose sanguin par l'activation de ses récepteurs (Karamitri et al ; 2013) (Fu et al ; 2013) (Bazwinsky-Wutschke et al ; 2014). La mélatonine influence la progression du cancer du foie avec des effets souvent pro-apoptotiques (Jaworek et al ; 2013) (Bizzarri et al ; 2013). Cependant, la mélatonine sécrétée par les cellules du tractus gastro-intestinal prévient du développement du cancer colorectal au niveau local (Glenister et al ; 2013) et peut avoir des effets anticancéreux d'un point de vue général (Di Bella et al ; 2013). L'hormone prévient également des dommages d'une irradiation UV sur la peau humaine (Scheuer et al ; 2013), exerce un effet protecteur sur les cellules de l'immunité innée et joue un rôle dans la potentialisation de la réponse immunitaire : humorale via MT₂ et cellulaire via MT₁ (Calvo et al ; 2013) (Drazen & Nelson ; 2001) (Vishwas & Haldar ; 2013).

La mélatonine possède aussi des effets anti-inflammatoires (Mauriz et al ; 2013) et pourrait même avoir des effets anti-nociceptifs (Srinivasan et al ; 2014).

Par ailleurs, les dérégulations de synthèse ou de rythmicité de la mélatonine ainsi que les polymorphismes et les changements d'expression de ses récepteurs, sont rapportés dans plusieurs maladies psychiatriques et neurodégénératives telles que l'autisme (Tordjman et al ; 2013), les troubles de l'humeur tels que la dépression (Lanfumey et al ; 2013) et la schizophrénie (Vigano et al ; 2001) ainsi que dans les troubles obsessionnels compulsifs (Catapano et al ; 1992).

La mélatonine est notamment un bio-marqueur dans la progression de la maladie de Parkinson (Sharma et al ; 2013) et sa libération ainsi que l'expression de ses récepteurs sont sujettes à une déclinaison avec le vieillissement, coïncidant avec l'apparition de troubles divers liés à l'âge (Sarlak et al ; 2013) (Sánchez-Hidalgo et al ; 2009) (Hill et al ; 2013).

LA PARTIE RESULTATS

1) ARTICLE 1

Heteromeric MT₁/MT₂ Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function

Kenkichi Baba*, **Abla Benleulmi-Chaachoua***, Anne-Sophie Journé, Maud Kamal, Jean-Luc Guillaume, Sébastien Dussaud, Florence Gbahou, Katia Yettou, Cuimei Liu, Susana Contreras-Alcantara, Ralf Jockers* and Gianluca Tosini*

*** co-premier et co-dernier auteur**

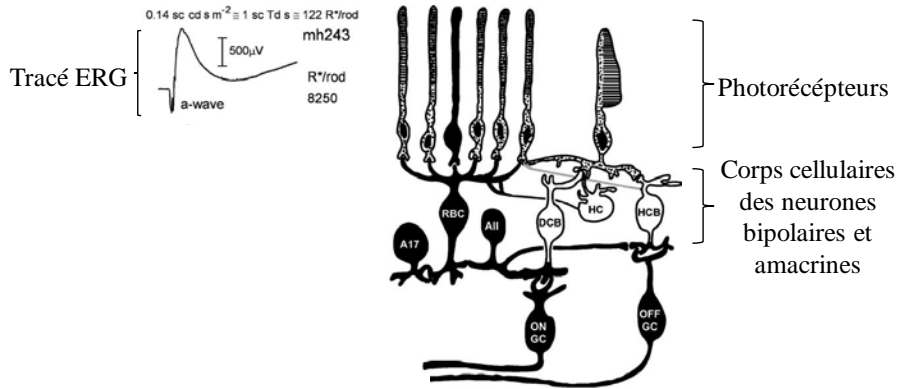
Science Signaling, 2013 Oct 8;6(296):ra89. doi: 10.1126/scisignal.2004302

Introduction

Les récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂ présentent un profil d'expression tissulaire assez similaires, notamment au niveau du système nerveux central (Dubocovich et al ; 2010). Ils activent les mêmes protéines G, par contre, seul MT₁ peut également activer Gq/11 dans les cellules transfectées (Brydon et al ; 1999b). En ce qui concerne les rôles physiologiques, MT₁ et MT₂ présentent une redondance fonctionnelle jusqu'à une certaine mesure, mais sont aussi responsables de fonctions physiologiques distinctes. Par exemple, au niveau des noyaux suprachiasmatiques, MT₁ est responsable de la diminution de l'activité des neurones du NSC (neuronal firing), tandis que MT₂ est responsable du décalage de phase dans l'activation de ces neurones (Liu et al ; 1997) (Dubocovich et al ; 1998). Par ailleurs, au niveau de l'artère caudale chez le rat, MT₁ entraîne une vasoconstriction, tandis que MT₂ est responsable d'une vasodilatation vasculaire (Geary et al ; 1997) (Masana et al ; 2002). Ces différences fonctionnelles ont notamment été mises en évidence chez les souris transgéniques KO-MT₁ et KO-MT₂ et par l'utilisation de ligands spécifiques.

Aussi, les récepteurs MT₁ et MT₂ sont exprimés dans plusieurs types cellulaires rétiniens (Alarma-Estrany et al ; 2007). La rétine est un organe photosensible qui constitue un prolongement spécialisé du système nerveux central. Elle est composée de plusieurs types de cellules nerveuses dont les cônes (responsables de la vision de jour) et les bâtonnets (responsables de la vision dans l'obscurité ou vision scotopique). L'activité des cellules rétiniennes, en réponse à des flashes de lumière, peut être mise en évidence par un électrorétinogramme (ERG). Au niveau des photorécepteurs, le tracé ERG est composé de deux ondes (a) et (b) : l'onde (a) rend compte de l'activité des photorécepteurs, tandis que l'onde (b) représente la réponse des cellules bipolaires sous-jacentes (Robson et al ; 2004).

A



B

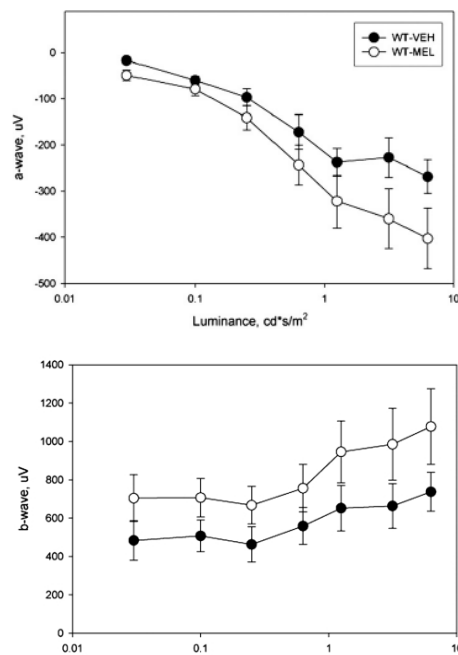


Figure 19 : Effet de la mélatonine au niveau des photorécepteurs .A) Tracé ERG chez des souris adaptées à l'obscurité en réponse à des flashes lumineux (Robson et al ; 2004). B) Quantification de la réponse ERG chez des souris WT adaptées à l'obscurité (30 minutes) pendant le jour (ZT6). L'amplitude de l'onde (a) descendante augmente en réponse à des flashes de lumière d'intensité croissante (0.11–5.85cd*s/m²). L'administration de la mélatonine par injection intrapéritonéale (1mg/kg) potentialise l'amplitude de l'onde (a) et (b) (Baba et al ; 2009).

Pendant la phase obscure (ou après une adaptation dans le noir au moment de la phase de lumière), l'amplitude des ondes (a) et (b) augmente de façon proportionnelle à l'intensité des flashes lumineux excitateurs. A cet égard, plusieurs études montrent que la mélatonine augmente la sensibilité des bâtonnets à la lumière, et ce de manière dose dépendante (Baba et al ; 2009) (Figure 19).

L'implication des récepteurs MT_1 , dans la photosensibilisation des bâtonnets par la mélatonine, a été démontrée par des études faites chez les souris C3H- $MT_1^{-/-}$ (Baba et al ; 2009). Dans la continuité de ces travaux, le rôle du récepteur MT_2 est investi dans le présent article. De manière intéressante, le phénotype des souris KO- MT_2 récapitule les observations faites chez les souris KO- MT_1 , c'est-à-dire la perte de l'effet de la mélatonine sur la potentialisation de l'amplitude des ondes (a) et (b) du tracé ERG. Ces résultats montrent non seulement que MT_1 et MT_2 sont responsables de la signalisation dépendante de la mélatonine, mais que la présence des deux récepteurs est nécessaire pour médier l'effet de l'hormone.

Ces travaux ont été menés conjointement avec l'équipe du Dr Tosini à Atlanta qui a généré l'ensemble des résultats chez l'animal. Notre équipe a pris en charge la caractérisation des mécanismes moléculaires relatifs aux effets de la mélatonine *in vivo* et la génération des souris transgéniques. A ce titre, j'ai été personnellement impliquée dans l'étude de l'hétérodimérisation des récepteurs murins MT_1 et MT_2 , et dans la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle de ce dimère dans les cellules HEK293.

**Heteromeric MT1/MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function**

Kenkichi Baba, Abba Benleulmi-Chaachoua, Anne-Sophie Journé, Maud Kamal, Jean-Luc Guillaume, Sébastien Dussaud, Florence Gbahou, Katia Yettou, Cuimei Liu, Susana Contreras-Alcantara, Ralf Jockers and Gianluca Tosini (8 October 2013)

Science Signaling **6** (296), ra89. [DOI: 10.1126/scisignal.2004302]

The following resources related to this article are available online at <http://stke.sciencemag.org>.
This information is current as of 8 October 2013.

- | | |
|-------------------------------|--|
| Article Tools | Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;6/296/ra89 |
| Supplemental Materials | "Supplementary Materials"
http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;6/296/ra89/DC1 |
| References | This article cites 58 articles, 24 of which can be accessed for free:
http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;6/296/ra89#otherarticles |
| Glossary | Look up definitions for abbreviations and terms found in this article:
http://stke.sciencemag.org/glossary/ |
| Permissions | Obtain information about reproducing this article:
http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl |

VISION

Heteromeric MT₁/MT₂ Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function

Kenkichi Baba,^{1*} Abla Benleulmi-Chaachoua,^{2,3,4*} Anne-Sophie Journé,^{2,3,4} Maud Kamal,^{2,3,4} Jean-Luc Guillaume,^{2,3,4} Sébastien Dussaud,⁵ Florence Gbahou,^{2,3,4} Katia Yettou,^{2,3,4} Cuimei Liu,¹ Susana Contreras-Alcantara,¹ Ralf Jockers,^{2,3,4†‡} Gianluca Tosini^{1†‡}

The formation of G protein (heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein)-coupled receptor (GPCR) heteromers enables signaling diversification and holds great promise for improved drug selectivity. Most studies of these oligomerization events have been conducted in heterologous expression systems, and *in vivo* validation is lacking in most cases, thus questioning the physiological significance of GPCR heteromerization. The melatonin receptors MT₁ and MT₂ exist as homomers and heteromers when expressed in cultured cells. We showed that melatonin MT₁/MT₂ heteromers mediated the effect of melatonin on the light sensitivity of rod photoreceptors in mice. This effect of melatonin involved activation of the heteromer-specific phospholipase C and protein kinase C (PLC/PKC) pathway and was abolished in MT₁^{-/-} or MT₂^{-/-} mice, as well as in mice overexpressing a nonfunctional MT₂ mutant that interfered with the formation of functional MT₁/MT₂ heteromers in photoreceptor cells. Not only does this study establish an essential role of melatonin receptor heteromers in retinal function, it also provides *in vivo* support for the physiological importance of GPCR heteromerization. Thus, the MT₁/MT₂ heteromer complex may provide a specific pharmacological target to improve photoreceptor function.

INTRODUCTION

G protein (heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein)-coupled receptors (GPCRs), also called “seven-transmembrane receptors,” form the largest protein family encoded by the human genome with about 800 members. GPCRs sense the extracellular environment and are involved in many cellular processes. The structural resolution of several GPCRs confirmed the high degree of conservation of their overall structure despite well-known ligand diversity ranging from photons, metabolites, lipids, and peptides to proteins (1). In addition, GPCRs are major drug targets accounting for up to 30% of currently marketed drugs (2).

Many reports indicate that GPCRs have the potential to interact with themselves (homomers) and with other GPCRs (heteromers). Structural studies have shown that some GPCRs crystallize as homodimers with several putative dimer interfaces, and the formation and function of these homodimers await confirmation in a physiologically relevant cellular environment (3). Although monomeric GPCRs represent the minimal signaling unit (4, 5), GPCR oligomerization, in particular heteromerization, may provide additional pharmacological and functional properties distinct from those of the individual receptors of which they are comprised (6–8). GPCR heteromers could provide additional pharmaceutical targets leading to improved drug selectivity by acting only on those cells coexpressing both receptors (9). Whereas there is compelling evidence for the existence of a number of GPCR heteromers in transfected cells, *in vivo* evidence is still lacking in most cases (10, 11), and their physiological

relevance remains a matter of intense debate (12). Selected examples, for which strong *in vivo* evidence for GPCR heteromerization exist, underscore the great potential of GPCR heteromers as future therapeutic targets (13–17).

Two members of the melatonin receptor subfamily in humans, melatonin receptor type 1 (MT₁) and melatonin receptor type 2 (MT₂), tend to homomerize and heteromerize in a constitutive manner when transfected in human embryonic kidney (HEK) 293T cells at physiological concentrations (18). Moreover, the propensity for homomer and heteromer formation differs between the two types of receptors. Whereas the propensity of human MT₁/MT₂ heteromer and MT₁ homomer formation is similar, that of MT₂ homomer formation is three- to fourfold lower, suggesting that the MT₂ receptor preferentially exists as a heteromeric complex with MT₁ (19). MT₁ and MT₂ receptors bind melatonin with similar affinity, and both inhibit the adenylyl cyclase pathway through G_i proteins (20, 21). The functional consequences of melatonin receptor heteromerization are currently unknown. The formation of MT₁/MT₂ heteromers has been proposed to occur in the retina and in other tissues where both receptors are detected (22). In humans, both melatonin receptors are located on rod photoreceptors and on ganglion cells, making these cells likely candidates for MT₁/MT₂ heteromer formation (23–26).

Melatonin is synthesized during the night in the mammalian retina and reaches concentrations in the picomolar to low nanomolar range (27, 28). In the retina, melatonin plays an important role in the regulation of retinal physiology and pathophysiology [for review, see (29)]. Indeed, melatonin increases photoreceptor light sensitivity at night (30–32) and may be implicated in the pathogenesis of age-related macular degeneration and glaucoma. Low concentrations of melatonin may increase the chance of developing age-related macular degeneration, and administration of melatonin improves age-related macular degeneration symptoms (33–35).

The electroretinogram (ERG), consisting mainly of an a-wave and a b-wave, is a commonly used method to assess retinal functioning. In the dark-adapted ERGs, the a-wave represents the response of the photoreceptors to a flash of light, and the b-wave represents the response of the

¹Neuroscience Institute and Department of Pharmacology and Toxicology, Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA 30310, USA. ²INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France. ³CNRS, UMR 8104, Paris, France. ⁴Université Paris Descartes, Paris, France. ⁵Centre d'Expérimentation Fonctionnelle, Hôpital Pitié-Salpêtrière Medical Faculty, Université Pierre et Marie Curie, FR-75013 Paris, France.

*Co-first authors.

†Co-last authors.

‡Corresponding author. E-mail: gtosini@msm.edu (G.T.); ralf.jockers@inserm.fr (R.J.)

bipolar cells (36). The amplitudes of the a-wave and b-wave can be used to determine the effects of genetic mutations or pharmacological treatments on specific retinal cell types (36, 37). Administration of exogenous melatonin to mice during the day increases the amplitudes of the a-wave and b-wave of the scotopic ERG to values observed at night under control conditions (32); animals deficient in MT_1 lack this response to exogenous melatonin (32). Furthermore, mice deficient in MT_1 lacked the daily and circadian rhythms in the ERG responses (32,38) and exhibited decreased photoreceptor and ganglion cell viability during aging (32, 35).

RESULTS

Genetic deficiency in MT_2 replicates the ERG phenotype of MT_1 deletion in mice

If MT_1/MT_2 heteromers are the functionally relevant signaling unit in photoreceptor cells, then deletion of either component of the heteromer should result in the same phenotype. We generated $C3H-f^{+/+} MT_2^{-/-}$ mice and compared the scotopic ERGs of these mice with those of previously described $C3H-f^{+/+} MT_1^{-/-}$ mice (32). As previously reported (32) in $C3H-f^{+/+}$ wild-type mice, the amplitudes of the a-wave and b-wave were significantly greater at midnight (ZT18) than at midday (ZT6) (Fig. 1, A to C), whereas in $C3H-f^{+/+} MT_2^{-/-}$ mice, no differences in the amplitude of the a-wave and b-wave were observed between ZT18 and ZT6 (Fig. 1D). Thus, a daily rhythm in the amplitude of the a-wave and b-wave was observed in wild-type mice but not in $MT_2^{-/-}$ mice.

We then tested whether intraperitoneal injection of melatonin (1 mg/kg) during the day (ZT6) affected the dark-adapted ERG. $C3H-f^{+/+} MT_2^{-/-}$ mice were injected with melatonin and dark-adapted for 1 hour before recording the ERG. Contrary to what was observed in $C3H-f^{+/+}$ mice (Fig. 2A), melatonin injection during the daytime did not alter the ERG of $MT_2^{-/-}$ mice (Fig. 2B). Thus, the ERG data obtained with the $MT_2^{-/-}$ mice were identical to those previously obtained with the $MT_1^{-/-}$ (32) and, thus, are compatible with our hypothesis of the involvement of MT_1/MT_2 heteromers in photoreceptor function.

Murine MT_1/MT_2 heteromers form in transfected HEK293T cells

To directly assess the possible interaction between murine MT_1 and MT_2 receptors, we performed coimmunoprecipitation experiments with tagged forms of MT_1 and MT_2 expressed in HEK293T cells (Fig. 3, A to C). We observed several diffuse bands typical for glycosylated and hydrophobic seven-transmembrane proteins and detected homomeric interactions between each of the receptors (Fig. 3, A and B), as well as heteromeric interactions when the two receptors were expressed in the same cell (Fig. 3C). We also performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) donor saturation experiments with the *Renilla* luciferase 8 (Rluc8) energy donor fused to the C terminus of MT_1 or MT_2 and the yellow fluorescent protein (YFP) energy acceptor fused to the C terminus of MT_1 or MT_2 . Cotransfection of a fixed amount of MT_1 -Rluc8 expression plasmid and increasing amounts of MT_1 -YFP or MT_2 -YFP expression plasmids resulted in the expected hyperbolic saturation curve with increasing YFP/Rluc ratios for all receptor combinations, reflecting a specific interaction between BRET donor and acceptor pairs (Fig. 3, D to F). MT_1 homomers exhibited a 50% maximal BRET response ($BRET_{50}$) at 0.71 ± 0.15 , and the MT_1/MT_2 heteromers had a $BRET_{50}$ of 1.67 ± 0.42 ($n = 5$). In cells expressing a fixed amount of MT_2 -Rluc8 and increasing amounts of MT_2 -YFP, the $BRET_{50}$ for the MT_2 homomers was 1.07 ± 0.24 ($n = 5$) (Fig. 3E), which is similar to that of the heteromers. Expression of the MT_1 -Rluc8 donor with the negative control vasopressin V2 receptor fuse to YFP resulted in a linear,

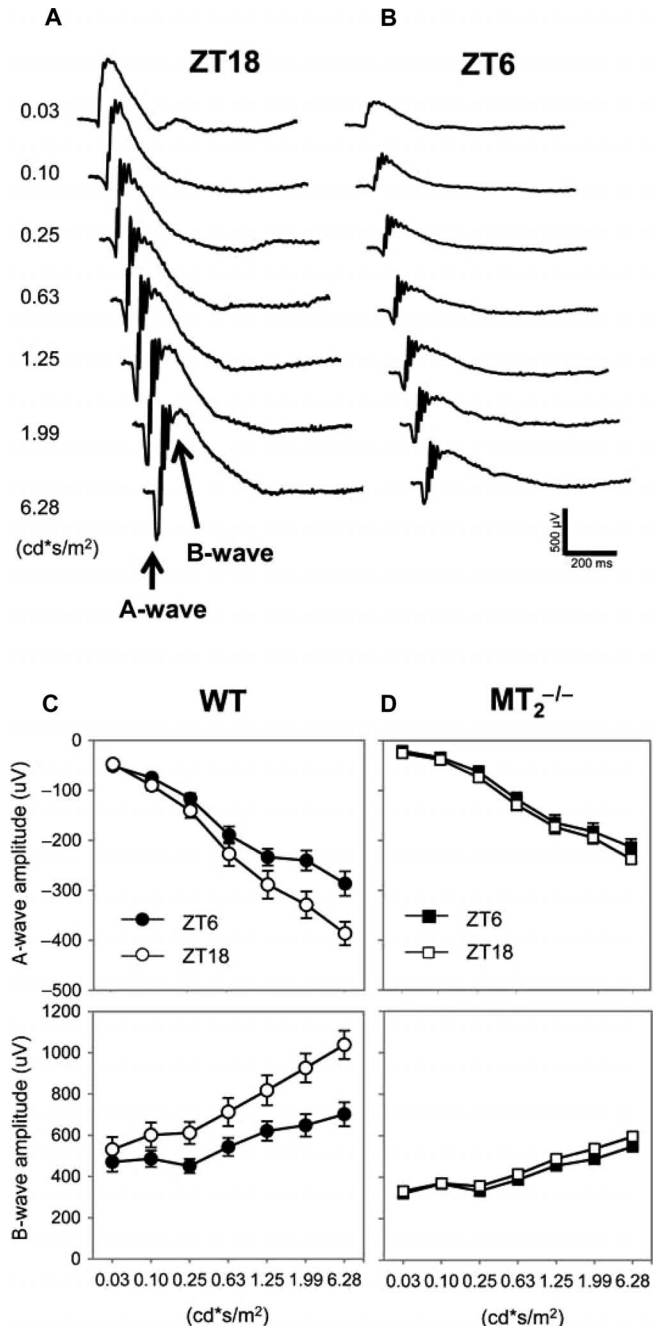


Fig. 1. Absence of MT_2 replicates the ERG phenotype of MT_1 deletion in mice. (A and B) Representative ERG traces recorded at ZT18 and ZT6 in $C3H-f^{+/+}$ [wild-type (WT)] mice. (C and D) Quantification of dark-adapted ERG responses to flashes of light recorded in the middle of the day (ZT6, ● and ■) and middle of the night (ZT18, ○ and □) in $C3H-f^{+/+}$ (C) and $MT_2^{-/-}$ (D) mice. Mice (3 to 4 months old) were dark-adapted for at least 30 min before the recordings were performed. Data are presented as means \pm SEM; $n = 6$ for each time point and genotype. Differences in the a-wave and b-wave at ZT6 and ZT18 for the WT mice are statistically different [two-way analysis of variance (ANOVA), $P < 0.01$], but not for the $MT_2^{-/-}$ mice (two-way ANOVA, $P > 0.1$). Luminance is expressed in candelas per meter squared (cd^*s/m^2).

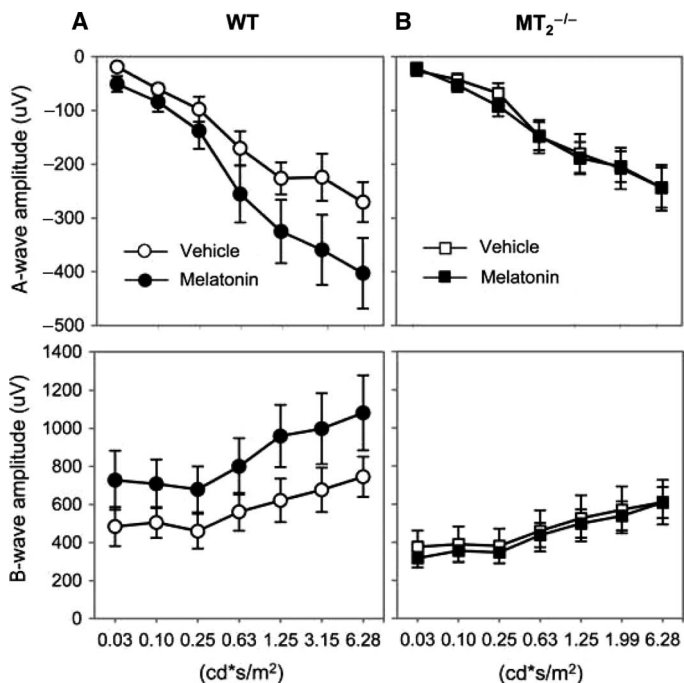


Fig. 2. Administration of melatonin does not affect ERGs in $MT_2^{-/-}$. (A and B) Quantification of the dark-adapted response of the a-wave (upper panels) and b-wave (lower panels) to flashes of light recorded after 1 hour of dark adaptation and intraperitoneal injection of melatonin (1 mg/kg) or vehicle in C3H- $f^{+/+}$ (A) and $MT_2^{-/-}$ (B) mice. Data are presented as means \pm SEM; $n = 5$ to 8 for each group. Melatonin injection did not induce any significant changes in the amplitude of the a-wave or b-wave in $MT_2^{-/-}$ mice (two-way ANOVA, $P > 0.1$). Luminance is expressed in $cd \cdot s/m^2$. ERGs in this experiment were performed at ZT6.

nonsaturable BRET increase, characteristic of random interactions. Overall, coimmunoprecipitation and BRET results showed that murine MT_1 and MT_2 receptors can form homomers and heteromers in HEK293T cells as previously shown for their human homologs (18, 19).

MT_1 and MT_2 receptors are expressed in the mouse photoreceptor cells where they heteromerize

By fluorescence in situ hybridization, we detected *MTNR1A* (MT_1) mRNAs in the outer nuclear layer (ONL) and the inner nuclear layer (INL) and in the ganglion cell layer of mouse retina (Fig. 4A), whereas *MTNR1B2* (MT_2) transcripts were detected in the ONL and INL (Fig. 4B). No signal was detected in sections treated with the sense probes (Fig. 4, C and D). In the ONL, MT_1 and MT_2 mRNAs were detected in most of the nuclei of the photoreceptors.

To test whether MT_1 and MT_2 form functional heteromers in the mouse photoreceptors, we developed a series of transgenic mice by transducing mouse fertilized eggs with lentiviral vectors containing Flag- MT_1 or Myc- MT_2 wild-type receptor-coding regions under the control of the rhodopsin promoter to drive expression of these receptors in photoreceptor cells. Tagging the receptors was necessary to detect them properly because reliable antibodies that recognize the wild-type rodent MT_2 receptors are currently lacking. Immunofluorescence in these mice was only detected in the photoreceptors, which are present in the outer segment, using antibodies recognizing the Flag or Myc epitopes to detect the tagged MT_1 or

MT_2 receptors (fig. S1). We crossed Flag- MT_1 with Myc- MT_2 mice to produce Flag- MT_1 /Myc- MT_2 mice and performed coimmunoprecipitation experiments. Retinal cell lysates were prepared from wild-type and transgenic mice expressing either Flag- MT_1 or coexpressing Flag- MT_1 and Myc- MT_2 (Fig. 4E). Flag- MT_1 receptors were precipitated, and Myc- MT_2 receptors were only coprecipitated in lysates prepared from double transgenic mice, consistent with the formation of MT_1 / MT_2 heteromers in photoreceptors. With in situ proximity ligation assay (PLA) (39) on retinal sections obtained from Flag- MT_1 /Myc- MT_2 mice, a fluorescence signal was observed indicating that MT_1 and MT_2 receptors exclusively interact in the outer segment, the part of the retina where the photoreceptors are located, as predicted (Fig. 4, F and G).

Pharmacological characterization identifies a specific pathway in retinal MT_1 / MT_2 heteromers analyzed by scotopic ERGs

To further decipher the involvement of MT_1 and MT_2 in the effect of melatonin on scotopic ERGs, we performed intravitreal injections into the eyes of C3H- $f^{+/+}$ mice. Intravitreal injection of melatonin induced a dose-dependent increase in the amplitude of the a-wave and b-wave of the scotopic ERGs as expected (Fig. 5, A and B). We then injected the IIK7 compound, which has been reported to behave as a selective agonist of the human MT_2 receptor (40). Competition of 2- $[^{125}I]$ iodomelatonin binding at mouse MT_1 and MT_2 showed also high affinity and selectivity of IIK7 for murine MT_2 receptors with K_i (inhibition constant) values of 73 ± 23 nM for MT_1 and 0.052 ± 0.015 nM for MT_2 (fig. S2A). When injected intravitreally at a concentration that selectively activates MT_2 receptors (50 nM), IIK7 did not increase the amplitude of the a-wave or b-wave (Fig. 6A), whereas a higher concentration (5 μ M) that activates MT_1 and MT_2 receptors significantly increased the amplitude of the a-wave and b-wave (Fig. 6B). Conversely, injection of luzindole or *cis*-4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT), two melatonin receptor antagonists with high preference for human MT_1 / MT_2 heteromers compared to MT_2 homomers (19), prevented the increase in the amplitude of the a-wave and b-wave that followed intraperitoneal administration of melatonin, which is consistent with the involvement of MT_1 / MT_2 heteromers and validates the experimental protocol (Fig. 6, C and D). 4P-PDOT had a higher affinity for murine MT_2 than MT_1 (fig. S2, B to D). Injection of luzindole or 4P-PDOT alone did not produce any significant changes in the amplitude of the a-wave and b-wave excluding any agonistic and inverse agonistic effects of these compounds in the retina (fig. S3). Collectively, these data confirmed that the effect of melatonin on the amplitude of the a-wave and b-wave of the scotopic ERGs occurred with the expected pharmacology and depended on the simultaneous activation of both the MT_1 and MT_2 subunits of the MT_1 / MT_2 heteromer.

Expression of the nonfunctional MT_2 -P95L mutant in mouse photoreceptors blocks the effects of melatonin on the dark-adapted ERGs

In an attempt to interfere with the formation of functional heteromers, we generated transgenic mice expressing a nonfunctional murine MT_2 -P95L mutant that has been designed on the basis of the naturally occurring loss-of-function MT_2 -P95L mutant identified in diabetic patients (41). In vitro experiments performed in HEK293T cells confirmed that the murine mutant was expressed at similar amounts as the Myc-tagged wild-type MT_2 and was devoid of any 2- $[^{125}I]$ iodomelatonin binding and signaling capacity (fig. S4, A to C), as described for the human mutant (41). However, the MT_2 -P95L mutant maintained its oligomerization capacity because this mutant readily formed homomers and heteromers with MT_1 and MT_2 wild-type receptors as demonstrated by coimmunoprecipitation (Fig. 7,

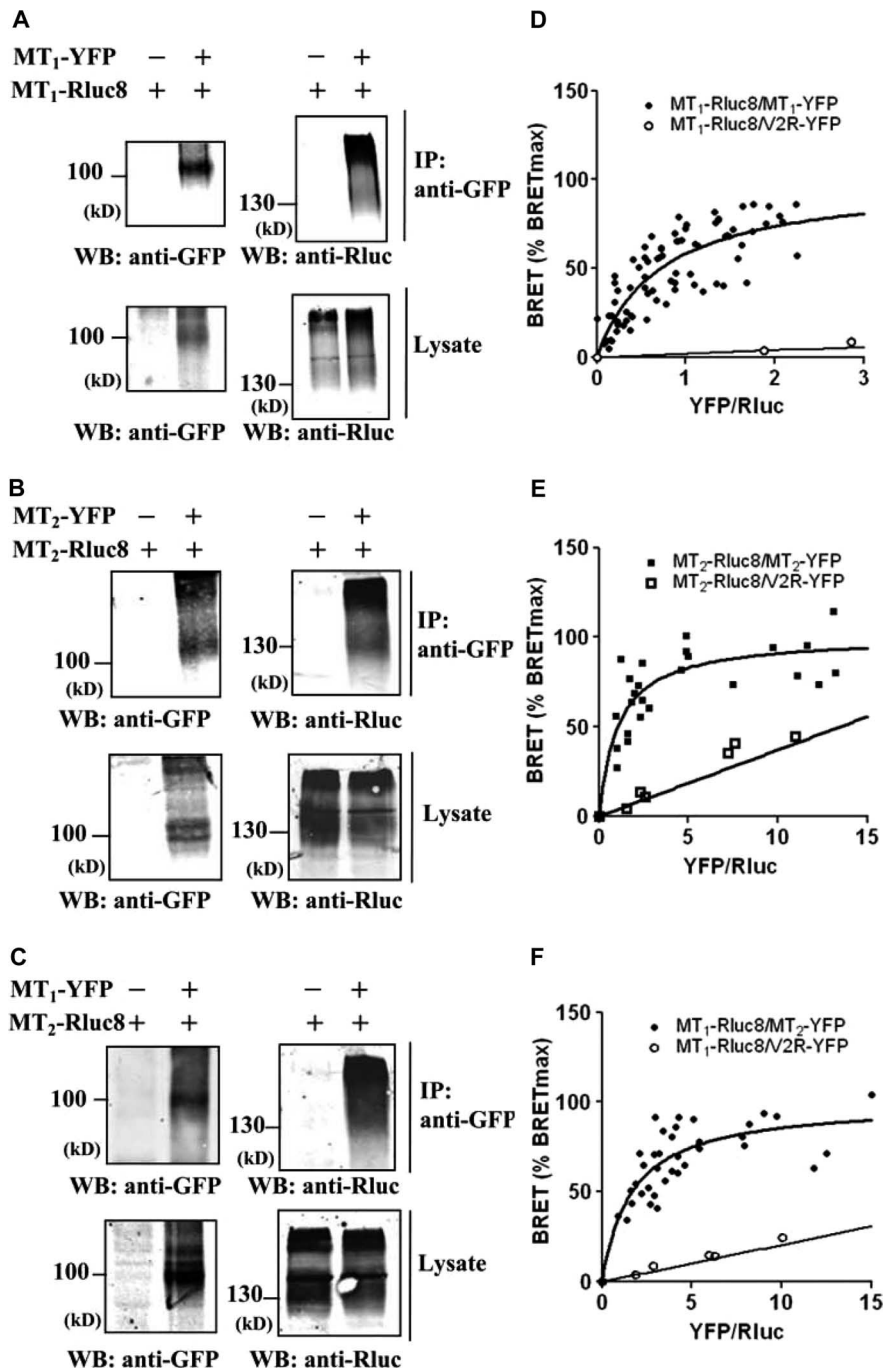


Fig. 3. Formation of murine MT₁/MT₂ heteromers in transfected HEK293T cells. (A to C) Coimmunoprecipitation of MT₁ and MT₂. Lysates from HEK293T cells expressing the indicated Rluc8 and YFP fusion proteins were immunoprecipitated (IP) with antibodies recognizing GFP (green fluorescent protein), and the presence of coprecipitated Rluc fusion proteins was detected with antibodies against Rluc [upper Western blot (WB)]. Expression of fusion proteins in lysates was assessed by immunoblotting with indicated antibodies (lower Western blot). Data are representative of three experiments. Anti-GFP and anti-Rluc: antibodies recognizing GFP and Rluc, respectively. The GFP antibody also recognizes YFP. (D to F) BRET donor saturation experiments with HEK293T cells coexpressing a fixed amount of MT₁-Rluc8 (D and F) or MT₂-Rluc8 (E) in the presence of increasing amounts of MT₁-YFP, MT₂-YFP, or vasopressin receptor V2-YFP (negative control). The saturation curves were obtained from five independent experiments.

A and B) and BRET donor saturation experiments (Fig. 7C). MT₂-P95L had similar BRET₅₀ values as the fluorescent protein-tagged wild-type MT₂, indicating similar propensities to form oligomers [BRET₅₀ = 2.61 ± 0.71 for the MT₂-P95L homomers, 3.48 ± 0.73 for the MT₂-P95L/MT₁ heteromers, and 1.52 ± 0.40 for the MT₂-P95L/MT₂ heteromers (*n* = 3)]. Consistently, the MT₂-P95L mutant interfered with MT₁/MT₂ heteromer formation as illustrated in BRET competition and coimmunoprecipitation experiments (Fig. 7, D and E, upper middle Western blot).

To examine the consequence of the presence of MT₂-P95L on melatonin receptor function in the retina, we generated transgenic mice expressing the MT₂-P95L mutant in photoreceptors and tested the effect of melatonin injection (1 mg/kg, intraperitoneally) on the dark-adapted ERGs. Control mice responded to melatonin injection with an increase in the amplitude of the a-wave and b-wave (Fig. 7F), whereas MT₂-P95 transgenic mice showed no increase in the amplitude of the a-wave and b-wave when injected with melatonin (Fig. 7F). These results phenocopy those observed in MT₁^{-/-} or MT₂^{-/-} mice, suggesting that the effect of melatonin on dark-adapted ERGs depends on the presence of functional MT₁/MT₂ heteromers in photoreceptor cells.

Melatonin affects mouse photoreceptor function through the phospholipase C and protein kinase C signaling pathway

To investigate the intracellular signaling pathway leading to the effect of melatonin on the dark-adapted photoreceptors, we tested the effect of various inhibitors and activators of signaling molecules on the ability of melatonin to increase the amplitude of the a-wave. Because intraperitoneal administration of exogenous melatonin (1 mg/kg) reliably and significantly increased the amplitude of the a-wave 7 ms after the initial flash of light (Fig. 8A), we quantified the effect of intravitreal injection of the modulators of signaling pathways on response at 7 ms, which we considered the point at which the melatonin response was maximal (Fig. 8, B and C). Whereas the pan-inhibitor of heterotrimeric G proteins BIM 46187 (7-[2-amino-1-oxo-3-thio-propyl]-8-cyclohexylmethyl-2-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-imidazo-[1,2a]-pyrazine dimer, hydrochloride) reduced the melatonin-induced response, the G_i-specific pertussis toxin (PTX) had no effect (Fig. 8B and fig. S5). The injection of 8-bromoadenosine

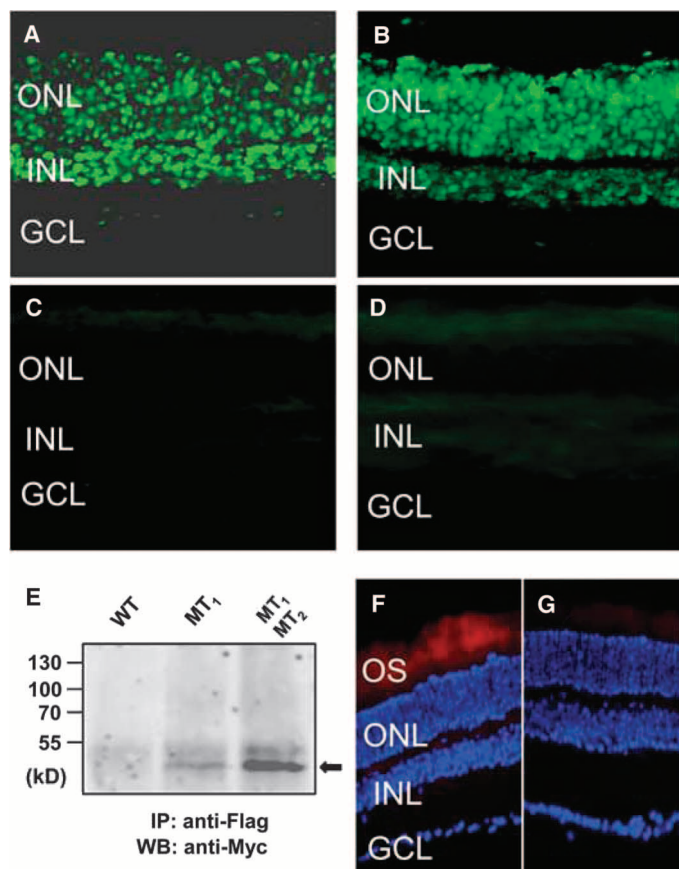


Fig. 4. MT_1 and MT_2 receptors are expressed in mouse photoreceptor cells where they heteromerize. (A and B) *MTNR1A* (encoding MT_1) (A) and *MTNR1B* (encoding MT_2) (B) transcripts in the retina were detected by in situ hybridization using a fluorescein-labeled probe. (C and D) Signal from the sense MT_1 probe (C) or sense MT_2 probe (D). (E) Coimmunoprecipitation of MT_1 and MT_2 from the retina of WT C57/bl6 mice or transgenic C57/bl6 mice expressing either Flag- MT_1 (MT_1) or Flag- MT_1 and Myc- MT_2 (MT_1 , MT_2) in photoreceptor cells under the control of the rhodopsin promoter. Data are representative of three experiments. (F and G) Visualization of MT_1 and MT_2 heterodimerization by in situ PLA on retinal sections of transgenic C57/bl6 mice expressing Flag- MT_1 and Myc- MT_2 (F) or control lacking the primary antibodies (G) in photoreceptor cells. MT_1/MT_2 heterodimers were visualized by staining cells with proximity probes directed against Flag and Myc, followed by ligation and rolling circle amplification. The hybridization probes were labeled with a fluorophore that is visualized with the Texas red filter. The nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (blue). Data are representative of three experiments. OS, photoreceptors' outer segments; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

3',5'-cyclic monophosphate (8-br-cAMP), which is a cell-permeable cAMP analog, had no effect on the melatonin response (Fig. 8B and fig. S5), which was consistent with our observation that intravitreal injection of the protein kinase A (PKA) inhibitor H89 did not mimic the photoreceptor response to melatonin (Fig. 8C and fig. S5). These results exclude the involvement of the cAMP to PKA pathway.

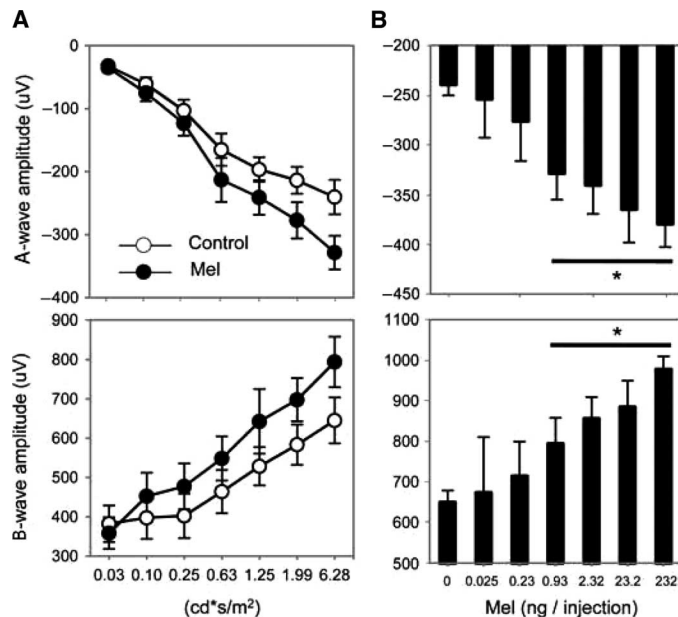


Fig. 5. Dose response to intravitreal injection of melatonin. (A) Quantification of the dark-adapted response of the a-wave (upper panel) and b-wave (lower panel) to flashes of light recorded after 1 hour of dark adaptation and intravitreal injection of melatonin (Mel) or vehicle in C3H- $f^{+/+}$ mice. Intravitreal injection of melatonin (0.93 ng) at ZT6 induced a significant increase of the a-wave and b-wave amplitude (two-way ANOVA, $P < 0.001$). (B) Quantification of the dark-adapted response of the a-wave (upper panel) and b-wave (lower panel) to different doses of melatonin injected intravitreally. All data are presented as means \pm SEM; $n = 5$ to 8 for each group. Luminance is expressed in cd^*s/m^2 . ERGs in this experiment were performed at ZT6. * $P < 0.05$ with respect to vehicle injection (t tests).

In contrast, inhibiting inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptors with 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) or inhibiting protein kinase C (PKC) with bisindolylmaleimide II (BisI) abolished the effect of exogenous melatonin on the photoreceptor response amplitude at 7 ms after a flash of light. Consistent with a role for PKC, activation of PKC with the phorbol ester, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), also reduced the amplitude of the a-wave in dark-adapted retinas (Fig. 8C), which mimics the effect of exogenous melatonin on the photoreceptor response. Thus, these data indicated that the effect of melatonin on the photoreceptors involves activation of the phospholipase C (PLC)/PKC pathway.

Consistent with this finding, physiological melatonin concentrations stimulated the production of the IP_3 precursor, inositol phosphate (IP), in HEK293T cells coexpressing MT_1 and MT_2 [median effective concentration (EC_{50}) = 2.8 ± 1.1 nM] (Fig. 8D). Melatonin was less potent ($EC_{50} = 51.0 \pm 35.2$ nM) and less efficacious in stimulating IP production in cells only expressing MT_1 or was inactive in cells expressing MT_2 alone (Fig. 8D), suggesting a positive allosteric effect of the MT_2 subunit on the MT_1 subunit in the heteromer. The allosteric behavior was further confirmed in cells coexpressing the wild-type MT_1 receptor with the inactive MT_2 -P95L mutant, which completely abolished the effect of melatonin in the heteromer (Fig. 8D).

To explore the existence of a potential cross-antagonism (the effect of an antagonist binding to one subunit of the receptor on the effect of an agonist binding to another subunit) in MT_1/MT_2 heteromers, we compared the effect of the MT_2 -selective 4P-PDOT antagonist (fig. S2C) on melatonin-induced

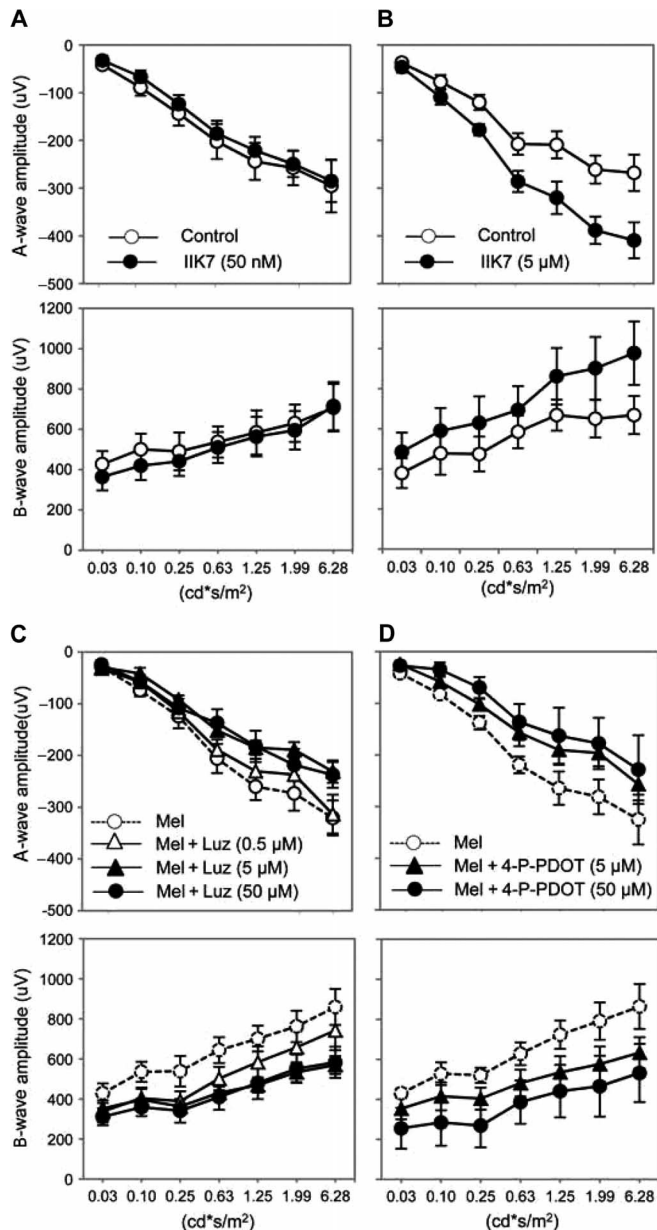


Fig. 6. Effect of subtype-specific melatonin receptor agonists and antagonists on the ERG. (A and B) Effect of intravitreal injection of two different concentrations of the MT_2 -specific agonist IIK7 on the amplitude of the a-wave and b-wave. At the lower concentration (50 nM), which is MT_2 -selective, there was no effect (A; two-way ANOVA, $P > 0.1$). At the higher concentration (5 μ M), activating MT_1 and MT_2 , IIK7 significantly increased the amplitude of the a-wave and b-wave (B; two-way ANOVA, $P < 0.05$). (C and D) Effect of intravitreal injections of luzindole (Luz) (C) or 4P-PDOT (D) on melatonin-induced changes in the amplitude of the a-wave and b-wave. Controls received an intravitreal injection of vehicle in the left eye. Melatonin (1 mg/kg) was injected intraperitoneally. Luzindole prevented the melatonin-induced changes in the amplitude of the a-wave and b-wave at the concentrations of 5 and 50 μ M (two-way ANOVA, $P < 0.05$), whereas 4P-PDOT only at the concentration of 50 μ M (two-way ANOVA, $P < 0.05$). All data are presented as means \pm SEM; $n = 6$ for each time point. Luminance is expressed in cd^*s/m^2 . ERGs in this experiment were performed at ZT6.

IP production in cells expressing MT_1 in the absence or presence of MT_2 (fig. S6). Irrespective of the coexpression of MT_2 , competition curves were monophasic with similar IC_{50} values 5.8 ± 7.7 nM and 4.0 ± 3.5 nM ($n = 3$) for cells expressing MT_1 or MT_1 and MT_2 , respectively, suggesting the absence of cross-antagonism.

Melatonin dose-dependently increased PKC activity in cells expressing both MT_1 and MT_2 and was less potent and efficacious in stimulating this response in cells expressing MT_1 alone (Fig. 8E). The effect on MT_1/MT_2 heteromers was inhibited in cells coexpressing the dominant-negative MT_2 -P95L mutant (Fig. 8F), which is consistent with our *in vivo* observation in transgenic mice overexpressing the MT_2 -P95L mutant (Fig. 7F). A possible switch between G_i protein toward G_q coupling from homomers to heteromers could be excluded because the inhibition of cAMP production was enhanced in cells coexpressing MT_1 and MT_2 receptors compared with those expressing only MT_1 or MT_2 (Fig. 8G).

Together, we found that MT_1/MT_2 heteromers could signal through the G_i to cAMP and from the G_q to PLC/PKC pathway. The effect of melatonin on the scotopic ERG involved the activation of the PLC/PKC pathway through MT_1/MT_2 heteromers, in which the MT_2 subunit likely exerts a positive allosteric effect on the MT_1 subunit.

DISCUSSION

Establishing whether GPCRs form physiologically relevant functional homomers and heteromers *in vivo* has been a major biochemical challenge. Apart from obligate class C GPCR dimers (13, 41), only a few studies support the formation of physiologically relevant heteromers (15–17, 42–44). Here, we provide biochemical and functional *in vivo* evidence for the formation of MT_1/MT_2 heteromers in photoreceptors of the mouse retina. The existence of two melatonin receptor subtypes with apparently redundant functional properties (similar affinity for melatonin and signaling properties) and overlapping expression patterns in several tissues led us to hypothesize that the presence of both MT_1 and MT_2 might result in the formation of MT_1/MT_2 heteromers with unique functional properties, which we evaluated using mouse retina. In the retina, MT_2 had a similar distribution to MT_1 ; transcripts for both were expressed in photoreceptors. We found that melatonin affected the early photoreceptor-specific component of ERGs and that this effect was abolished by the photoreceptor-specific expression of a nonfunctional MT_2 mutant or in mice lacking MT_2 .

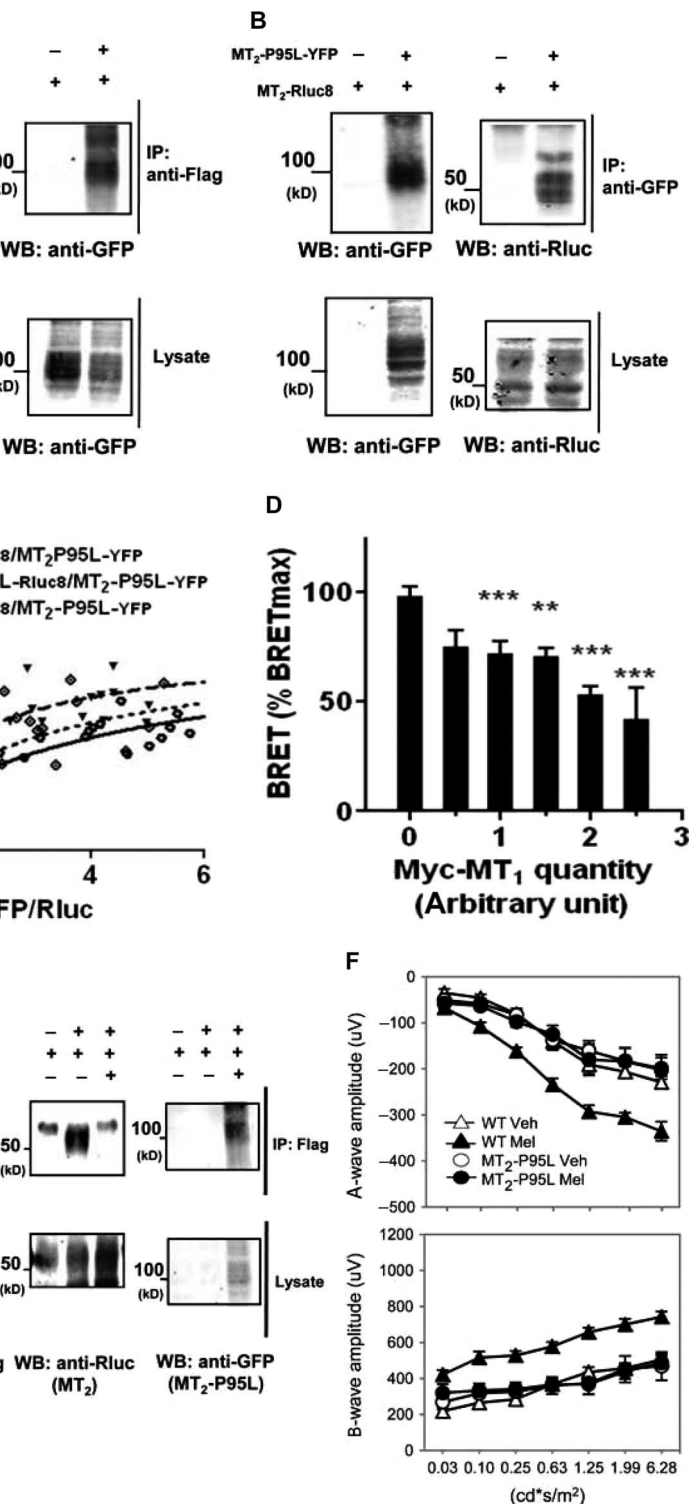
Previous *in vitro* studies of human MT_1 and MT_2 indicated the formation of MT_1/MT_2 heteromers (18, 19). We confirmed these findings with murine MT_1 and MT_2 in transfected cells and provide experimental data suggesting that functional heterodimerization also occurs in mouse photoreceptors *in vivo*. We generated mice expressing tagged MT_1 and MT_2 receptors in photoreceptors and crossed these mice to produce double transgenic mice in which both tagged receptors were expressed in photoreceptors (Flag- MT_1/My - MT_2). Coimmunoprecipitation and *in situ* PLA experiments performed with retinas obtained from these mice indicated that these receptors indeed form a complex in the photoreceptors. Within the retina, melatonin receptor heteromer formation appears restricted to photoreceptors because ganglion cell viability is not affected in animals deficient for MT_2 (35), and the circadian rhythms in retinal dopamine are not affected in animals deficient for MT_1 (38).

To examine the functional consequences of MT_1/MT_2 heteromerization *in vivo*, we examined the responses of photoreceptors lacking one of the melatonin receptor subtypes or expressing a melatonin binding-deficient mutant of MT_2 (MT_2 -P95L) or used selective pharmacological tools injected intravitreally. Photoreceptors lacking MT_2 exhibited ERGs similar to those previously reported in the mice lacking MT_1 (32), namely, a

Fig. 7. The nonfunctional MT₂-P95L mutant interferes with MT₁/MT₂ heteromer formation and blocks the effects of melatonin injection on the dark-adapted ERGs in the mouse photoreceptors. (A and B) Coimmunoprecipitation of MT₂-P95L-YFP with Flag-MT₁ (A) or MT₂-Rluc8 (B) in HEK293T cells. (C) Competition for MT₁ by MT₂-P95L detected by BRET. BRET donor saturation curves were performed by coexpressing equivalent amounts of MT₁-Rluc8, MT₂-Rluc8, or MT₂-P95L-Rluc8 together with increasing quantities of MT₂-P95L-YFP in HEK293T cells. (D) Reduction in BRET between MT₁-Rluc8 and MT₂-P95L-YFP by increasing the amount of coexpressed Myc-MT₁. Expression of the Myc-MT₂-P95L mutant was determined by Western blot. (E) Competition between MT₂-P95L-YFP and the MT₁/MT₂ heteromer as monitored by coimmunoprecipitation. (F) Quantification of the dark-adapted response of the a-wave (upper graph) and b-wave (lower graph) to flashes of light recorded in MT₂-P95L mutant mice after 1 hour of dark adaptation and intraperitoneal injection of melatonin (1 mg/kg) or vehicle at ZT6. Data are presented as means ± SEM; *n* = 5 to 8 for each group. Melatonin injection induced no significant changes in the amplitude of the a-wave and b-wave (two-way ANOVA, *P* > 0.1). Coimmunoprecipitation data are representative of three experiments. BRET data are obtained from three to five independent experiments. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001, *t* test. Anti-GFP, anti-Rluc, and anti-Flag: antibodies recognizing GFP, Rluc, or the Flag epitope, respectively. Luminance is expressed in cd*s/m². ERGs in this experiment were performed at ZT6.

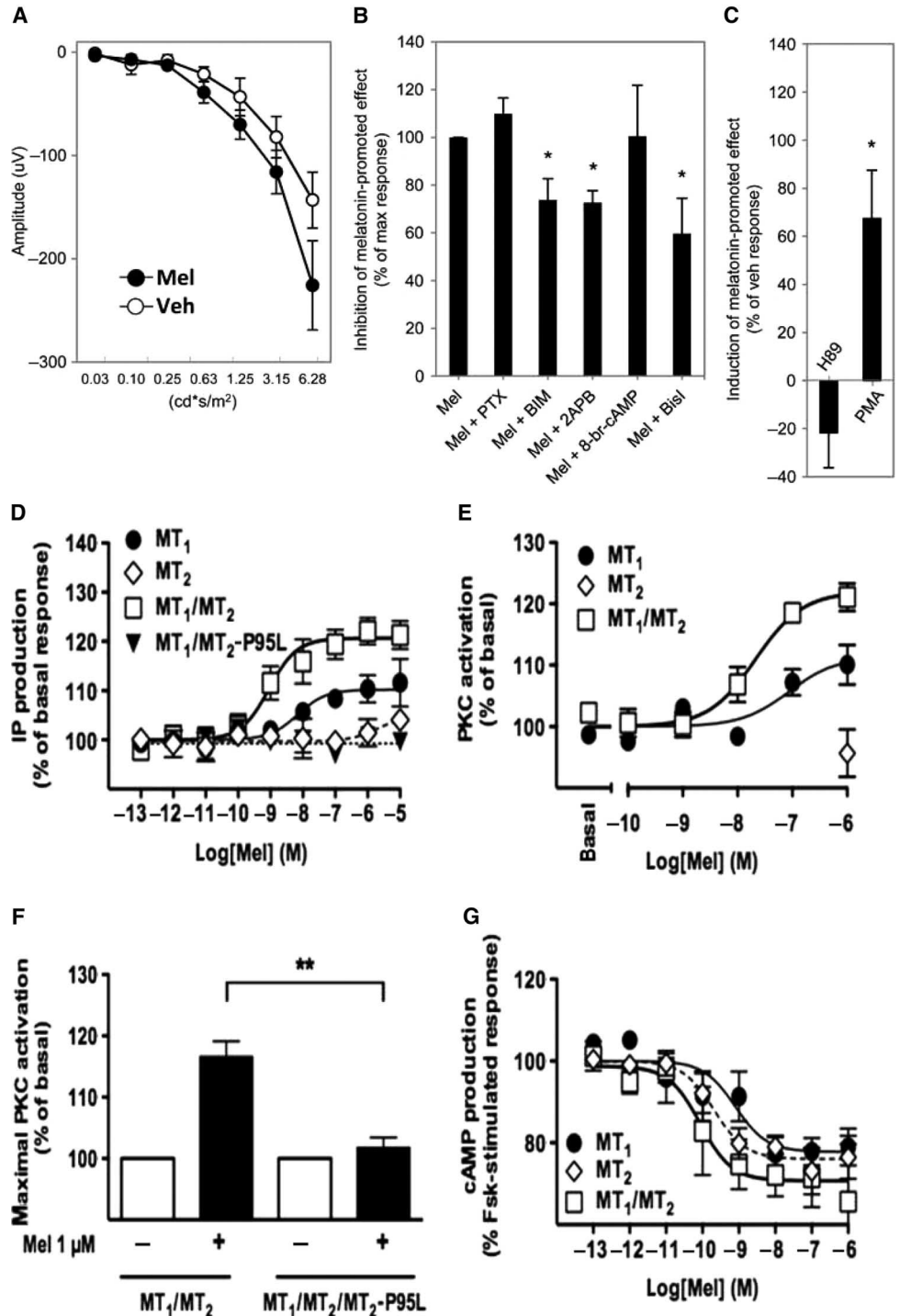
complete loss of the effect of melatonin on the scotopic ERGs. Furthermore, the effect of melatonin on dark-adapted ERGs in transgenic mice expressing the mutant in photoreceptors was abolished. Thus, the effect of melatonin depends on the presence of both receptor subtypes, most likely by targeting MT₁/MT₂ heteromers in photoreceptors. Consistent with these results, we found that administration of the 4P-PDOT or luzindole, two antagonists with preference for MT₁/MT₂ heteromers (19), inhibited the effect of melatonin on dark-adapted ERGs. In addition, IIK7, an MT₂-selective agonist at low concentrations, only reproduced the effect of melatonin at concentrations high enough to target both MT₁ and MT₂, but not at concentrations specific for MT₂, consistent with the hypothesis that both subunits in the heteromer have to bind melatonin and be activated to produce the photoreceptor response.

To investigate the pathway involved in melatonin-induced ERG regulation, we used pharmacological reagents to interfere with or promote specific downstream signaling pathways. MT₁ and MT₂ receptors typically



inhibit cAMP formation by activating PTX-sensitive G_i proteins that are negatively coupled to adenylyl cyclase (20, 21). Surprisingly, manipulating the cAMP signaling pathway, by either inhibiting G_i proteins or PKA activity or administering a cell-permeable cAMP analog, did not block or mimic the melatonin-induced effects in photoreceptors, respectively.

Fig. 8. Melatonin affects mouse photoreceptor function through the PLC/PKC signaling pathway. (A) Effect of melatonin (Mel, 1 mg/kg, intraperitoneally) on the a-wave of the photoreceptor response. The difference at 7 ms is significant (two-way ANOVA, $P < 0.01$). (B) Effect of PTX (1 ng, G_i protein inhibitor), BIM 46187 (100 μM, pan-heterotrimeric G protein inhibitor), 2-APB (50 μM, IP₃ receptor inhibitor), 8-br-cAMP (50 μM, cAMP analog), or BisI (25 μM, PKC inhibitor) on the melatonin-induced increase in a-wave amplitude at 7 ms. * $P < 0.05$, *t* test. Melatonin was injected intraperitoneally; pharmacological agents were injected intravitreally. Data shown in (A) and (B) represent the means ± SEM ($n = 6$ to 8). (C) Effect of inhibition of PKA activity by H89 or activation of PKC with PMA on the melatonin-induced increase in a-wave amplitude at 7 ms. * $P < 0.05$, *t* test. Data represent the means ± SEM; $n = 5$ to 7 for each point. For the data in (A) to (C), luminance is expressed in cd^*s/m^2 . ERGs were performed at ZT6. (D) Production of inositol phosphate after stimulation with increasing concentrations of melatonin in HEK293T cells expressing the indicated receptors. Data are presented relative to the amount in unstimulated cells expressing the same receptor. (E and F) PKC activity after stimulation with increasing concentrations of melatonin (E) or 1 μM melatonin (F) in HEK293T cells expressing the indicated receptors. Data are presented relative to the amount in unstimulated cells for each condition (** $P < 0.01$, *t* test). (G) Inhibitory effect of melatonin on forskolin (Fsk)-stimulated cAMP production in HEK293T cells expressing the indicated receptors. Data in (D) to (G) represent the means ± SEM of at least four experiments performed in triplicate.



Instead, the pharmacological data indicated that melatonin's effect on photoreceptors was mediated by a PKC and IP₃ pathway. Indeed, IP concentrations were increased in cells coexpressing MT₁ and MT₂ when exposed to physiological melatonin concentrations, whereas cells expressing only MT₂ failed to increase IP concentration and cells expressing only MT₁ only stimulated an increase in IP concentration at supraphysiological concentrations of melatonin.

Activation of the PLC/PKC pathway is functionally important in rod outer segments (45, 46). This pathway may play an important role in the light-dependent translocation of arrestin, a major regulator of rhodopsin function in rod photoreceptors (47). Whether melatonin regulates arrestin translocation remains a question for future studies.

Activation of the PLC/PKC pathway by melatonin is not unique to photoreceptors. Previous reports showed that MT₁, when expressed alone in transfected cells, activates this pathway (48) and that in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, PKC is also activated (49). Both MT₁ and MT₂ are present in the SCN (50), but whether PKC activation or any other effect of melatonin in the SCN depends on MT₁/MT₂ heteromers is unknown. Phenotypic characterization of MT₁^{-/-} and MT₂^{-/-} mice suggests

that the action of melatonin in the SCN is not mediated by MT₁/MT₂ heteromers, at least in the outputs so far investigated (51). Nevertheless, no study has investigated in detail the presence of these receptors in the SCN and whether these receptors are present in the same neuron and regulated by the circadian cycle and where they may form heterodimers and control a yet to be identified SCN output.

The increased potency and efficacy of melatonin on IP production and PKC activity in cells expressing MT₁/MT₂ heteromers compared with those expressing the corresponding homomers indicated an allosteric behavior of the heteromer. No activation of this pathway was observed when the MT₂ wild-type receptor in the heteromer was replaced by the inactive P95L mutant, further confirming the need for a functional MT₂ subunit to allosterically activate the MT₁ subunit in the heteromer. In contrast, specific activation of only MT₂ by I1K7 was not sufficient to activate the PLC/PKC pathway, which required activation of both MT₁ and MT₂ subunits. The absence of cross-antagonism or negative allosterism in the MT₁/MT₂ heteromer is in agreement with previous observations of human MT₁/MT₂ heteromers (19). Collectively, these data suggest a working model in which both subunits bind melatonin and the MT₂ subunit allosterically potentiates or facilitates the activation of the PLC/PKC pathway by the MT₁ subunit.

In conclusion, we provide evidence that the modulatory effect of melatonin on mouse photoreceptor light sensitivity is mediated by MT₁/MT₂ heteromers and involves the activation of the PLC/PKC pathway. The involvement of MT₁/MT₂ heteromers may have important therapeutic implications because the heteromer complex may provide a unique pharmacological target to improve photoreceptor functioning and to extend the viability of photoreceptors during aging.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C3H MT₂^{-/-} knockout mice homozygous for the *rd1* mutation, donated by S. M. Reppert and D. R. Weaver (University of Massachusetts Medical School), were backcrossed with C3H-f^{+/+} mice in which the *rd1* mutation had been removed to produce C3H-f^{+/+} MT₂^{-/-}. The genotypes were determined according to the protocols previously described (32, 51). All the experimental procedures were performed in accordance with the Association for Assessment of Laboratory Animal Care policies and approved by the Morehouse School of Medicine Animal Care and Use Committee.

In situ hybridization

Mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation, and the eyeballs were immediately removed, punctured, and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.0) for 6 hours at 4°C. The eyes were transferred to a 30% sucrose solution for 12 to 14 hours, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles), and cut into 20- μ m-thick cryosections. The template for transcription was a cDNA (complementary DNA) fragment of mouse *MT₂* subcloned into a pZLI vector (GenBank NM145712). The correct orientation of the construct was verified by sequence analysis and restriction enzyme digestion. Antisense and sense cRNA (complementary RNA) probes were generated with fluorescein-12-UTP (PerkinElmer Life Sciences) by *in vitro* transcription (*MT₂*; forward, 5'-acactcacataggcgattg-3'; reverse, 5'-agtgtgctggaatcgggttc-3'; 512 base pairs). The templates for transcribing RNA probes were made by linearizing recombinant plasmids. Details about the *MT₁* probes are reported by Baba *et al.* (32). Sections were immersed in prehybridization buffer containing 50% formamide, 5 \times Denhardt's solution, and 5 \times SSC [1 \times SSC = 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate (pH 7.0)] for 2 hours at room temperature. The sections were then hybridized with 75 μ l of hy-

bridization buffer (1 \times), covered with a cover slip, and incubated overnight in a humidified chamber at 67°C. The best labeling was obtained at a probe concentration of 1:100. Slides were then washed in 5 \times SSC/50% formamide at 68°C for 1 hour and in 2 \times SSC for 1 hour at 68°C, and then incubated in ribonuclease A (20 mg/ml) at 37°C for 30 min followed by 2 \times SSC for 1 hour and 0.2 \times SSC for 30 min (twice) at room temperature. Slides were mounted and then viewed with a Zeiss Axioskop microscope equipped with epifluorescence.

In situ PLA

Eyeballs obtained from Flag-MT₁/Myc-MT₂ were fixed in 4% PFA overnight, transferred to a 20% sucrose solution for 12 to 14 hours, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles), and then sectioned (10 μ m). PLA was conducted with Duolink In Situ Fluorescence kit (Sigma) (39). After blocking (Duolink blocking solution), the sections were incubated with the mouse c-Myc antibody (1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc.) and the Flag antibody (1:500; Sigma-Aldrich) overnight. Anti-mouse MINUS PLA probe (1:5; Sigma), anti-rabbit PLUS PLA probe (1:5; Sigma), and Duolink In Situ Detection Reagents Red kit were used to detect protein interactions. Sections were washed with buffer A [NaCl (8.8 g/liter), tris base (1.2 g/liter), Tween 20 (0.5 ml/liter) (pH 7.4)] after the first and second incubation, and the wash buffer B [NaCl (5.84 g/liter), tris base (4.24 g/liter), tris-HCl (26 g/liter) (pH 7.5)] was used after the amplification process. After drying at room temperature, the slides were mounted with cover slip with Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI (Sigma). Slides were mounted and then viewed with a Zeiss Axioskop microscope equipped with epifluorescence. Primary antibodies were omitted in control sections.

Scotopic ERG

Mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg). The pupils were dilated with 1% atropine and 2.5% phenylephrine (Sigma), and mice were placed on a heating pad set at 37°C with feedback from the rectal temperature probe. The eye was lubricated with saline solution, and a contact lens-type electrode (LKC Technologies model: N1530NNC) was topically applied on the cornea. A needle reference was inserted in other side of cheek, and the ground needle was inserted into the base of tail. All preparation of ERG recordings was conducted under red dim light (<3 lux, 15-W Kodak safe lamp filter 1A, Eastman Kodak).

All electrodes were connected to a Universal DC Amplifier (LKC Technologies model UBA-4200), and bands were filtered from 0.3 to 500 Hz. Data were recorded and analyzed by EM for Windows (ver. 8.2.1, LKC Technologies). Core body temperature was maintained in 37°C by a feedback temperature control system (FHC Inc.) throughout the entire ERG recording. In the dark-adapted ERG protocol, seven series of flash intensities between 0.03 and 6.28 cd*s/m² were presented to the mouse eye. Flashes were generated by 530-nm green LEDs in a Ganzfeld illuminator (LKC Technologies), and the interval of the flashes increased from 0.612 to 30 s as the intensity of the flashes increased. Responses of 3 to 10 flashes were averaged to generate a waveform for each step of light intensity, and the a-wave and b-wave of ERG measurement were analyzed from the trace of waveform. To directly determine the photoreceptors' response to melatonin, we used an early time point in the a-wave (7 ms after the initial flash of light) [see (36) for details], because at this early time, the amplitude of the a-wave is not affected by the activity of the bipolar cells (37).

Administration of exogenous melatonin, melatonin agonists, antagonists, and inhibitors

Melatonin (Sigma) was dissolved in ethanol (8 mg/ml) and then diluted with sterilized PBS (0.1 mg/ml, 1.25% ethanol). Melatonin was administered by intraperitoneal (1 mg/kg) or intravitreal injection in different

dosages according to the experimental designs. We used melatonin receptor agonists or antagonists, and various activators or inhibitors in the experiments as follows: IIK7 [Sigma, dimethyl sulfoxide (DMSO) stock solution (30 mg/ml), 0.005% final DMSO concentration], luzindole [TOCRIS, DMSO stock solution (29 mg/ml), 0.05% final DMSO concentration], 4P-PDOT [Sigma, DMSO stock solution (28 mg/ml), 0.05% final DMSO concentration], 2-APB [Sigma, DMSO stock solution (20 mg/ml), 0.006% final DMSO concentration], BIM 46187 (52) [DMSO stock solution (6.7 mg/ml), 0.23% final DMSO concentration], bisindolylmaleimide I [Sigma, DMSO stock solution (10 mg/ml), 0.1% final DMSO concentration], and PMA [TOCRIS, DMSO stock solution (61 mg/ml), 0.0003% final DMSO concentration] were dissolved in DMSO and diluted with sterilized PBS. Identical DMSO concentrations and sterilized PBS were used for vehicle control for each particular drug treatment. PTX from *Bordetella pertussis* [PTX, Sigma, stock solution (0.1 mg/ml)], 8-br-cAMP [Sigma, stock solution (25 mg/ml)], and H89 dihydrochloride hydrate (H89, Sigma, 10 mg/ml) were dissolved in sterilized double-distilled water and sterilized PBS. After mice were anesthetized with the isoflurane vaporizer machine (VetEquip), the drugs and vehicle control were intravitreally injected for a volume of 1 μ l with a 10- μ l Hamilton syringe (Hamilton Company) with 30 gauge needle attached (Becton, Dickinson & Company). A fresh needle was used for each experiment. The dosages of the drugs were calculated according to an estimated vitreal volume of 20 μ l in mouse eye (53). All drugs or vehicles, except PTX, were injected 1 hour before the ERG recording, and all animals were placed in a dark isolated chamber just after the drug was administered. PTX was administered 4 hours before ERG measurement. For some experiments, melatonin was administered by intraperitoneal injection after intravitreal administration of the drug at the dosage of 1 mg/kg. Unless differently specified in the text, all the ERGs were performed at ZT6.

Plasmid constructions

The 3.8-kb fragment of the mouse rhodopsin promoter was generated by chemical synthesis (DNA2.0 Inc.) and flanked with a Mlu I (5') and a Bam HI site (3') for insertion into the pJ cloning plasmid from DNA2.0 Inc. The coding regions of mouse MT₁ (NM_008639.2) or mouse MT₂ (NM_145712.2) that were preceded by a Flag or Myc tag sequence, respectively, were generated by chemical synthesis (DNA2.0 Inc.) and flanked with attL1 and attL2 sites and cloned into the pJ cloning plasmid. Flag-MT₁ and Myc-MT₂ fragments were cloned behind the rhodopsin promoter into the lentiviral pTrip IZI vector to generate the pTrip-rho-Flag-MT₁ and pTrip-rho-Myc-MT₂ vectors. Flag-MT₁ and Myc-MT₂ fragments were inserted into the pcDNA3 expression vector behind the CMV (cytomegalovirus) promoter to generate pcDNA3-CMV-Flag-MT₁ and pcDNA3-Myc-MT₂ vectors. The Myc-MT₂-P95L mutant was generated by site-directed mutagenesis from the corresponding MT₂ wild-type vector. BRET fusion proteins were generated by inserting the coding regions without the STOP codon of Flag-, HA (hemagglutinin)-, or Myc-tagged mouse MT₁, MT₂, or MT₂-P95L receptors, respectively, in frame with the coding region of *Renilla* luciferase variant (Rluc8) or YFP: Flag-mMT₁-Rluc8, Flag-mMT₁-YFP, HA-mMT₂-Rluc8, HA-mMT₂-YFP, Myc-MT₂-P95L-Rluc8, and Myc-MT₂-P95L-YFP. All constructs were verified by sequencing.

Coimmunoprecipitation

Transfected cells were solubilized in RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer [20 mM Hepes (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol], supplemented with protease inhibitors [leupeptine (1 μ g/ml), pepstatin (1 μ g/ml), benzamide (2 μ g/ml), AEBSF (1 μ g/ml)] and 1% Triton X-100 for at least 3 hours at 4°C. The soluble fraction was recovered by 1 hour of centrifugation at 13,000g and subjected to immunoprecipitation with antibodies (2 μ g/ml) recognizing the Flag (Sigma F7425) or the GFP epitopes

(Abcam ab290). Denatured complexes were heated, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with antibodies against either the Flag epitope (Sigma F3165, 1:1000 dilution), Rluc (Millipore MAB4400, 1:500), or GFP (Roche 11814460, 1:500). Immunoreactivity was revealed using secondary antibodies coupled to 680- or 800-nm fluorophores with the Odyssey LI-COR infrared fluorescent scanner (ScienceTec). For coimmunoprecipitation experiments from retinal samples, three retinas were solubilized overnight in 1 ml of TEM [75 mM Tris (pH 7.5), 2 mM EDTA, 12 mM MgCl₂] supplemented with protease inhibitors and 1% Triton X-100 at 4°C. Immunoprecipitation was performed with mouse antibodies against the Flag epitope (F3165, Sigma) (2 μ g) and immunoblots with rabbit antibodies against the Myc epitope (sc-789, A14, 1:500).

BRET assay

For BRET donor saturation curves, HEK293T cells seeded in six-well plates were transiently transfected with 0.5 ng of MT₁-Rluc, 2 ng of MT₂-Rluc, or 1 ng of MT₂-P95L-Rluc and 10 to 3000 ng of YFP plasmids. Twenty-four hours after transfection, cells were transferred into a 96-well white OptiPlate (PerkinElmer Life Sciences) precoated with poly-L-lysine (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) and incubated for another 24 hours before BRET measurements. BRET measurements were performed as described previously (54) with the Mithras lumino/fluorometer (Berthold Technologies). Results are expressed in milliBRET units (mBU), with 1 mBU corresponding to the BRET ratio values multiplied by 1000.

Radioligand-binding assay

Competition binding experiments were performed as previously described (55) with 200 pM 2-[¹²⁵I]iodomelatonin (PerkinElmer Life Sciences) and a range of different concentrations of the indicated melatonin receptor ligands. K_i values were determined according to the Cheng-Prusoff formula: $K_i = IC_{50}/(1 + L + K_d)$.

cAMP assay

Concentrations of cAMP were determined in cell suspensions stimulated with 2 μ M forskolin for 30 min at room temperature in the absence or presence of different concentrations of melatonin (0.1 fM to 1 μ M) by HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) using the Cisbio cAMP femto Tb kit according to the manufacturer's instructions.

IP assay

IP concentrations were determined in cell suspensions stimulated for 90 min at 37°C in the absence or presence of different concentrations of melatonin (1 fM to 10 μ M) by HTRF with the Cisbio IP-One Tb kit according to the manufacturer's instructions.

PKC activity assay

PKC activity was measured by a method adapted from Kent *et al.* (56). Briefly, cells seeded on polylysine-coated 24-well plates were serum-deprived overnight and stimulated with 100 nM melatonin for 15 min. Cells were then put on ice, washed with ice-cold PBS containing 1 mM Na₃VO₄, and incubated for 20 min in 25 μ l of a buffer (137 mM NaCl, 20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors) containing 0.05% digitonin. Activity was then measured with the Upstate PKC Assay Kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions.

Lentivirus production

The viral particles were produced by transient transfection of HEK293T cells with the previously described p8.9 and pMD-G plasmids and either

pTrip-rho-Flag-MT₁, pTrip-rho-Myc-MT₂, or pTrip-rho-Myc-MT₂-P95L vectors. Supernatants were collected 48 hours after transfection, and high titer stocks were prepared as described (57). The stocks were titrated and normalized for the p24 antigen assayed by enzyme-linked immunosorbent assay.

Generation of transgenic mice

The lentiviral pTrip-rho-Flag-MT₁, pTrip-rho-Myc-MT₂, or pTrip-rho-Myc-MT₂-P95L vectors expressing MT₁, MT₂, or MT₂-P95L under the control of the rhodopsin promoter were injected into the perivitelline space of mouse fertilized (C57/bl6/N) eggs as described previously (58). The injected eggs were next reimplanted into the oviduct of pseudopregnant females 0.5 day after coitus. Flag-MT₁/Myc-MT₂ double transgenic mice were generated by crossing Flag-MT₁ and Myc-MT₂ transgenic mice.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/6/296/ra89/DC1

Fig. S1. Flag and Myc immunoreactivity in the photoreceptors Flag-MT₁ and Myc-MT₂ mice.
Fig. S2. Competition binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin on membranes of HEK293 cells expressing mouse MT₁ and MT₂.

Fig. S3. The effect of luzindole and 4P-PD0T on the ERG.

Fig. S4. Functional characterization of the MT₂-P95L mutant in transfected HEK293T cells.

Fig. S5. The effect of different signaling pathway stimulators and inhibitors on the amplitude of the a-wave at 7 ms.

Fig. S6. Inhibition of melatonin-induced IP production by 4P-PD0T.

REFERENCES AND NOTES

- D. M. Rosenbaum, S. G. Rasmussen, B. K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).
- M. Rask-Andersen, M. S. Almén, H. B. Schiöth, Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579–590 (2011).
- M. Audet, M. Bouvier, Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* **151**, 14–23 (2012).
- M. R. Whorton, M. P. Bokoch, S. G. Rasmussen, B. Huang, R. N. Zare, B. Kobilka, R. K. Sunahara, 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 (2007).
- T. H. Bayburt, A. J. Leitz, G. Xie, D. D. Oprian, S. G. Sligar, Transduction activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *J. Biol. Chem.* **282**, 14875–14881 (2007).
- G. Milligan, G protein-coupled receptor hetero-dimerization: Contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 5–14 (2009).
- S. Ferré, R. Franco, Oligomerization of G-protein-coupled receptors: A reality. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 1–5 (2010).
- R. Rozenfeld, L. A. Devi, Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 124–130 (2010).
- S. Ferré, G. Navarro, V. Casadó, A. Cortés, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís, R. Franco, G protein-coupled receptor heteromers as new targets for drug development. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **91**, 41–52 (2010).
- M. J. Lohse, Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 53–58 (2010).
- M. Kamal, R. Jockers, Biological significance of GPCR heteromerization in the neuro-endocrine system. *Front. Endocrinol.* **2**, 2 (2011).
- M. Bouvier, N. Heveker, R. Jockers, S. Marullo, G. Milligan, BRET analysis of GPCR oligomerization: Newer does not mean better. *Nat. Methods* **4**, 3–4 (2007).
- K. A. Jones, B. Borowsky, J. A. Tamn, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchec, C. Gerald, GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* **396**, 674–679 (1998).
- J. H. White, A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord, F. H. Marshall, Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* **396**, 679–682 (1998).
- J. González-Maeso, R. L. Ang, T. Yuen, P. Chan, N. V. Weisstaub, J. F. López-Giménez, M. Zhou, Y. Okawa, L. F. Callado, G. Milligan, J. A. Gingrich, M. Filizola, J. J. Meana, S. C. Sealfon, Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93–97 (2008).
- S. Q. He, Z. N. Zhang, J. S. Guan, H. R. Liu, B. Zhao, H. B. Wang, Q. Li, H. Yang, J. Luo, Z. Y. Li, Q. Wang, Y. J. Lu, L. Bao, X. Zhang, Facilitation of μ -opioid receptor activity by preventing δ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron* **69**, 120–131 (2011).
- S. González, D. Moreno-Delgado, E. Moreno, K. Pérez-Capote, R. Franco, J. Mallol, A. Cortés, V. Casadó, C. Lluís, J. Ortiz, S. Ferré, E. Canela, P. J. McCormick, Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D₄ receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol.* **10**, e1001347 (2012).
- M. A. Ayoub, C. Couturier, E. Lucas-Meunier, S. Angers, P. Fossier, M. Bouvier, R. Jockers, 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 (2002).
- M. A. Ayoub, A. Levoe, P. Delagrang, R. Jockers, Preferential formation of MT₁/MT₂ melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT₂ homodimers. *Mol. Pharmacol.* **66**, 312–321 (2004).
- R. Jockers, P. Maurice, J. A. Boutin, P. Delagrang, Melatonin receptors, hetero-dimerization, signal transduction and binding sites: What's new? *Br. J. Pharmacol.* **154**, 1182–1195 (2008).
- M. L. Dubocovich, P. Delagrang, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali, J. Olcese, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol. Rev.* **62**, 343–380 (2010).
- A. Levoe, R. Jockers, M. A. Ayoub, P. Delagrang, E. Savaskan, J. L. Guillaume, Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?—Focus on melatonin receptors. *Chronobiol. Int.* **23**, 419–426 (2006).
- E. Savaskan, A. Wirz-Justice, G. Olivieri, M. Pache, K. Kräuchi, L. Brydon, R. Jockers, F. Müller-Spahn, P. Meyer, Distribution of melatonin MT₁ receptor immunoreactivity in human retina. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 519–526 (2002).
- J. Scher, E. Wankiewicz, G. M. Brown, H. Fujieda, MT₁ melatonin receptor in the human retina: Expression and localization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 889–897 (2002).
- P. Meyer, M. Pache, K. U. Loeffler, L. Brydon, R. Jockers, J. Flammer, A. Wirz-Justice, E. Savaskan, Melatonin MT₁-receptor immunoreactivity in the human eye. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 1053–1057 (2002).
- E. Savaskan, R. Jockers, M. Ayoub, D. Angeloni, F. Fraschini, J. Flammer, A. Eckert, F. Müller-Spahn, P. Meyer, The MT₂ melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **4**, 47–51 (2007).
- G. Tosini, M. Menaker, Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**, 419–421 (1996).
- G. Tosini, A. J. Davidson, C. Fukuhara, M. Kasamatsu, O. Castanon-Cervantes, Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J.* **21**, 3866–3871 (2007).
- G. Tosini, K. Baba, C. K. Hwang, P. M. Iuvone, Melatonin: An underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp. Eye Res.* **103**, 82–89 (2012).
- A. F. Wiechmann, M. J. Vrieze, R. Dighe, Y. Hu, Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel_{1c} melatonin receptor in transgenic *Xenopus laevis* retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4522–4531 (2003).
- Y. Ping, H. Huang, X. J. Zhang, X. L. Yang, Melatonin potentiates rod signals to ON type bipolar cells in fish retina. *J. Physiol.* **586**, 2683–2694 (2008).
- K. Baba, N. V. Pozdelyev, F. Mazzoni, S. Contreras-Alcantara, C. Liu, M. Kasamatsu, T. Martinez-Merlos, E. Strettoi, P. M. Iuvone, G. Tosini, Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT₁ melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15043–15048 (2009).
- C. Yi, X. Pan, H. Yan, M. Guo, W. Pierpaoli, Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1057**, 384–392 (2005).
- R. Rosen, D. N. Hu, V. Perez, K. Tai, G. P. Yu, M. Chen, P. Tone, S. A. McCormick, J. Walsh, Urinary 6-sulfatoxymelatonin level in age-related macular degeneration patients. *Mol. Vis.* **15**, 1673–1679 (2009).
- S. Contreras-Alcantara, K. Baba, G. Tosini, Removal of melatonin receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci. Lett.* **494**, 61–64 (2011).
- J. G. Robson, H. Maeda, S. M. Saszik, L. J. Frishman, In vivo studies of signaling in rod pathways of the mouse using the electroretinogram. *Vision Res.* **44**, 3253–3268 (2004).
- N. S. Peachey, T. A. Ray, R. Florijn, L. B. Rowe, T. Sjoerdsma, S. Contreras-Alcantara, K. Baba, G. Tosini, N. V. Pozdelyev, P. M. Iuvone, P. Bojang Jr., J. N. Pearing, H. J. Simonsz, M. van Genderen, D. G. Birch, E. I. Traboulsi, A. Dorfman, I. Lopez, H. Ren, A. F. Goldberg, P. M. Nishina, P. Lachapelle, M. A. McCall, R. K. Koenekoop, A. A. Bergen, M. Kamermans, R. G. Gregg, GPR179 is required for depolarizing bipolar cell function and is mutated in autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 331–339 (2012).
- A. Sengupta, K. Baba, F. Mazzoni, N. V. Pozdelyev, E. Strettoi, P. M. Iuvone, G. Tosini, Localization of melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. *PLoS One* **6**, e24483 (2011).
- P. Trifilieff, M. L. Rives, E. Urizar, R. A. Piskrowski, H. D. Vishwasrao, J. Castrillon, C. Schmauss, M. Slättman, M. Gullberg, J. A. Javitch, Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: Endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* **51**, 111–118 (2011).

40. D. Sugden, L. K. Yeh, M. T. Teh, Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists. *Reprod. Nutr. Dev.* **39**, 335–344 (1999).
41. A. Bonnefond, N. Clément, K. Fawcett, L. Yengo, E. Vaillant, J. L. Guillaume, A. Dechaume, F. Payne, R. Rousset, S. Czernichow, S. Hercberg, S. Hadjadj, B. Balkau, M. Marre, O. Lantieri, C. Langenberg, N. Bouatia-Naji, G. Charpentier, M. Vaxillaire, G. Rocheleau, N. J. Wareham, R. Sladek, M. I. McCarthy, C. Dina, I. Barroso, R. Jockers, P. Froguel, Rare *MTNR1B* variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **44**, 297–301 (2012).
42. L. Pei, S. Li, M. Wang, M. Diwan, H. Anisman, P. J. Fletcher, J. N. Nobrega, F. Liu, Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat. Med.* **16**, 1393–1395 (2010).
43. X. Y. Liu, Z. C. Liu, Y. G. Sun, M. Ross, S. Kim, F. F. Tsai, Q. F. Li, J. Jeffrey, J. Y. Kim, H. H. Loh, Z. F. Chen, Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids. *Cell* **147**, 447–458 (2011).
44. A. Kem, R. Albarran-Zeckler, H. E. Walsh, R. G. Smith, Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* **73**, 317–332 (2012).
45. A. J. Ghalayini, R. E. Anderson, Activation of bovine rod outer segment phospholipase C by arrestin. *J. Biol. Chem.* **267**, 17977–17982 (1992).
46. A. C. Newton, D. S. Williams, Does protein kinase C play a role in rhodopsin desensitization? *Trends Biochem. Sci.* **18**, 275–277 (1993).
47. W. Orisme, J. Li, T. Goldmann, S. Bolch, U. Wolfrum, W. C. Smith, Light-dependent translocation of arrestin in rod photoreceptors is signaled through a phospholipase C cascade and requires ATP. *Cell. Signal.* **22**, 447–456 (2010).
48. L. Brydon, F. Roka, L. Petit, P. de Coppet, M. Tissot, P. Barrett, P. J. Morgan, C. Nanoff, A. D. Strosberg, R. Jockers, Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G₁₂, G₁₃, and G_{q/11} proteins. *Mol. Endocrinol.* **13**, 2025–2038 (1999).
49. A. J. McArthur, A. Hunt, M. U. Gillette, Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: Activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* **138**, 627–634 (1997).
50. C. Liu, D. R. Weaver, X. Jin, L. P. Shearman, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, S. M. Reppert, Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**, 91–102 (1997).
51. A. E. Hunt, W. M. Al-Ghoul, M. U. Gillette, M. L. Dubocovich, Activation of MT₂ melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C110–C118 (2001).
52. M. A. Ayoub, M. Damian, C. Gespach, E. Ferrandis, O. Lavergne, O. De Wever, J. L. Banères, J. P. Pin, G. P. Prévost, Inhibition of heterotrimeric G protein signaling by a small molecule acting on G α subunit. *J. Biol. Chem.* **284**, 29136–29145 (2009).
53. S. M. Saszik, J. G. Robson, L. J. Frishman, The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J. Physiol.* **543**, 899–916 (2002).
54. K. Tadagaki, D. Tudor, F. Gbahou, P. Tschische, M. Waldhoer, M. Bomsel, R. Jockers, M. Kamal, Human cytomegalovirus-encoded UL33 and UL78 heteromerize with host CCR5 and CXCR4 impairing their HIV coreceptor activity. *Blood* **119**, 4908–4918 (2012).
55. J. L. Guillaume, A. M. Daulat, P. Maurice, A. Levoe, M. Migaud, L. Brydon, B. Malpoux, C. Borg-Grappin, R. Jockers, The PDZ protein mupp1 promotes G_i coupling and signaling of the Mt₁ melatonin receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 16762–16771 (2008).
56. K. C. Kent, S. Mii, E. O. Harrington, J. D. Chang, S. Mallette, J. A. Ware, Requirement for protein kinase C activation in basic fibroblast growth factor–induced human endothelial cell proliferation. *Circ. Res.* **77**, 231–238 (1995).
57. C. Couturier, C. Sarkis, K. Séron, S. Belouzard, P. Chen, A. Lenain, L. Corset, J. Dam, V. Vauthier, A. Dubart, J. Mallet, P. Froguel, Y. Rouillé, R. Jockers, Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 19476–19481 (2007).
58. C. Lois, E. J. Hong, S. Pease, E. J. Brown, D. Baltimore, Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, 868–872 (2002).

Acknowledgments: We thank H. Pilet, C. Sarkis, and M.-J. Lecomte (Newvectys Inc., France) for help and advice in the design, construction, and production of lentiviral expression vectors. We thank J. Dam and M. Scott (Institut Cochin, France) for their expert comments on the manuscript, Morehouse School of Medicine Center for Laboratory Animal Resources for housekeeping the transgenic mouse models, and S. M. Reppert and D. R. Weaver (University of Massachusetts Medical School) for providing the C3H MT₂^{-/-} knockout mice homozygous for the *rd1* mutation. **Funding:** This work was supported by NIH grants NS43459, EY028821, EY022216, 5U54NS060659, S21MD000101, G12-RR03034, and U54RR026137 and by INSERM, CNRS, and the “Who am I?” laboratory of excellence no. ANR-11-LABX-0071 funded by the French government through its “Investments for the Future” program operated by the French National Research Agency (ANR) under grant no. ANR-11-IDEX-0005-01. A.B.-C. was supported by a doctoral fellowship from the CODDIM 2009 (Région Ile-de-France). **Author contributions:** K.B. participated in the project design, performed experiments with electroretinography and PLA, interpreted the data, and contributed to the writing of the paper; A.B.-C. designed and performed Western blots and coimmunoprecipitation experiments, participated in IP detection, and interpreted the data; A.-S.J. designed and performed all BRET experiments; M.K. generated the MT₂-P95L mutant, performed coimmunoprecipitation from the retina, and constructed lentiviral vectors; J.-L.G. performed IP and cAMP detection and PKC activity; S.D. generated transgenic mice; F.G. constructed BRET fusion protein vectors and supervised BRET experiments; K.Y. performed initial BRET and coimmunoprecipitation experiments; C.L. performed in situ hybridization; S.C.-A. bred and genotyped the various transgenic mice; R.J. was responsible for the project supervision, experiment design, data interpretation, and manuscript writing and provided funding support; and G.T. was responsible for the project supervision, experiment design, data interpretation, and manuscript writing and provided funding support. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing financial interests.

Submitted 2 May 2013

Accepted 20 September 2013

Final Publication 8 October 2013

10.1126/scisignal.2004302

Citation: K. Baba, A. Benleulmi-Chaachoua, A.-S. Journé, M. Kamal, J.-L. Guillaume, S. Dussaud, F. Gbahou, K. Yettou, C. Liu, S. Contreras-Alcantara, R. Jockers, G. Tosini, Heteromeric MT₁/MT₂ melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci. Signal.* **6**, ra89 (2013).

Supplementary Materials for
Heteromeric MT₁/MT₂ Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function

Kenkichi Baba, Abla Benleulmi-Chaachoua, Anne-Sophie Journé, Maud Kamal, Jean-Luc Guillaume, Sébastien Dussaud, Florence Gbahou, Katia Yettou, Cuimei Liu, Susana Contreras-Alcantara, Ralf Jockers,* Gianluca Tosini*

*Corresponding author. E-mail: gtosini@msm.edu (G.T.); ralf.jockers@inserm.fr (R.J.)

Published 8 October 2013, *Sci. Signal.* **6**, ra89 (2013)

DOI: 10.1126/scisignal.2004302

The PDF file includes:

Fig. S1. Flag and Myc immunoreactivity in the photoreceptors Flag-MT₁ and Myc-MT₂ mice.

Fig. S2. Competition binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin on membranes of HEK293 cells expressing mouse MT₁ and MT₂.

Fig. S3. The effect of luzindole and 4P-PDOT on the ERG.

Fig. S4. Functional characterization of the MT₂-P95L mutant in transfected HEK293T cells.

Fig. S5. The effect of different signaling pathway stimulators and inhibitors on the amplitude of the a-wave at 7 ms.

Fig. S6. Inhibition of melatonin-induced IP production by 4P-PDOT.

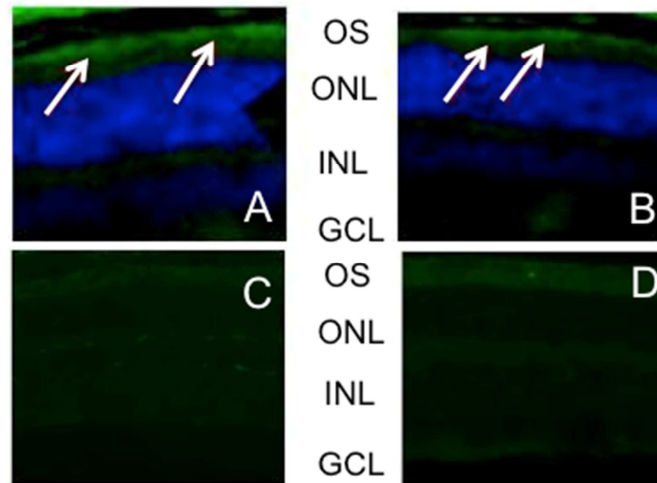


Fig. S1. Flag and Myc immunoreactivity in the photoreceptors Flag-MT₁ and Myc-MT₂ mice. (A) Coronal section of a retina obtained from a Flag-MT₁ mouse and stained with mouse Flag antibody. (B) Coronal section of a retina obtained from a Myc-MT₂ mouse and stained with mouse Myc antibody. In both cases, we only detected immunoreactivity in the photoreceptors (white arrows). No immunoreactivity was detected in retinas obtained from control mice using the Flag antibody (C) or Myc antibody (D). OS, Outer segments; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer

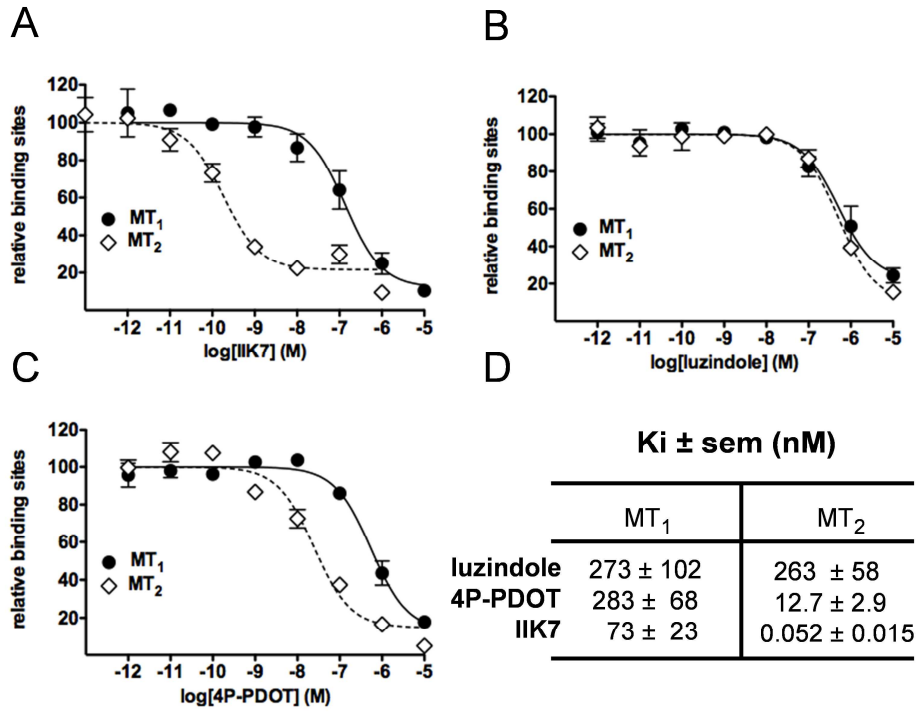


Fig. S2. Competition binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin on membranes of HEK293 cells expressing mouse MT₁ and MT₂. (A) IIK7, (B) luzindole, (C) 4P-PDOT; (D) K_i values were calculated according to Cheng–Prussoff formula. Data represent the mean values of duplicates performed three times and are fitted with GraphPad Prism.

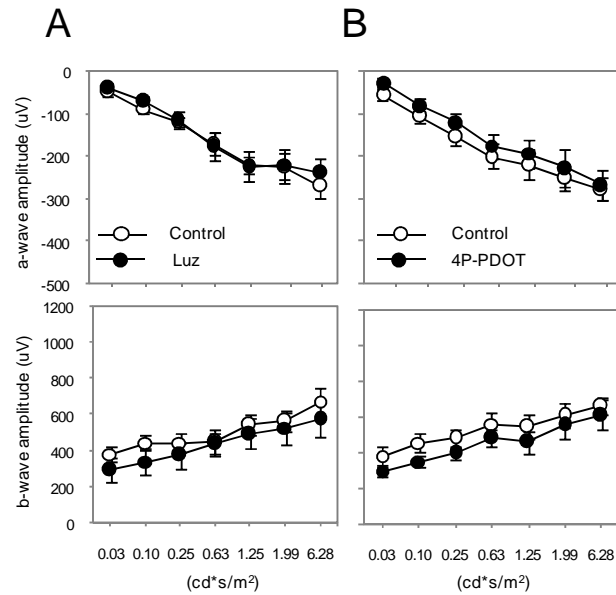


Fig. S3. The effect of luzindole and 4P-PDOT on the ERG. Intravitreal injections of 50 μM of luzindole (**A**) or 4P-PDOT (**B**) alone did not affect the amplitude of the a-wave or b-wave (Two-way ANOVA, $P > 0.1$). Mice received an intravitreal injection of luzindole or 4P-PDOT in the right eye and vehicle in the left eye. Data are presented as mean \pm SEM; $n = 6$ for each time point. All the experiments were performed at ZT6. Luminance is expressed in candela second per square meter ($\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$).

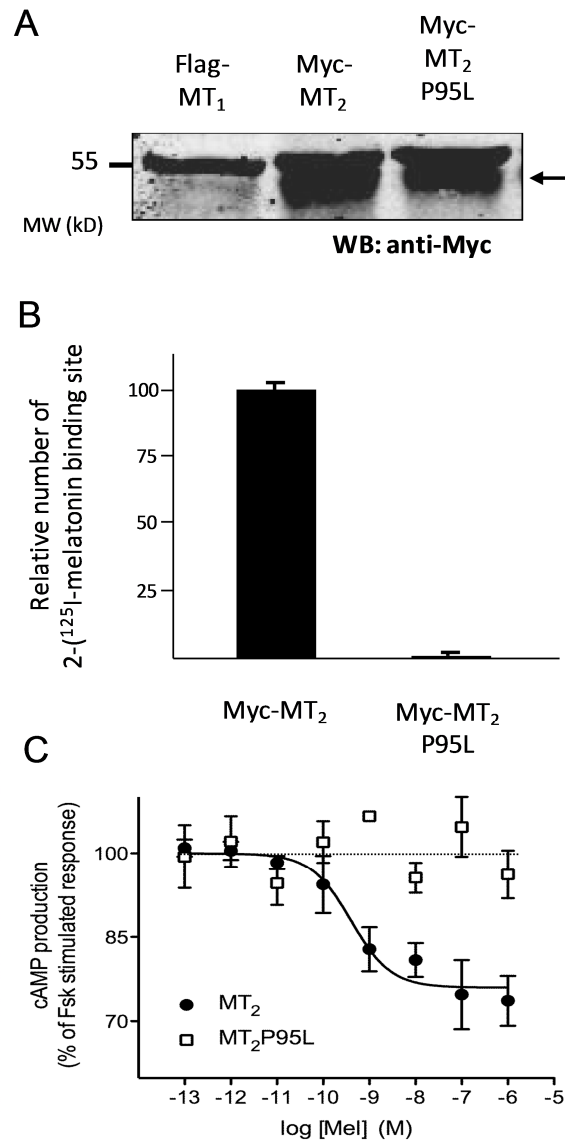


Fig. S4. Functional characterization of the MT₂-P95L mutant in transfected HEK293T cells. (A) The Myc-MT₂-P95L mutant is expressed to a similar extent as the Myc-MT₂ wild type receptor as monitored by Western blot with the Myc antibody. Data are representative of three experiments. (B) The Myc-MT₂-P95L mutant is devoid of 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin binding. Specific binding was defined as displaceable by an excess of melatonin (10 μ M). (C) The Myc-MT₂-P95L mutant does not inhibit forskolin (Fsk)-stimulated cAMP. Data in B and C are shown as mean \pm SEM, n=3.

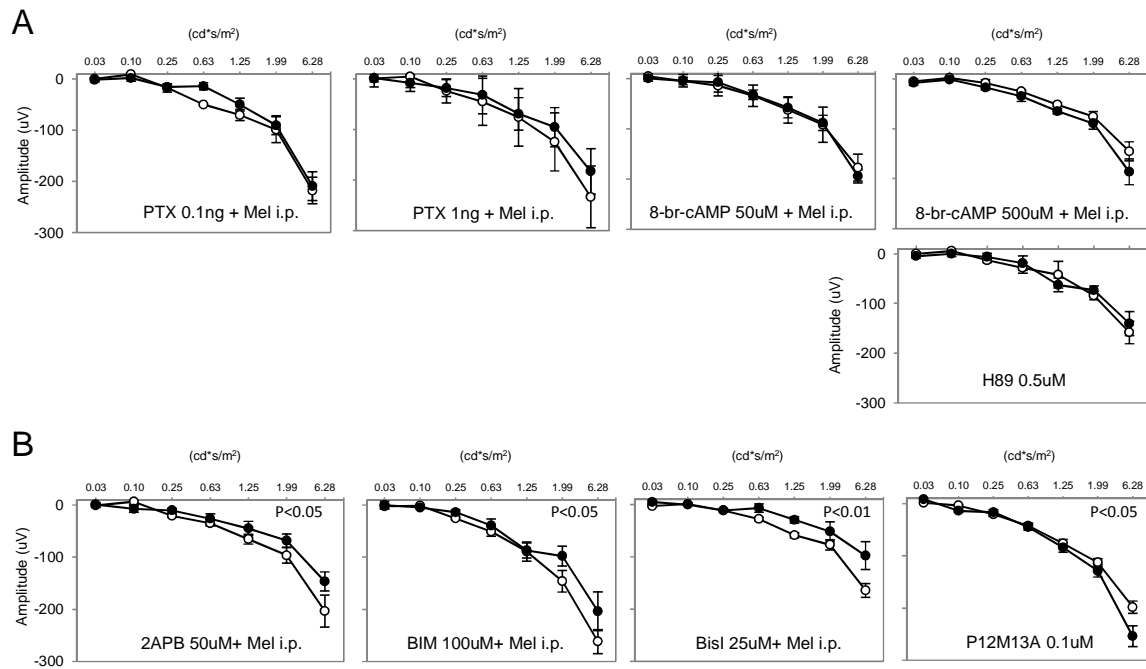


Fig. S5. The effect of different signaling pathway stimulators and inhibitors on the amplitude of the a-wave at 7 ms. (A) Quantification of the dark-adapted response of the a-wave (7 ms) to flashes of light recorded after 1 h of dark adaptation and i.p. injection of melatonin (1 mg/kg) or vehicle in the middle of the day (ZT6). **(B)** Melatonin injection and PTX (0.1 ng and 1 ng); 8-br-cAMP (50 μ M and 500 μ M); and H89 (0.5 μ M). **(C)** 2ABP (50 μ M); BIM 46187 (100 μ M); BisI (25 μ M); and P12M13A (PMA, 0.1 μ M). Black circles represent melatonin-injected mice, and white circles represent vehicle-injected mice. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 6-8$ for each group. Only activation or inhibition of the PLC-PKC pathway induced a significant increase or inhibition of the photoreceptors' response (Two-way ANOVA, $P < 0.05, 0.01$). All the experiments were performed at ZT6.

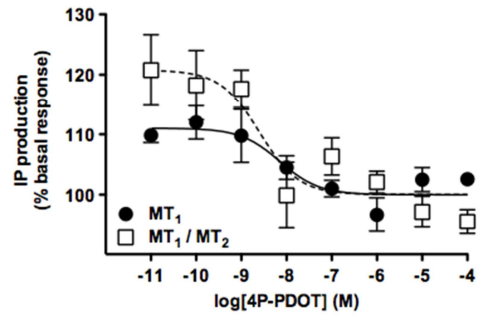


Fig. S6. Inhibition of melatonin-induced IP production by 4P-PDOT. HEK 293T cells were transfected with MT₁ alone or together with MT₂. Cells were stimulated with 100 nM melatonin in the absence or presence of increasing concentrations of 4P-PDOT. Data are shown as mean \pm SEM, n = 3.

Discussion

Ce travail constitue la première étude qui décrit un effet physiologique exclusivement médié par le dimère MT_1/MT_2 *in vivo*. D'une part, cette publication fait suite aux quelques travaux qui démontrent l'existence des dimères de RCPG *in vivo* et d'autre part, il s'agit de l'une des premières études à mettre en évidence un effet physiologique dépendant des hétéromères de RCPG et qui est spécifique à un tissu particulier.

En effet, le fait que les souris KO- MT_1 et KO- MT_2 présentent le même phénotype concernant la photosensibilisation des bâtonnets, avait fortement suggéré l'existence d'une complémentation fonctionnelle entre les récepteurs murins MT_1 et MT_2 . Ceci a notamment laissé penser que l'effet étudié devrait être médié par le dimère MT_1/MT_2 . Les récepteurs mélatoninergiques ne présentent donc pas de redondance fonctionnelle au niveau des photorécepteurs ; de plus, l'activation des deux MT_1 et MT_2 , est requise pour médier les effets de la mélatonine.

1) *Le choix de la lignée murine C3H*

Au niveau de la rétine, la mélatonine est principalement sécrétée par les photorécepteurs pour agir de manière autocrine sur ces mêmes cellules, et de manière paracrine sur les cellules des couches rétinienne voisines (Wiechmann & Summers ; 2008). Dans cette étude, nous avons rapporté que le tracé ERG des animaux adaptés à l'obscurité, subit des variations circadiennes entre (ZT6 : jour) et (ZT18 : nuit) dans la lignée de souris utilisée C3H (Figure 1.A & B). Contrairement aux souris C57BL/6 qui sont déficientes pour la mélatonine (mais qui présentent des récepteurs mélatoninergiques fonctionnels), la souche de souris utilisée dans cette étude, présente une sécrétion rythmique de la mélatonine, qui permet d'entraîner les gènes de l'horloge interne (Stehle et al ; 2002) (Torres-Farfan et al ; 2006). Par ailleurs, la souche C57BL/6 présenterait une amplitude de rythmicité faible des gènes de l'horloge, un paramètre qui peut compromettre les analyses ERG (Dinet et al 2007). Les souris C57BL/6 présentent un défaut de synthèse rythmique de l'enzyme clé dans le catabolisme de la mélatonine, l'AANAT. Ces souris auraient été sélectionnées « par mégarde » de la part des animaliers, certainement au motif que les cycles de reproduction des individus retenus pour ce fond génétique sont maîtrisés en l'absence de la mélatonine (Tamarkin et al ; 1985) (Tosini et al ; 1998). Cependant, les souches de souris C3H commercialisées présentent elles aussi des désavantages. Les souris C3H possèdent une mutation au niveau du gène *rd1* et développent une dégénérescence rétinienne entraînant la mort des photorécepteurs. Par conséquent, une nouvelle lignée de souris C3H^{+/+} déléetée de la mutation *rd1* a été générée, afin de pouvoir étudier les effets de la mélatonine au niveau de la rétine (Tosini et al ; 1998).

2) *Le couplage Gi/Gq des récepteurs de la mélatonine*

Nous avons vu que dans les cellules en culture, seul le récepteur MT₁ est capable d'activer la voie Gq (Brydon et al ; 1999b) et plusieurs études ont rapporté l'effet de la mélatonine dans l'induction d'une cascade de signalisation Gq.

Les ARNm des récepteurs MT₁ et MT₂ sont exprimés au niveau des cellules du myomètre chez les femelles de rat. Aussi, la stimulation par des analogues mélatoninergiques active les cascades de signalisation Gi et Gq et la voie Gq entraîne l'activation du canal potassique activé par le calcium (BKCa) via PLC et PKC dans les cellules musculaires (Steffens et al ; 2003). Par ailleurs, la même cascade d'activation a été rapportée au niveau de l'artère caudale chez le rat et le blocage du canal BKCa antagonise l'effet vasoconstricteur de la mélatonine, qui serait lié à l'activation des récepteurs MT₁ (Doolen et al ; 1998).

Cependant, certaines publications rapportent une activation de la voie Gq par MT₂. A cet égard, Steffens *et al.* avaient montré que l'activation du canal BKCa est bloquée suite à l'application du luzindole et avaient suggéré l'implication des récepteurs MT₂ dans cette voie (Steffens et al ; 2003). Cependant, le luzindole est un ligand qui présente une préférence pour MT₂, mais qui ne lui est pas spécifique considérant les récepteurs humains (MT₂, Ki = 44.7 nM ; MT₁, Ki = 603 nM). En outre, notre résultat (Figure S.2) démontre clairement que le luzindole se lie aux récepteurs murins MT₁ et MT₂ avec la même affinité (MT₂, Ki = 263 nM ; MT₁, Ki = 273 nM), ce qui souligne le fait que les ligands caractérisés chez l'homme peuvent présenter un profil pharmacologique différent chez le rat ou chez la souris.

Par ailleurs, l'activation du BKCa par la voie PLC/ PKC étudiée par Doolen *et al.* ne dépend pas de l'activation de MT₂, mais de celle de MT₁ (Doolen et al ; 1998).

L'activation de la voie PLC a été montrée à l'origine de l'effet de la mélatonine sur le décalage de phase au niveau des neurones des noyaux suprachiasmatiques, un effet généralement attribué à MT₂ (Hunt et al ; 2001). Cependant, Liu *et al.* montrent que l'effet de la mélatonine sur le décalage de phase est maintenu chez les souris KO-MT₁, mais qu'il est de moindre envergure que chez les souris WT, démontrant ainsi la contribution de MT₁ dans ce phénomène (Liu et al ; 1997). De plus Hunt *et al.* montrent que le blocage par 4P-PDOT de l'effet de la mélatonine sur le décalage de phase, n'est que partiel à 1 nM de 4P-PDOT et est total à 1µM, une concentration suffisante pour inhiber les deux récepteurs MT₁ et MT₂ (4P-PDOT : MT₂, Ki = 12 nM ; MT₁, Ki = 283 nM, selon notre analyse Fig. S.2). Ce qui indique que les voies d'activation de Gq seraient dépendantes de MT₁ *in vivo* et dans les cellules en culture (Hunt et al ; 2001).

3) *Les effets allostériques au sein du dimère mMT₁/mMT₂*

Dans cette étude, nous avons démontré que les récepteurs murins MT₁ et MT₂ sont capables de former des homomères et des hétéromères de manière constitutive et indépendante de la présence du ligand (Fig. 3). La comparaison des valeurs de BRET₅₀ montre que les affinités relatives pour former les homomères et les hétéromères sont similaires, ce qui signifie que les récepteurs mMT₁ forment des complexes MT₁/MT₁, MT₂/MT₂ et MT₁/MT₂ à part égale et ce à des niveaux d'expression comparables dans les cellules HEK293. De même, le mutant mMT₂-P95L se lie aux récepteurs WT avec la même affinité et peut donc interagir et interférer avec le reste des complexes de récepteurs. Ce résultat est cependant différent du comportement des récepteurs humains dans le même type cellulaire. En effet, Ayoub *et al.* montrent que hMT₂ forme préférentiellement des hétéromères avec hMT₁ en comparaison avec MT₂/MT₂. De plus, les profils pharmacologiques déterminés en BRET de l'hétérodimère MT₁/MT₂ et de l'homomère MT₂/MT₂ sont différents : luzindole et 4P-PDOT montrent respectivement une préférence de 126 et 5 fois pour l'hétéromère MT₁/MT₂ (Ayoub et al ; 2004). En revanche, le composé S24773 lie 9 fois moins bien l'hétéromère que les récepteurs MT₁ et MT₂ seuls.

En ce qui concerne les cascades de signalisation relatives aux hétéromères, nous avons montré que mMT₂ potentialise la réponse de mMT₁ vis-à-vis du couplage à la voie Gq. D'une part, la figure 8D & E indique que les concentrations de mélatonine requises pour activer la PKC et la production d'IP (inositol phosphate) par l'hétéromère sont 10 fois inférieures à celles nécessaires pour le récepteur MT₁ seul. D'autre part, l'activation de la voie Gq par l'hétéromère nécessite que les deux protomères du dimère soient fonctionnels. En effet, l'activation sélective de MT₂ ne conduit pas à une trans-activation de la protéine Gq dans le dimère et ne suffit pas à elle seule pour activer l'hétéromère (Fig. 6A). De même, l'activation de MT₁ seulement dans le dimère MT₁/MT₂-P95L n'entraîne pas de cascade de signalisation Gq. A cet égard, il faut rappeler que le mutant MT₂-P95L ne lie pas la mélatonine, ne couple pas à la protéine G et n'active pas une cascade de signalisation dépendante de la β-arrestine (Bonnefond et al ; 2012). Il existe dans la littérature plusieurs exemples de potentialisation de signalisation de l'hétéromère par un des protomères. Par exemple, Abdalla et al. ont montré que le récepteur de la bradikinine B2 potentialise la signalisation du récepteur à l'angiotensine AT1 de manière indépendante de l'activation du récepteur B2, mais la capacité de B2 à coupler la protéine G est requise, car un mutant B2, incapable de coupler la protéine G, n'exerce aucun effet allostérique sur AT1 (AbdAlla et al ; 2000).

En définitive, mMT₁ subit un effet allostérique positif pour la voie Gq de la part du protomère MT₂. Cette potentialisation est spécifique à cette voie de signalisation et ne se fait pas au dépend du couplage Gi par l'hétéromère MT₁/MT₂ dans les cellules HEK293 transfectées (Figure 7G). En outre l'activation des deux cascades de signalisation Gi/Gq (par les hétéromères et par les homomères) suggère qu'il coexiste deux entités d'hétéromères (et d'homomères) qui pré-couplent soit Gi soit Gq, comme déjà démontré pour les récepteurs β2-AR par exemple (Hasseldine et al; 2003).

D'un point de vue mécanistique, notre étude ne constitue pas le premier exemple d'un effet modulateur sur MT_1 exercé par un autre RCPG au sein du dimère. En effet, notre laboratoire a pu montrer auparavant que les récepteurs de la mélatonine sont capables de dimériser avec GPR50 de manière constitutive et indépendante de la présence de la mélatonine. Cette dimérisation est à l'origine de changements fonctionnels seulement pour le dimère GPR50/ MT_1 et ne concerne pas GPR50/ MT_2 (Levoye et al ; 2006).

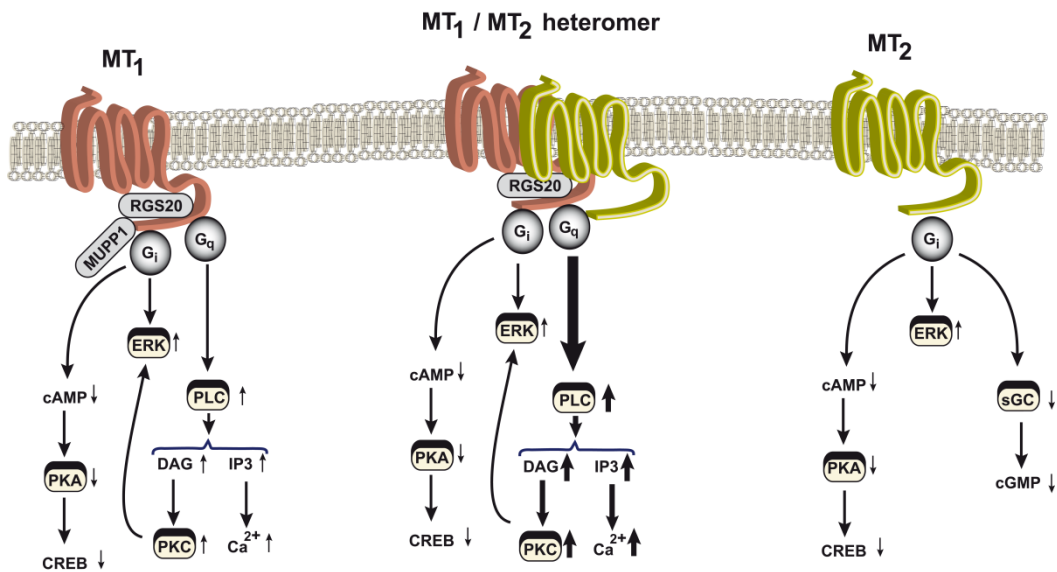
GPR50 est un récepteur orphelin qui ne lie pas la mélatonine. L'équipe a montré qu'à un niveau d'expression égale de MT_1 , le nombre de sites de liaison de la mélatonine relatifs à MT_1 , diminue fortement au sein du complexe GPR50/ MT_1 par rapport aux homomères MT_1 . Des expériences complémentaires suggèrent que le complexe GPR50/ MT_1 est dépourvu du site de liaison de haute affinité de la mélatonine. Par ailleurs, GPR50 inhibe la signalisation de MT_1 , ce qui est démontré par une altération de recrutement de la protéine G_i pour l'hétéromère GPR50/ MT_1 entre autres (Levoye et al ; 2006). Les effets délétères de GPR50 sur MT_1 dépendent de la présence du long domaine Cter de GPR50. A cet égard, l'altération de la liaison de la mélatonine au sein du complexe GPR50/ MT_1 peut alors s'expliquer par une gêne stérique exercée de la part de la queue Cter de GPR50 qui perturbe le recrutement de la protéine G_i . Cette hypothèse est plausible du fait que la présence de la protéine G stabilise la liaison du ligand à haute affinité au niveau des récepteurs couplés aux protéines G (Rasmussen, et al ; 2011b). Une seconde hypothèse est que GPR50 induit un changement conformationnel au niveau de la poche de liaison de MT_1 , ce qui est à l'origine de la perte du site de liaison des agonistes mélatoninergiques. En ce qui concerne le présent exemple du dimère mMT_1/mMT_2 , deux hypothèses peuvent expliquer la potentialisation de MT_1 par MT_2 : soit un changement de l'état conformationnel de MT_1 sous la contrainte de sa liaison avec MT_2 et qui par ailleurs détermine le pré-couplage du dimère aux protéines G_i / G_q indépendamment de la présence du ligand ; soit un effet allostérique de MT_2 sur MT_1 facilité par la liaison du ligand, sans pour autant provoquer des changements conformationnels. Aussi, Mcleish *et al.* ont montré récemment que ce dernier mécanisme est possible par le biais de calculs thermodynamiques (McLeish et al ; 2013).

Ces différents éléments suggèrent que l'engagement de MT_1 dans un dimère avec GPR50 ou avec MT_2 requiert un changement conformationnel du récepteur et/ou la stabilisation des mouvements oscillatoires du récepteur proche d'un état donné, ce qui n'est pas sans conséquences fonctionnelles. Les états conformationnels de MT_1 sont différents selon l'hétérodimère. Aussi, pour l'hétérodimère de MT_1 avec MT_2 , une potentialisation de la voie G_q est alors observée et en ce qui concerne le complexe GPR50/ MT_1 , MT_1 peut être non fonctionnel.

4) La spécificité de l'activation de la voie Gq par mMT₁/mMT₂ dans les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont des cellules hautement spécialisées qui, à l'instar des cellules différenciées, affichent un profil protéomique adapté à leurs fonctions. Pour les bâtonnets, 90 % des protéines exprimées sont représentées par la rhodopsine (Hargrave et al ; 1983) et on peut donc penser que cette spécialisation d'expression protéique peut être à l'origine du couplage des hétérodimères de récepteurs de la mélatonine exclusivement à la voie Gq, spécifiquement dans ce type cellulaire, pour médier la photosensibilisation des bâtonnets. Ceci peut être expliqué par une concomitance de synthèse protéique des MTR et des sous-unités de la protéine Gq ainsi que des molécules de la signalisation impliquées dans cette voie, ou au contraire, par une régulation négative des autres molécules de signalisation des autres voies d'activation de la protéine G. La spécificité de la signalisation de MT₁/MT₂ pour Gq peut également être expliquée par une co-disponibilité spatiotemporelle de ces protéines dans les bâtonnets. Cependant, la question de savoir pourquoi le récepteur MT₁ n'active pas la voie Gq quand il est exprimé sans MT₂ dans les photorécepteurs des souris KO-MT₂, sachant qu'un couplage et une signalisation Gq sont possibles dans les cellules en culture, reste une question ouverte.

5) *Schéma général de la signalisation des homo- et des hétéro-dimères de récepteurs de la mélatonine*



En conclusion de cet article, on peut compléter les voies de signalisations des récepteurs de la mélatonine avec la signalisation spécifique des hétérodimères que l'on a observée au niveau de la rétine et dans les cellules HEK293.

ARTICLES 2 & 3

Introduction

Article 2 :

“Protein interactome mining defines melatonin MT₁ receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons”

Abla Benleulmi-Chaachoua, Lina Chen, Kate Sokolina, Victoria Wong, Igor Jurisica, Michel Boris Emerit, Michèle Darmon, Igor Stagljär, Petra Tafelmeyer, Gerald W. Zamponi, Philippe Delagrangé, Pascal Maurice and Ralf Jockers

Article 3 :

“Agonist-independent modulation of dopamine transporter DAT activity by melatonin receptors”

Abla Benleulmi-Chaachoua, Marine Le Boulch, Angeliki Karamitri, Kate Sokolina , Victoria Wong, Igor Stagljär, Philippe Delagrangé, and Ralf Jockers

Introduction:

Les gènes codant pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent environ 2 % du génome humain. Ils sont traduits en quelque 800 récepteurs responsables de la régulation de multiples fonctions physiologiques (Heng et al ; 2013). Par ailleurs, les RCPG à l’instar des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs canaux, interagissent avec diverses protéines qui régulent leur fonctions cellulaires (Husi et al ; 2000).

Plusieurs techniques d’identification des partenaires protéiques ont pu être adaptées aux RCPG. La technique la plus utilisée est le criblage de banques d’ADNc par la méthode du double hybride (Y2H) réalisée chez la levure et qui permet de mettre en évidence des interactions protéine-protéine binaires. Il existe également des techniques protéomiques basées sur la purification des récepteurs (entiers ou seulement de sous-domaines solubles) avec leurs complexes de protéines associées, suivies d’une identification des partenaires par spectrométrie de masse (SM).

En l’absence d’anticorps affins pour les récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂ exprimés chez les rongeurs (rat et la souris), l’identification de la distribution tissulaire et sub-cellulaire, ainsi que la validation des fonctions physiologiques de ces récepteurs s’avèrent compliqués. Notre laboratoire a adopté comme stratégie l’identification de complexes de protéines associées aux récepteurs de la

mélatonine. Il y a quelques années, le laboratoire a mis en œuvre deux techniques protéomiques: la « tandem affinity purification » (TAP), et la chromatographie d'affinité basée sur l'utilisation du domaine Cter des récepteurs de la mélatonine. **La technique TAP** a permis l'identification de plusieurs partenaires interagissant avec les récepteurs entiers de la mélatonine exprimés dans les cellules HEK293. Les récepteurs MT₁ et MT₂ ont été fusionnés du côté Cter avec une étiquette contenant deux modules d'affinités : « calmoduline binding peptide » et « IgG binding domain » séparés par un site de clivage reconnu par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). La purification des protéines de fusion se fait en deux étapes : une première purification à l'aide du module « IgG binding domain » qui se lie à des billes recouvertes d'IgG, suivie d'un clivage protéolytique de l'étiquette afin d'éluer les récepteurs et les partenaires, et une deuxième purification sur billes de recouverte de calmoduline. Cette technique présente l'avantage de pouvoir exprimer le récepteur entier à l'état natif dans les cellules en culture, de le purifier puis d'identifier les partenaires qui le lient. L'avantage par rapport à une immunoprécipitation réside dans le fait de pouvoir s'affranchir de l'utilisation d'anticorps qui génèrent un nombre de peptides considérables pour l'étape SM et peut masquer des peptides minoritaires issus des partenaires d'interactions. De plus, le bruit de fond en terme de liaison non spécifique aux billes est minimisé par le recours à deux purifications successives. Cependant, les limites de cette technique résident dans le fait que les partenaires identifiés dépendent du type cellulaire étudié. De plus, la fusion de l'étiquette TAP du côté Cter masque l'interaction avec certaines protéines solubles, comme des partenaires interagissant via le motif coiled-coil, et les protéines à domaines PDZ qui reconnaît le motif PDZ du MT₁. A cet égard, la fusion de l'étiquette TAP du côté Nter dans cette étude n'avait pas été possible car elle altérerait considérablement l'adressage membranaires des récepteurs de la mélatonine (Daulat et al ; 2007). Par la suite, d'autres modules d'affinité ont été développés pour remédier à ce problème notamment avec la présence de peptide de signal d'adressage à la membrane.

En ce qui concerne l'identification des partenaires qui lient le domaine Cter de MT₁ et de MT₂, l'étude avait été entreprise en 2008 en utilisant l'approche de **chromatographie d'affinité** à partir de lysat de cerveau de souris. Cette stratégie a notamment permis d'identifier plusieurs protéines qui interagissent avec un peptide synthétique « appât » correspondant au domaine Cter de MT₁ ou de MT₂, lié à une étiquette 6*Histidine. 6*His permet d'immobiliser le peptide sur une résine chargée de Nickel. L'approche présente plusieurs avantages: un bruit de fond réduit par rapport à la purification basée sur les protéines de fusion avec la GST produit chez les bactéries ; l'identification de complexes d'interaction très proches d'un contexte physiologique (par exemple, lysats d'organes composés de différents types cellulaires). Cette technique a permis d'identifier 32 protéines qui interagissent avec MT₁ et 14 avec MT₂, en plus de 3 protéines à domaine PDZ PSD95, MUPP1 et eNOS, non identifiées par spectrométrie de masse, mais validée pour les récepteurs MT₁ par SDS-PAGE et western-blot (Maurice et al 2008).

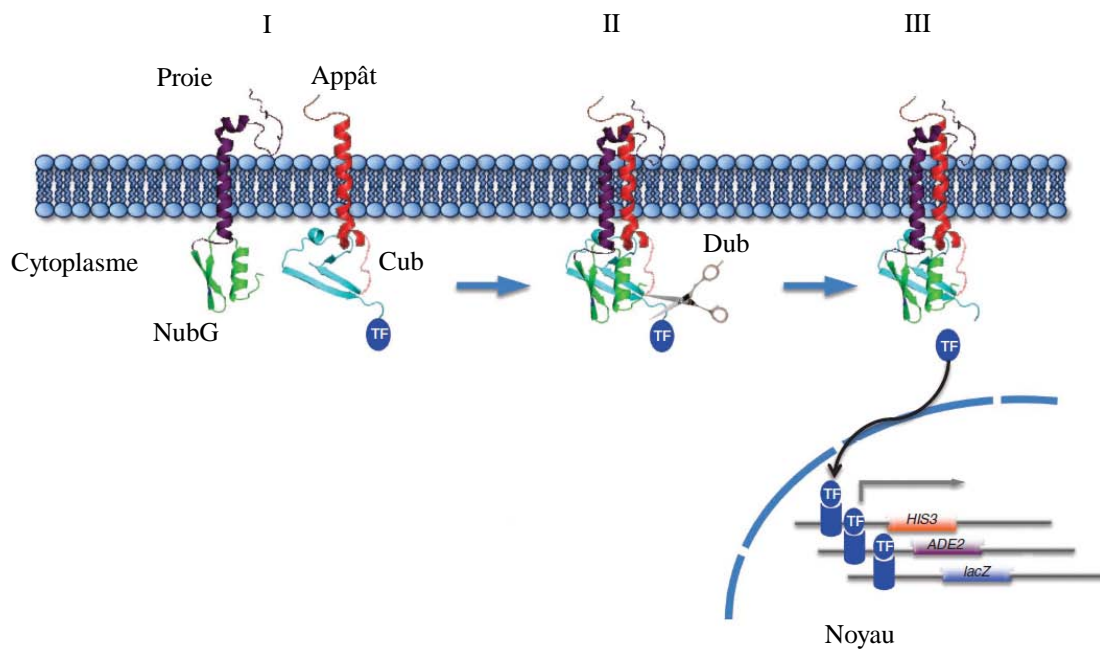


Figure 20 : Principe général de la technique MYTH appliquée aux protéines transmembranaires. (I) Expression membranaire de l'appât (protéine d'intérêt) et de la proie à la membrane plasmique de la levure, chaque partenaire est fusionné à une moitié d'ubiquitine. (II) l'interaction des deux protéines permet le recrutement de l'enzyme Dub afin de cliver l'ubiquitine et libérer le facteur de transcription. (III) la translocation nucléaire du facteur de transcription active les gènes rapporteurs.

Par ailleurs, cette stratégie est limitée à l'utilisation de régions solubles du récepteur et la chromatographie d'affinité a notamment permis d'identifier la protéine RGS20 comme partenaire spécifique de MT₁, ce qui a fait l'objet d'une étude fonctionnelle par la suite (Maurice et al ; 2010).

En 2010, le laboratoire avait cherché à élargir la liste des partenaires des récepteurs de la mélatonine par l'utilisation de techniques complémentaires : le double hybride Y2H et sa variante MYTH (Membrane Proteins Yeast-Two-Hybrid). Afin de compléter la liste des partenaires identifiés en 2004, le laboratoire a passé un contrat avec la société Hybrigenics spécialisée dans le H2H. Concernant l'application de la technique MYTH, le laboratoire a choisi de collaborer avec l'équipe du Dr Igor Stagiar de l'université de Toronto à Canada qui est le premier laboratoire à avoir adapté la méthode aux RCPG. L'équipe du Dr Igor Stagiar s'est notamment engagée dans un travail d'identification systématique des interactants de 50 RCPG présentant une importance physiologique et pathophysiologique. Cette étude s'est faite dans le cadre d'une collaboration internationale dont nous faisons partie (Voir l'article en annexe).

L'utilisation des techniques génétiques est complémentaire aux techniques protéomiques : tandis que l'identification des partenaires co-purifiés par SM privilégie les partenaires les plus abondants ou ceux générant le plus grand nombre de peptides et qui font partie d'un complexe fonctionnel autour du récepteur, les cribles chez la levure permettent d'identifier les interactions protéine-protéine indépendamment de l'expression relative des partenaires.

A cet égard, **Le Y2H** est basé sur la co-expression de fragments solubles du récepteur d'intérêt avec une banque d'DNAC de choix, l'appât et la proie sont fusionnées chacune à une moitié de facteur de transcription qui se complémente suite à l'interaction des deux protéines dans le cytoplasme. Cette complémentation induit la translocation du complexe vers le noyau où le facteur de transcription active l'expression de gènes rapporteurs. **Le MYTH** est une variante du Y2H récemment adaptée aux RCPG, elle permet l'expression du récepteur entier comme appât à la surface de la levure. Le MYTH est basé sur une complémentation fonctionnelle de deux moitiés de l'ubiquitine : une moitié Nter Nub (Nubiquitine) et Cter Cub. Le récepteur d'intérêt est fusionné au Cub et à un facteur de transcription artificiel, tandis qu'un variant du domaine Nter appelé NubG est fusionné à la proie (NubG est plus spécifique au Cub par rapport à Nub sauvage et permet de réduire considérablement la génération de résultats faux positifs). Si la protéine d'intérêt interagit avec une protéine proie soluble ou membranaire, l'ubiquitine est complétement puis aussitôt reconnue par l'enzyme Dub qui catalyse la désubiquitinylation. Dub libère le facteur de transcription qui se transloque seul dans le noyau et active l'expression de gènes rapporteurs (Figure 20).

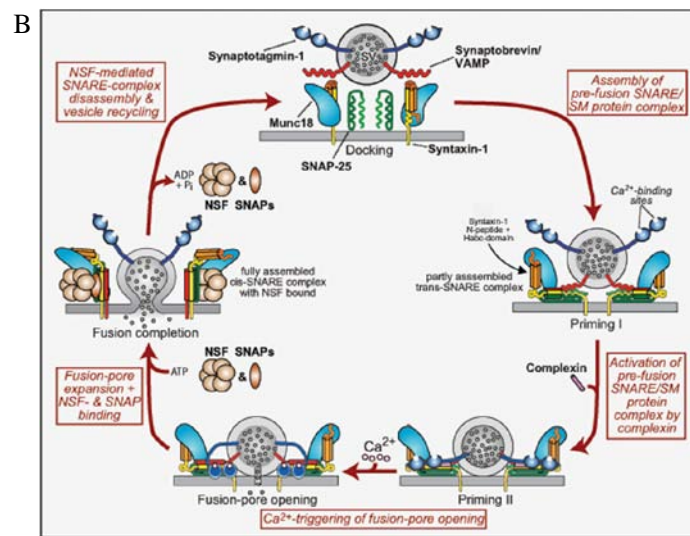
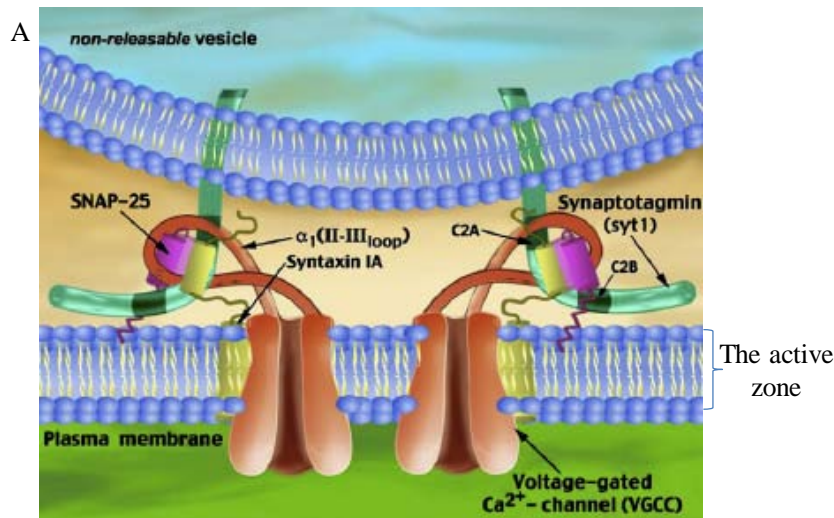


Figure 21 : Organisation moléculaire des protéines $Ca_v2.2$, SNAP25 et Munc-18 au niveau de la zone active. A) Interaction directe entre le canal calcique, SNAP25 et synaptotagmine du complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Protein REceptor). B) Cycle d'assemblage et de désassemblage des protéines du complexe SNARE en fonction de la concentration du calcium au niveau de la zone active : les protéines SNARE au niveau de la vésicule du neurotransmetteur (vesicular vSNARE : synaptotagmine et synaptobrevine) sont pré-assemblées avec les protéines SNARE de la membrane présynaptique (target tSNARE : SNAP25 et syntaxine maintenues reliées par Munc-18). L'arrivée du potentiel d'action au niveau présynaptique entraîne l'activation du canal calcique présynaptique dépendant du voltage qui laisse passer un flux calcique entrant. L'augmentation de la concentration de calcium active le senseur calcique synaptotagmine qui se lie à la fois aux phospholipides membranaire et au reste des protéines du complexe SNARE, et déplace la complexine qui empêchait jusque-là la fusion complète du complexe SNARE. L'activation par le calcium entraîne un changement conformationnel de l'ensemble des partenaires et aboutit à la fusion membranaire et à la libération du neurotransmetteur. Le complexe SNARE est ensuite désassemblé par l'ATPase NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor) et les vésicules synaptiques seront recyclées. Adapté de (Jahn et al ; 2012) (Südhof et al ; 2013).

En outre, le MYTH s'est avérée une technique de choix pour l'identification de partenaires directs de plusieurs types protéines membranaires (récepteurs enzyme, canaux ioniques etc.) (Paumi et al ; 2007) (Deribe et al ; 2009) (Snider et al ; 2010).

L'utilisation de techniques différentes pour l'identification des partenaires d'interaction d'un seul RCPG est peu courante. Chaque approche comble à une certaine mesure les désavantages d'une autre, ce qui permet d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction des récepteurs de la mélatonine : directes ou indirectes, cytosoliques ou membranaires, isolés ou appartenant à un complexe physiologiquement relevant.

Dans ce contexte de génération de données à grande échelle, mon travail a été de répertorier toutes les interactions, d'effectuer le tri des partenaires spécifiques et non spécifiques relatifs à chaque technique puis, en collaboration avec l'équipe d'informaticiens du Dr Igor Stagliar de l'université de Toronto à Canada, nous avons finalement réuni tous les candidats sélectionnés pour MT₁ et MT₂ au sein d'un réseau d'interaction comptant au total 376 partenaires protéiques.

Au-delà de l'aspect technique de la quête des partenaires d'interaction, le but ultime est bien entendu de pouvoir analyser les données avec une vision d'ensemble, valider les candidats intéressants d'un point de vue physiologique et caractériser l'interaction de certains partenaires avec les récepteurs d'intérêt pour ainsi espérer l'identification des fonctions nouvelles des récepteurs mélatoninergiques.

En effet, trois techniques différentes (la chromatographie d'affinité à partir de lysat de cerveau de souris, le double hybride et le MYTH) nous ont permis d'identifier plusieurs partenaires synaptiques pour le récepteurs MT₁ : le canal calcique dépendant du voltage Ca_v2.2, la Synapsine II, SNAP25, Munc-18, Snapin, le transporteur de la dopamine DAT, rab3, kinésine et MAP2 entre autres.

Ca_v2.2, SNAP25 et Munc-18 sont directement impliquée dans les dernières étapes de relargage des neurotransmetteurs à partir du compartiment présynaptique (Figure 21).

De son côté, les isoformes de la synapsine I, II et III sont des régulateurs pré-synaptiques clés de l'organisation des vésicules synaptique (VS), de la plasticité neuronale et de la neurogenèse (Cesca et al ; 2010). Il existe trois pools de VS: le pool de réserve maintenu piégé au sein d'un réseau loin de la zone active, le pool prêt à subir une exocytose qui est relié au complexe SNARE et Ca_v2.2, et le pool de vésicules recyclées. Ces trois contingents vésiculaires sont finement régulés par la synapsine qui est-elle même modulée par des cycles de phosphorylations/déshosphorylations. Brièvement, les synapsine présente plusieurs site de phosphorylations dont la serine9 (Figure 22) .

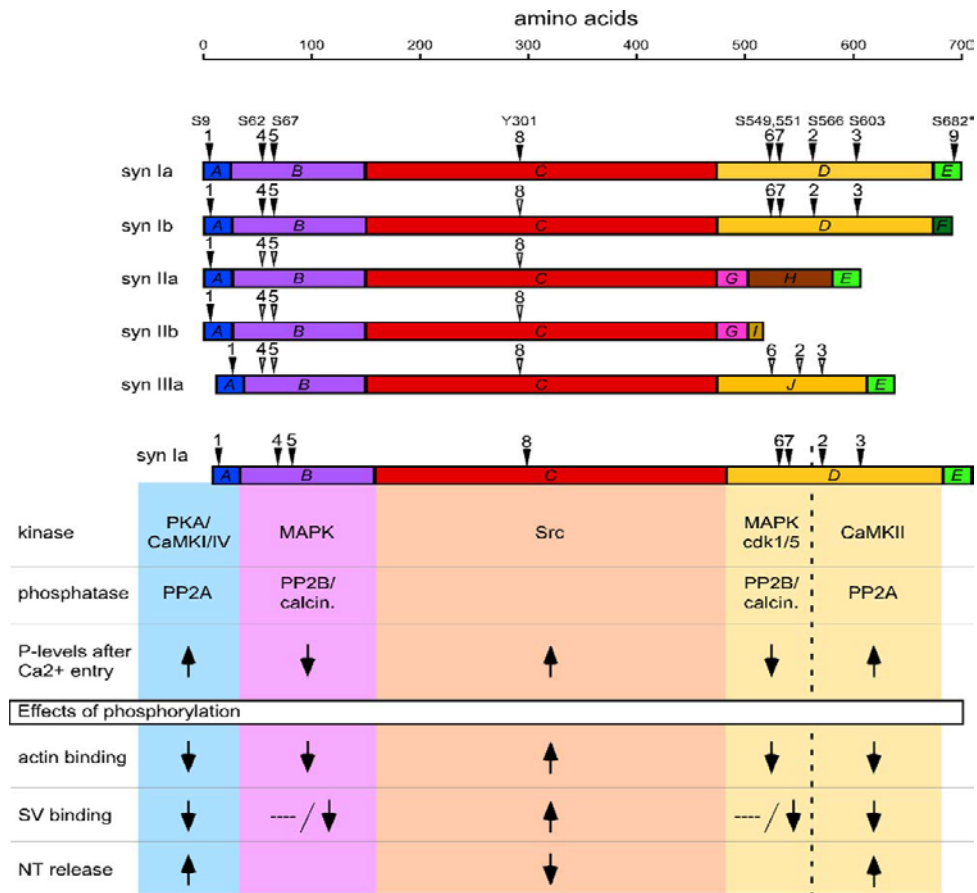


Figure 22: Les différents isoformes de la synapsine I et II. Schéma représentant les sites de phosphorylation au niveau des différents isoformes, les kinases et les phosphatases impliquées ainsi que les conséquences de ces modifications au niveau de la régulation des vésicules synaptiques (SV) (Cesca et al ; 2010).

Aussi, les synapsines non phosphorylées sur ce site se localisent au niveau de la VS et sont reliées au filament d'actine pour préserver le pool de réserve d'un relargage spontané, tandis qu'une phosphorylation de la ser9 décroche la P-synapsine des VS et ces dernières se libèrent des filaments d'actine pour aller rejoindre la membrane pré-synaptique par diffusion afin de remplacer les vésicules relargées (Shupliakov et al ; 2011) (Benfenati et al ; 1992) (Hosaka et al ; 1999) (Fornasiero et al ; 2012) (Bykhovskaia et al; 2011).

En ce qui concerne le transporteur DAT, c'est une protéine qui appartient à la famille des co-transporteurs SLC6 à 12 domaines transmembranaires. Le transporteur DAT est exprimé dans les neurones dopaminergiques et est responsable de la re-capture de la dopamine extracellulaire. Il se lie directement aux vésicules synaptiques dopaminergiques ce qui permet de rediriger les molécules de dopamine entrantes directement dans les vésicules exprimant VMAT2 (Vesicular Monoamine Transporter 2) (Egaña et al ; 2009). De manière intéressante, DAT est l'unique protéine responsable de la déplétion de la dopamine au niveau nigrostriatal (Hersch et al; 1997), c'est également une cible privilégiée des drogues addictives telles que la cocaïne, l'amphétamine et la méthamphétamine. Le mécanisme d'action de ces substances est varié (et peu connu) mais en général, cela se traduit par un effet inhibiteur des fonctions de DAT entraînant la sur-stimulation des circuits dopaminergiques post-synaptiques avec des conséquences sur le système de récompense et de motivation et apporte une sensation de satisfaction recherchée par les consommateurs de drogues dures (Howell et al ; 2008). Enfin, le fonctionnement de DAT reflète directement l'état de l'homéostasie dopaminergique dans le cerveau (et il est même très rare qu'une seule protéine puissent représenter un circuit neuronal complexe). A cet égard, plusieurs études ont rapporté des dérégulations touchant DAT dans plusieurs maladies neurodégénératives, psychiatriques et dans des maladies liées à l'âge ; ce qui démontre l'importance de DAT sur le plan patho-physiologique (Fusar-Poli et al ; 2013) (Pinsonneault et al ; 2011) (Ishibashi et al ; 2014).

Dans les articles 2 et 3, nous avons caractérisé l'interaction des récepteurs de la mélatonine avec $Ca_v2.2$, synapsine, SNAP25 et Munc18 (premier article), et avec DAT (second article). Ces travaux montrent comment, à partir d'une liste de partenaires d'interaction, Nous avons été en mesure de formuler de nouvelles hypothèses de travail par rapport à de potentielles fonctions de la protéine d'intérêt et comment engager une validation fonctionnelle de ces hypothèses. Mes deux articles apportent notamment des nouveaux éléments par rapport au rôle modulateur de la mélatonine au niveau des neurones. De telles fonctions ont déjà été soupçonnées il y a plus de 30 années mais n'ont jamais été approfondies.

Article 2

Protein interactome mining defines melatonin MT₁ receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons

Abla Benleulmi-Chaachoua ^{1,2,3}, Lina Chen ⁴, Kate Sokolina ⁵, Victoria Wong ⁵, Igor Jurisica ⁶, Michel Boris Emerit ^{3,7}, Michèle Darmon ^{3,7}, Igor Stagljar ⁵, Petra Tafelmeyer ⁸, Gerald W. Zamponi ⁴, Philippe Delagrangé ⁹, Pascal Maurice ^{1,2,3,10} and Ralf Jockers ^{1,2,3,#}

¹ Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

² CNRS UMR 8104, Paris, France

³ Univ. Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁴ Department of Physiology and Pharmacology, Hotchkiss brain Institute, University of Calgary, Canada

⁵ Donnelly Centre, Department of Biochemistry, Department of Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Toronto, 160 College Street, University of Toronto, ON, Canada, M5S 3E1

⁶ Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network and TECHNA Institute for the Advancement of Technology for Health, TMDT, Room 11–314, 101 College Street, Toronto, ON M5G 1L7, Canada

⁷ INSERM U894 Centre de Psychiatrie et Neurosciences, 2 ter d'Alesia, 75014 Paris

⁸ Hybrigenics Services, Paris, France

⁹ IDR SERVIER, Croissy/Seine, France

¹⁰ Present address: CNRS UMR 7369, Matrice extracellulaire et dynamique cellulaire (MEDyC), Reims, France; Université de Reims Champagne Ardenne, laboratoire "Signalisation et récepteurs matriciels (SiRMa)", UFR Sciences Exactes et Naturelles, Reims, France.

Running title: Presynaptic melatonin MT₁ receptors

Keywords: melatonin/ synapse/ melatonin receptor/ G protein-coupled receptor

Correspondence should be addressed to: Dr. Ralf Jockers, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris. Phone: +331 40 51 64 34; Fax: +331 40 51 64 30; e-mail: ralf.jockers@inserm.fr

ABSTRACT

The hormone melatonin is secreted during the night by the pineal gland and acts on various tissues mainly through melatonin MT₁ and MT₂ receptors, belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) super-family. Melatonin has been reported to be involved in many functions of the central nervous system such as circadian rhythm regulation, neurotransmission, synaptic plasticity, memory, sleep and also in Alzheimer's disease and depression. However, little is known about the subcellular localization of melatonin receptors and the molecular aspects involved in neuronal functions of melatonin. Identification of protein complexes associated with GPCRs has been shown to be a valid approach to improve our understanding of their function. By combining proteomic and genomic approaches we built an interactome of MT₁ and MT₂ receptors, which is composed of 378 individual proteins. Among the proteins interacting with MT₁, but not with MT₂, we identified several presynaptic proteins suggesting a potential role of MT₁ in neurotransmission. Presynaptic localization of MT₁ receptors in the hypothalamus, striatum and cortex was confirmed by subcellular fractionation experiments and immunofluorescence microscopy. MT₁ physically interacts with the voltage-gated calcium channel Ca_v2.2 and inhibits Ca_v2.2-promoted Ca²⁺ entry in an agonist-independent manner. In conclusion, we show here that MT₁ is part of the presynaptic protein network and negatively regulates Ca_v2.2 activity providing a first putative explanation for the previously reported inhibitory effect of melatonin on neurotransmitter release.

Introduction

Melatonin is a neurohormone released by the pineal gland in a circadian manner with peak levels during the night. Due to its lipophilic property, melatonin rapidly distributes all over the brain and in peripheral tissues, to regulate various neuronal, retinal, immunological and metabolic functions (1,2). Most effects of melatonin are relayed by melatonin MT₁ and MT₂ receptors. These

receptors belong to the super-family of G protein-coupled receptors (GPCRs) and are preferentially coupled to G $\alpha_{i/o}$ proteins (3). Additional effects of melatonin appear to rely on its antioxidant properties and on binding to the enzyme quinone reductase 2 (QR2) (3).

Alterations in melatonin and its associated receptors have been linked to diabetes (4), sleep and circadian dysfunctions (5), retinal diseases (6), depression (7,8), autism spectrum disorders (9), and to several neurodegenerative diseases like Alzheimer and Huntington disease (10,11). Several drugs targeting melatonin receptors are currently on the market. Circadin, a prolonged-release formulation of melatonin (12) and Ramelteon, a synthetic melatonin receptor agonist, are prescribed for circadian rhythm and sleep disorders (13). Agomelatine, a mixed melatonin receptor agonist/ serotonin receptor 5-HT_{2C} antagonist is prescribed for depression (14).

Multiple effects of melatonin have been reported in the central nervous system (CNS). Melatonin through activation of MT₁ receptors acutely inhibits neuronal firing in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) (15) and phase-shifts circadian rhythms in the SCN through MT₁ and MT₂ receptors (1). Several studies report an influence of melatonin on neurotransmitter release, in particular of dopamine. Indeed, melatonin inhibits calcium-dependent dopamine release evoked by electrical field stimulation in slices of several brain regions (16) and in the retina (17). EC₅₀ values in the low nanomolar range indicate the involvement of melatonin receptors. More recently, administration of agomelatine in rats indicated a role of the melatonergic component of agomelatine in dopamine and serotonin neurotransmission further strengthening a possible link between melatonin receptor activation and neurotransmission (18,19). Moreover, melatonin was shown to inhibit hippocampal long-term potentiation (20), suggesting its involvement in synaptic plasticity and in memory processes (21,22). It promotes hippocampal cell survival (23), facilitates methamphetamine-induced locomotor sensitization in C57BL/6 mice (24), development of cocaine sensitization (25) and

regulates sleep/wake cycles in a melatonin receptor-dependent manner (26).

Compatible with the multiple functions of melatonin in the brain, melatonin receptors have been shown to be widely expressed in the CNS with highest expression in the SCN and lower expression in other brain structures like the parietal cortex, hippocampus, thalamus, striatum, pons-medulla, area postrema and cerebellum (27). However, the target of melatonin was not always clearly defined. In some cases a direct effect on ion channels was postulated (28) or the free-radical scavenger and antioxidant properties of melatonin itself were suggested to be directly responsible for the observed effects (29). Even in cases where melatonin receptors were shown to be involved, a comprehensive picture of their *in vivo* role is still missing as little is known about the precise cellular localization of these receptors in the CNS. Defining the interactome of proteins of interest has been shown to be a powerful approach to better understand known functions and to discover previously unknown functions of GPCRs (30,31) as illustrated by recent studies on the interactome of serotonin 5-HT_{2C} receptors (32), 5-HT₆ receptors (33) and metabotropic glutamatergic mGluR4 receptors (34).

The use of several complementary proteomic and genetic approaches allowed us to build the first MT₁ and MT₂ receptor interactome which includes well-known pre-synaptic proteins such as the voltage-gated calcium channel Ca_v2.2, SNAP25, Munc-18 and synapsin. We show for the first time that MT₁ is present at the presynaptic membrane together with major components of the active zone. In addition, we show that MT₁ inhibits Ca_v2.2 channel activity providing a potential explanation for the previously described Ca²⁺-dependent inhibitory effect of melatonin on neurotransmitter release.

RESULTS

Building of the MT₁ and MT₂ receptor interactome - To discover novel functions of human MT₁ and MT₂ receptors, we decided to build their interactomes. A combination of proteomic (peptide affinity chromatography, tandem-affinity purification) and genomic approaches (yeast two-hybrid (Y2H), modified membrane yeast two-hybrid

(MYTH)) was employed to identify a large range of interacting proteins. The genomic screens were performed against cDNA libraries from fetal brain, hippocampus and brown adipocytes and proteomic approaches were performed in HEK293 cells and with brain lysates. All biological sources are known to express endogenous melatonin receptors. In total, 10 different screens, two proteomic and 8 genomic screens, were performed for each receptor (Supplementary Table 1). Only highly confident protein-protein interactions (PPI) were considered for interactome building according to the stringency criteria described in “Experimental procedures” for each technique. Using this strategy, 219 and 220 PPIs were identified for MT₁ and MT₂ receptors, respectively (Figure 1A, Supplementary Table 1). The presence of previously characterized functionally relevant interactors such as G α and G β subunits for both receptors and MUPP1 (35) for MT₁ receptors support the quality of the PPIs of our interactome.

Integrative analysis of the interactome shows that the majority of PPIs are unique for each approach. This can be explained by the use of different tissues and by the characteristics of each technique (36). MT₁ and MT₂ share 63 interacting partners, which is consistent with reported overlapping functions of both receptors. 156 and 157 PPIs were unique for MT₁ and MT₂ receptors, respectively, illustrating different physiological functions of both receptors (Figure 1A). Classification of PPIs based on physiological functions shows that their distribution is similar for MT₁ and MT₂ receptors, with most of the proteins attributed to “Cellular fate and organization” representing approximately 40% of all PPIs (Figure 1B). The fraction of shared interacting partners was stable among all the technical approaches (around 20 to 30 %) (Figure 1C). Taken together, these results highlight the efficiency of our strategy and demonstrate that proteomic and genomic approaches complement each other when defining GPCR interactomes.

Interactome mining identifies several synaptic proteins as interacting partners of MT₁ receptor - The melatonin receptor interactome revealed several proteins of the

presynaptic compartment such as synapsins, SNAP25, Munc-18 and the voltage-gated calcium channel $Ca_v2.2$ that were identified in MT_1 receptor screens (Figure 1). None of these proteins were identified in MT_2 receptor screens. All synaptic proteins were identified with techniques using the carboxyl terminal tail (Cter) of MT_1 as bait (Y2H, peptide affinity chromatography). To validate these interactions, mouse brain lysates were prepared and interactors pulled-down with either the His₆-tagged MT_1 Cter peptide or equimolar amounts of deletion fragments of it (Figure 2A-C). Synapsin I, IIa (upper band) and IIb (lower band), SNAP25, Munc-18 and $Ca_v2.2$ were pulled down with the MT_1 Cter confirming the screening results. All proteins preferentially bind to the helix 8 (H8) at the very N-terminal part of the MT_1 Cter similar to $G_{i\alpha}$ and RGS20 as previously reported (37). Munc-18 and $Ca_v2.2$ were also retained by the MT_2 Cter, although to a lesser extent.

Phosphorylation of synapsin I and II at Ser⁹ is of functional importance as it permits delivery of neurotransmitter vesicles from the cytoskeleton in order to be docked on the presynaptic membrane (38). The presence of phosphorylated synapsin I and II isoforms was confirmed in pull-downs of MT_1 Cter and H8 columns after 1D gel electrophoreses and western blotting with anti-(P)SynI & II antibodies (Figure 2D). Separation of pull-downs of the H8 peptide column by 2D gel electrophoreses further confirmed the presence of several phosphorylated and unphosphorylated synapsin isoforms (Figure 2E).

Rhythmicity of exocytosis events as well as synaptic vesicle recycling represent an important means for cross-synchronization between neurons and circadian control of synapsin II expression is one of the contributing molecular mechanisms (39). To evaluate whether circadian cycling of synapsin II impacts on the quantity of synapsin II interacting with the MT_1 receptor, we performed iTRAQ-coupled pull-down experiments with the MT_1 Cter and mouse brain lysates recovered during the night (1 AM) and the day (1 PM). Twice as much synapsin II was retained during the day consistent with the reported upregulation of certain synapsin II isoforms during the day

(39) and with an enhanced exocytic activity in the brain during daytime (Supplementary Table 2).

We then carried out co-immunoprecipitation (co-IP) experiments to recapitulate the interactions between MT_1 receptors and the identified interaction partners upon expression of the recombinant proteins in HEK293 cells. These experiments confirmed the interaction between the MT_1 receptor and the $Ca_v2.2$ channel but not with SNAP25, Munc-18 and synapsins (Figure 2F, Supplementary Figure 1). These data suggest that the interactions with synaptic proteins such as SNAP25 in the brain may occur indirectly via another protein that is not present endogenously in heterologous expression systems. Indeed, the $Ca_v2.2$ channel is known to interact with both SNAP25 and Munc-18, suggesting the possibility that these proteins may link to the MT_1 receptor via the $Ca_v2.2$ channel.

Presence of melatonin receptors in presynaptic membranes of different brain regions - The interaction of MT_1 with presynaptic proteins suggests localization of the receptor in the presynaptic compartment. To further validate this hypothesis, we isolated synaptosomes from several rat brain regions followed by the separation of the different synaptosomal components according to previously described protocols (40) (Figure 3A). In the absence of any validated antibodies directed against rodent melatonin receptors, we used the melatonin receptor-specific radioligand 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (¹²⁵I-MLT) to reveal the presence of these receptors in the different fractions. Specific binding sites were consistently observed in the presynaptic membrane fraction (LP1) but not in the synaptosomal (LS1) and crude synaptic vesicle pellet (LP2) fractions. Highest levels of receptors were observed in presynaptic membranes of the hypothalamus followed by the striatum and the cortex with expression levels ranging from 1.8 to 0.4 fmol/mg of protein (Figure 3B). Similar results were obtained in murine hypothalamic presynaptic membranes but not in presynaptic membranes prepared from $MT_1^{-/-}/MT_2^{-/-}$ receptor double knockout mice confirming the specificity of the ¹²⁵I-MLT labeling (Figure 3C).

To provide further *in vivo* evidence for the close proximity of melatonin receptors with presynaptic proteins, we precipitated ¹²⁵I-MLT-labeled receptors from presynaptic membrane lysates with a cocktail of antibodies directed against Ca_v2.2, SNAP25 and synapsin I and II. The amount of precipitated ¹²⁵I-MLT was significantly (3 times) higher than that of the control condition with the heat-inactivated antibody mix. Similar quantities of ¹²⁵I-MLT were precipitated with active and heat-inactivated antibodies from presynaptic membranes prepared from MT₁^{-/-}/MT₂^{-/-} receptor double knockout mice thus defining the background labeling of the assay and further confirming the specificity of the precipitation in wild-type mice (Figure 3D).

To further evaluate the presynaptic localization of melatonin receptors, we expressed recombinant MT₁ and MT₂ receptors in primary hippocampal neurons. This cellular paradigm has been shown to allow the quantification of polarized expression of receptors in neurons (41,42). Co-transfection with DsRed or SNAP25-HA at 5-7 DIV allowed the visualization of all the neuronal neuritic compartments, i.e. the dendritic trees plus the axons. Extensive co-localisation between MT₁ and DsRed or SNAP25-HA in the axons was corroborating the presynaptic localization of this receptor (Figure 3E). In contrast, MT₂ receptors exhibited an essentially somato-dendritic localization without any labeling of the axonal compartment consistent with the absence of proximity between MT₂ and presynaptic proteins (Figure 3F).

MT₁ receptors tonically inhibit Ca_v2.2 channel activity - To explore the functional consequences of the interaction of MT₁ with Ca_v2.2, we performed patch-clamp experiments in CHO cells that stably express the MT₁ receptor, and which were transfected with a combination of Cav2.2, Cavβδ and Cava2δ-1 (Figure 4A,B). Interestingly, MT₁ receptors tonically inhibited Ca²⁺ current entry independently of receptor activation, as seen as an increase in whole cell current amplitude following a strong depolarizing voltage prepulse (PP). This prepulse is designed to remove tonic Gβγ inhibition of the channel. Application of the MT₁ receptor agonist iodometatonin mediated a significant

additional inhibition of whole cell current amplitude that was completely reversed by the prepulse, indicating that it too was mediated by

Gβγ rather than a voltage-independent pathway. Consistent with such a mechanism, the extent of prepulse relief was greater after exposure to iodometatonin (Figure 4B). These findings parallel our previous observations with members of the opioid receptor family (43,44) and are consistent with a mechanism where tonic receptor activity is sensed effectively by Ca_v2.2 channels due to their physical association with the receptor.

DISCUSSION

We report here the first integrative interactome of MT₁ and MT₂ receptors based on a combination of two proteomic and two genetic screening approaches using receptor sub-domains and entire receptors as baits. In total, 219 and 220 PPIs were identified for MT₁ and MT₂ receptors, respectively. Network analysis revealed the presence of several presynaptic proteins exclusively in the MT₁ interactome. This prompted us to confirm the presence of MT₁ receptors in presynaptic membranes and to establish that MT₁ is indeed part of the presynaptic protein network in the hypothalamus, striatum and cortex. Moreover, we show that MT₁ receptors physically and functionally interact with the presynaptic voltage-gated Ca_v2.2 channel inhibiting Ca²⁺ entry in a Gβγ-dependent manner. This provides a molecular basis and a first putative explanation for the previously reported inhibitory effect of melatonin on neurotransmitter release.

Establishment of interactomes of multi-pass transmembrane receptors has been proven to be notoriously difficult due to several technical limitations such as the need of detergent extraction when using entire receptors at the expense of destabilizing associated proteins or the risk to miss interacting partners recognizing complex receptor binding sites that cannot be recapitulated by receptor sub-domain baits. To overcome these limitations, we employed here a combination of four complementary proteomic and genetic approaches based on entire MT₁ and MT₂ receptors or receptor sub-domains. The interactome is composed of 378

individual proteins evenly distributed between MT₁ and MT₂ receptor interacting partners with an overall similar distribution of Gene Ontology functions. Out of the 376 identified interacting partners, 63 were identical between MT₁ and MT₂ receptors. Most of these common interactors belong to the family of small G proteins (Rab and Rho GTPases), heterotrimeric G proteins, molecular chaperones (calnexin and calreticulin), cytoskeleton components (filamin, myosin etc) and ubiquitin ligases. The existence of common interactors is consistent with the known similarities of MT₁ and MT₂ receptors in cellular trafficking and signaling functions (1).

MT₁ and MT₂ receptors are known to undergo agonist-dependent and -independent internalization (35,45). Our Y2H results indicate that MT₁ receptors have an intrinsic affinity for caveolin (P51636) and dynamin 1 (P39053) and MT₂ receptors for AP2 (P62944) and AP4 (Q9UPM8) adaptor proteins most likely participating in agonist-independent internalization complementing other proteins such as GPCRs kinases (GRKs) and β -arrestins shown to be involved in agonist-dependent melatonin receptor internalization (37,46,47). Interesting differences between the PPIs of the MT₁ and MT₂ receptor interactomes include the presence of several ion transporters/channels like the electroneutral potassium-chloride cotransporter 1 (SLC12A4), the Zinc transporters (SLC30A1) and (SLC39A6), and the electroneutral Na/HCO₃ cotransporter (SLC4A7) in the MT₂ receptor interactome and the presence of several synaptic proteins in the MT₁ receptor interactome.

We then focused our attention on those proteins specifically interacting with the MT₁ receptor and located in the synapse such as synapsin, SNAP25, Ca_v2.2 channel and Munc-18. The absence of these proteins from the MT₂ receptor interactome suggested differences in the sub-cellular localization of MT₁ and MT₂ receptors in neurons. This prediction was confirmed in immunofluorescence studies showing that MT₁, but not MT₂ receptors, are expressed in axons of primary cultures of hippocampal neurons. This differential localization might be explained by the recruitment of specific axonal

transport proteins. An interesting candidate in this respect is kinesin, which specifically interacts with the MT₁ Cter and targets membrane proteins to axons (48). Differences in constitutive activity of GPCRs have been proposed as an alternative explanation to explain axonal targeting (49). MT₁ receptors have indeed been shown to exhibit higher constitutive activity than MT₂ receptors, providing another possible explanation for the differential localization (50,51). This constitutive activity is also consistent with our electrophysiology data on expressed Ca_v2.2 channels.

To further characterize the localization of melatonin receptors in the synapse, we performed subcellular fractionation experiments and showed that ¹²⁵I-MLT labeling is clearly observed in the presynaptic membrane fraction but not in synaptic vesicle fractions. Highest expression levels were consistently obtained in both rat and mouse hypothalamus and striatum and low levels in the cortex. Absence of specific ¹²⁵I-MLT binding in presynaptic membranes prepared from MT₁^{-/-}/MT₂^{-/-} double knockout mice confirmed the specificity of the labeling. Precipitation of ¹²⁵I-MLT-labeled receptors with antibodies raised against synapsin, SNAP25 and Ca_v2.2 channels from presynaptic membrane lysates indicated the close proximity of melatonin receptors to the presynaptic protein network. Additional synaptic proteins exclusively identified in the MT₁ receptor interactome but not further validated in this study are rabphilin (Q768S4 & B7FAU1), which regulates synaptic vesicles exocytosis (52), kinesin (Q61768), a major anterograde transporter toward the axon at the presynaptic side (53) and SNAP47 (Q8R570) a novel SNARE component abundantly expressed in the brain (54). Based in these results and PPIs from the protein-protein interaction data I2D, we built the synaptic PPI network of MT₁ receptors (Figure 5).

In vitro experiments in CHO cells expressing Ca_v2.2 channels showed that the presence of MT₁ receptors tonically inhibits the Ca_v2.2-promoted calcium current by >50% as evident from a greater than 2.3 fold increase in current after a depolarizing prepulse. Stimulation of cells with a saturating concentration of iodomelatonin (1 μ M) produced a 29 \pm 5%

inhibition in whole cell current amplitude ($n=11$, $p=0.015$, paired t-test) and increased the prepulse effect (to 2.8-fold, $p=0.035$, paired t-test). These data indicate that not the entire population of $Ca_v2.2$ channels was under tonic receptor control, allowing for whole cell currents to be modulated further by receptor agonist. Altogether, these data show that MT_1 receptors exhibit an agonist-independent modulation of $Ca_v2.2$ channel activity that is mediated by tonic interactions with $G_{\beta\gamma}$ subunits. Indeed, voltage-dependent inhibition involving direct binding of G protein $\beta\gamma$ subunit to the channel (55) is the most widespread mechanism by which GPCRs regulate voltage-gated calcium channels. This inhibition has been shown to be enhanced in some cases of direct interaction of $Ca_v2.2$ channels with GPCRs as demonstrated for the nociceptin (43) and dopamine D1 and D2 receptors (56,57). These receptor/channel associations were shown to enhance channel export to the plasma membrane and to promote agonist-induced co-internalization thus regulating the density of $Ca_v2.2$ channels at the cell surface. We do not yet know whether MT_1 receptors can mediate a similar trafficking effect

Previous proteomic screens showed that $Ca_v2.2$ channels are part of a complex presynaptic protein network composed of at least 200 individual proteins (58,59). Some GPCRs were highly enriched ($GABA_{B1}$ and $mGluR5$ receptors) or enriched ($GABA_{B2}$, $mGluR1,2,4$ and $GPR158$ receptors) in immunoprecipitates. Despite the fact that dopamine D1 receptors (56) and MT_1 receptors (this study) are presynaptic receptors that are known to directly interact with $Ca_v2.2$ channels, they were not identified in these screens, underlining the known difficulty to identify GPCRs in proteomic approaches (36). Of note, all identified receptors are class C GPCRs containing a large extracellular domain that might have facilitated peptide generation required for mass spectroscopic analysis. The presence of synapsins and SNAP25 in both the $Ca_v2.2$ channel and the MT_1 receptor interactome suggests that these proteins are part of a large network and do not necessarily directly interact with the MT_1 receptor (see Figure 5 for the synaptic MT_1 receptor interactome), an interpretation that is also

consistent with our failure to co-immunoprecipitate MT_1 receptors with these proteins in transfected HEK293 cells.

Localization of MT_1 receptors in the presynaptic membrane suggests its implication in synaptic functions such as neurotransmission. Early reports back in the 1970th suggested indeed a possible influence of melatonin on neurotransmitter release and uptake in synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus (60). This observation was later extended in a series of studies showing that physiological (subnanomolar) concentrations of melatonin decrease the amount of dopamine release in hypothalamic slices during electric stimulation (61). The effect of melatonin was observed only in some brain regions like the ventral hippocampus, medulla pons, preoptic area and median and posterior hypothalamus but not in others (16). This excludes a direct effect of melatonin on one of the components of the presynaptic neurotransmitter release machinery. Interestingly, this effect was accompanied by the suppression of calcium influx into stimulated nerve endings (62). A similar inhibitory effect of melatonin on calcium influx was observed in the rat striatum (63). Our study clearly warrants further investigations of the effect of melatonin on dopamine release in the brain. Based on previous and present results the following working hypothesis can be formulated: activation of presynaptic MT_1 receptors decreases calcium entry into neurons by physically interacting and inhibiting $Ca_v2.2$ channels. In the absence of calcium entry, the SNARE calcium sensor synaptotagmin would not be activated, fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane would not occur and consequently the release of dopamine would be diminished.

Our findings might be also relevant outside of the brain since a similar interplay between melatonin and dopamine has been firmly established in the retina, where dopamine levels are high during the day but low during the night due to the inhibition of dopamine release by retinal melatonin during nighttime (17).

Melatonin has been shown to regulate the electric activity or membrane ionic

conductance of other ion channels in the CNS, in particular potassium channels. Inhibitory or stimulatory effects have been observed in SCN neurons (64,65) and cerebellar granule cells (66). The reported sensitivity to pertussis toxin in most cases suggests a Gi protein-dependent mechanism. Whether a physical interaction between melatonin receptors and potassium channels may also contribute to the observed functional effects of melatonin has to be established in future studies. In addition, identification of further ion channels/transporters in the MT₁ interactome such as the voltage-gated sodium channel (P70276) and the electrogenic sodium bicarbonate transporter (O88343) provide novel options for future studies.

In conclusion, we provide here for the first time conclusive evidence for the presence of functional MT₁ receptors in presynaptic membranes of the hypothalamus, striatum and cortex, where they are part of a larger synaptic protein network. Interaction of Ca_v2.2 channels with MT₁ receptors inhibits calcium influx *in vitro*, providing a plausible molecular basis for the previously described inhibitory effect of melatonin on dopamine release.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies - Mouse anti-Munc-18 (1:1000) (610337) were from BD Transduction Laboratories; rabbit anti-Synapsin IIa (1:1000) (H-75) (SC-25538) from CliniSciences; rabbit anti-Pser9-synapsin (1:1000) (p1560-9) from Phosphosolution; rabbit anti-Cav2.2 (1:200) (acc-002) from Alomone labs; rabbit anti-SynapsinII (1:200) (SC-25538) from SantaCruz; mouse anti-SynI (1:200) (SC-136237) from SantaCruz; mouse anti-Flag M2 (1:2000) from Sigma; rabbit anti-Myc (1:200) from Upstate Labs, or mouse monoclonal, Roche), anti-HA (1:500) from Cell signaling; anti-SNAP25 was a generous gift of Dr Luke H. Chamberlain (University of Edinburgh, UK).

Plasmids - The expression plasmid for the human Myc-DDK-Munc-18 protein was purchased from OriGene (RC218471), the mouse HA-SNAP25 expression plasmid was donated by Dr Luke H. Chamberlain (University of Edinburgh, UK) and the rat

synapsin IIa expression plasmid by Dr Jaqueline Burré (Stanford University, USA). Human MT₁-YFP and Myc-MT₂ expression plasmids were described previously (67).

Cell culture and transfection - HEK293 cells were grown in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 4.5g/L glucose, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin and 1mM glutamine) (Invitrogen, CA). CHO cells stably expressing the human MT₁ receptor were grown in HANKS F12 medium. Transient transfections were performed using JetPEI (Polyplus Transfection, France), according to manufacturer's instructions. CHO cells stably expressing the MT₁ receptor were transfected with calcium channel cDNAs (Cav2.2, Cavβ1b and Cava2δ-1) using Lipofectamine 2000.

Peptide affinity chromatography - Ni-NTA beads, His₆-peptide synthesis, pull-down and subsequent 1D and 2D analysis was performed as described in (37). The synthetic peptides correspond to the human MT₁ Cter (last 61 amino acids) and MT₂ Cter (last 58 amino acids) as well as peptides encompassing different regions of MT₁ C-ter as described in (37).

Yeast two-hybrid screens - Y2H screens were performed with the intracellular loops i2 (residues 123-141), i3 (residues 208-239) and the C-tail (residues 294-350) of MT₁ and MT₂ alone or in combination against random-primed, size-selected (mean insert size: 800 bp) cDNA libraries of differentiated human brown adipocyte PAZ6 cells (PZD), human fetal brain (HFBR), and rat hippocampus (RHC) library according to the previously described procedure (35) (Supplementary Table 1). The bait constructs are cloned in frame with the Gal4 activation domain in the vector pB6, which is derived from the original pAS2ΔΔ plasmid (68). A confidence score (PBS, for Predicted Biological Score) was attributed to each interaction as previously described (69). The PBS relies on two different levels of analysis. Firstly, a local score takes into account the redundancy and independency of prey fragments, as well as the distribution of reading frames and stop codons in overlapping fragments. Secondly, a global score takes into

account the interactions found in all the screens performed at Hybrigenics using the same library. This global score represents the probability of an interaction being nonspecific. For practical use, the scores were divided into four categories, from A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags interactions involving highly connected prey domains previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism. Interactions of the F and NT category were not considered further. The PBS scores have been shown to positively correlate with the biological significance of interactions (70,71).

Membrane Yeast two-hybrid (MYTH) screen - The MYTH screens were done as outlined previously (72). In short, baits were transformed into a *Saccharomyces cerevisiae* strain by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method as described by (73). Subsequently, a prey cDNA library in the NubG-X orientation was transformed into these yeast strains containing MT₁ receptors by the same method. Putative interactors were selected by growth on synthetic dropout media lacking the amino acids tryptophan, leucine, adenine and histidine (SD-WLAH). Prey plasmids were isolated using a commercial DNA isolation kit modified for yeast, followed by transformation and additional amplification in *Escherichia coli*. Final purified plasmids were subjected to sequencing and BLAST analysis, to identify specific interactors. To eliminate spurious interactors, the prey plasmids were once again transformed into yeast harboring MT₁ or an artificial bait (the transmembrane segment of the human T-cell surface glycoprotein CD4 linked to Cub-TF) and interaction was assessed. Any preys that also interacted with the artificial bait were deemed promiscuous and discarded.

TAP purification - the tandem affinity purification was conducted as described (74).

Co-immunoprecipitation - HEK293T cells were seeded in 10cm dishes and co-transfected with 4µg of each indicated plasmids. 48 post-transfection, cells were lysed in 1.5 ml of cold lysis buffer (75 mM Tris, 2 mM EDTA, 12 mM MgCl₂, pH 7.4) and solubilized 16 H in 0.5 % digitonin at 4°C after

sonication. Cells are then centrifuged 1 h at 13000 x g, and the supernatant incubated with 2 µg of the indicated antibodies and 50 µl of G protein sepharose beads for 2 H. Immunoprecipitated proteins were eluted with 50 µl of SDS-PAGE sample buffer (XX mM Tris/HCl, pH 6.8, 10% SDS, 10% glycerol, 100 mM DTT, 0.5% bromphenol blue) 4 H at 37 °C. Westen-blot was then conducted and Immunoreactivity was revealed using secondary antibodies coupled to 680 or 800 nm fluorophores using the Odyssey LI-COR infrared fluorescent scanner (ScienceTec, France).

Subcellular-fractionation and ¹²⁵I-MLT binding - Assays were performed as previously described (35,40).

Patch Clamp analysis - Patch clamp experiments on CHO cells were performed as described in detail in Beedle et al. (43) and Kisilevsky et al. (56). Recordings were performed using and Axoptach 200 B amplifier driven by pCLAMP software. Internal and external recording solutions were as described by us before (56). Receptor agonist was applied directly to the cells via a gravity driven microperfusion system.

Primary culture of hippocampi neurons and confocal imaging - Neuronal cultures were made as described previously (41) with some modifications. Hippocampi of rat embryos were dissected at day 17-18. After trypsinization, tissue dissociation was achieved with a Pasteur pipette. Cells were counted and plated on poly-D-lysine-coated 15-mm diameter coverslips, at a density of 300-375 cells per square millimeter, in complete Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen), containing 0.5 mM L-glutamine, 10 U/mL penicillin G, and 10 mg/mL streptomycin. Three hours after plating, the medium was replaced by a conditioned medium obtained by incubating glial cultures (70–80% confluency) for 24 hours in the complete medium described above. Hippocampal neurons were transfected on the 7-8th DIV as follows: for each coverslip, plasmid DNA (2.5 µg) was mixed with 50 µL of Neurobasal medium without B27 supplement. After 15 minutes at room temperature, 1.25 µL of Lipofectamine 2000 in 50 µL of Neurobasal medium were added, and incubation continued for another 30 minutes. After the addition of 150 µL of complete Neurobasal medium containing B27

supplement, the mix was applied onto the neuronal culture, and transfection lasted for 3 hours at 37°C. Typically, 5-10% of neurons expressed the receptors after transfection. Receptor expression was allowed in growth medium for 48 hours after transfection.

Indirect immunofluorescence - Cells on coverslips were washed with D-PBS+ (D-PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂) at 37°C, then fixed with paraformaldehyde (3%) containing 4% sucrose at 37°C in D-PBS-, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in D-PBS-. After 2 x 10 minute-washes in D-PBS+, cells were incubated for 30 minutes in antibody buffer (3% bovine serum albumin, 2% normal goat serum, 2% normal donkey serum in D-PBS-). Incubation with primary antibodies was then performed in antibody buffer for 2 hour at room temperature. After 2 x 10 minute-washes in D-PBS-, incubation with secondary

antibodies proceeded for 1 hour. The secondary antibodies used were Alexa-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG. The coverslips were finally mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France). Immunofluorescence images were generated using a Leica TCS SP2 AOBS laser scanning confocal microscope (40, 63 or 100 x oil-immersion lens). Background was lowered using Gaussian blur (radius 1 pixel) and contrast and brightness of images displayed in figures were modified using Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, CA) for clearer demonstration and do not correspond to the analysis conditions.

Statistical analysis - Results were analyzed by PRISM (GraphPad Software). Data are expressed as mean ± SEM of at least 3 experiments. Student *t* test was applied for statistical analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fondation Recherche Médicale (Equipe FRM FRM DEQ20130326503 to R.J.), Inserm, CNRS and the “Who am I?” laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 funded by the French Gouvernement through its “Investments for the Future” program operated by The French National Research Agency (ANR) under grant No.ANR-11-IDEX-0005-01, and by the Canadian Institutes of Health Research. We thank Anne-Sophie Journé for her implication in mice breeding, and Marine Le Boulch for her expert technical support. We thank all Hybrigenics staff for assistance with yeast two-hybrid analysis. GWZ is a Canada Research Chair and Alberta Innovates Health Solutions Scientist.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.B., L.C., K.S., V.W., B.H., P.M., and P.T. performed research and/or analyzed data; I.J. generated protein networks, R.J. and A.B. wrote the manuscript; G.W.Z., I.J., M.D., I.S., P.D., P.T. and P.M. reviewed and/or edited the manuscript and contributed to discussion; G.Z., M.D., I.S., P.D. and R.J. managed the project.

CONFLICT of INTEREST

P.T. is employee and shareholder of Hybrigenics Services. All the authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Dubocovich, M. L., Delagrange, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., and Olcese, J. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* **62**, 343-380
2. Karamitri, A., Renault, N., Clement, N., Guillaume, J. L., and Jockers, R. (2013) Minireview: Toward the Establishment of a Link between Melatonin and Glucose Homeostasis: Association of Melatonin MT2 Receptor Variants with Type 2 Diabetes. *Mol Endocrinol* **27**, 1217-1233
3. Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., and Delagrange, P. (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* **154**, 1182-1195
4. Bonnefond, A., Clement, N., Fawcett, K., Yengo, L., Vaillant, E., Guillaume, J. L., Dechaume, A., Payne, F., Roussel, R., Czernichow, S., Hercberg, S., Hadjadj, S., Balkau, B., Marre, M., Lantieri, O., Langenberg, C., Bouatia-Naji, N., Charpentier, G., Vaxillaire, M., Rocheleau, G., Wareham, N. J., Sladek, R., McCarthy, M. I., Dina, C., Barroso, I., Jockers, R., and Froguel, P. (2012) Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* **44**, 297-301
5. Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., and Pandi-Perumal, S. R. (2011) Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* **93**, 350-384
6. Yi, C., Pan, X., Yan, H., Guo, M., and Pierpaoli, W. (2005) Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Ann N Y Acad Sci* **1057**, 384-392
7. Wu, Y. H., Ursinus, J., Zhou, J. N., Scheer, F. A., Ai-Min, B., Jockers, R., van Heerikhuize, J., and Swaab, D. F. (2013) Alterations of melatonin receptors MT1 and MT2 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus during depression. *J Affect Disord* **148**, 357-367
8. Etain, B., Dumaine, A., Bellivier, F., Pagan, C., Francelle, L., Goubran-Botros, H., Moreno, S., Deshommes, J., Moustafa, K., Le Dudal, K., Mathieu, F., Henry, C., Kahn, J. P., Launay, J. M., Muhleisen, T. W., Cichon, S., Bourgeron, T., Leboyer, M., and Jamain, S. (2012) Genetic and functional abnormalities of the melatonin biosynthesis pathway in patients with bipolar disorder. *Hum Mol Genet* **21**, 4030-4037
9. Melke, J., Goubran Botros, H., Chaste, P., Betancur, C., Nygren, G., Anckarsater, H., Rastam, M., Stahlberg, O., Gillberg, I. C., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M. C., Fauchereau, F., Durand, C. M., Chevalier, F., Drouot, X., Collet, C., Launay, J. M., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2008) Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* **13**, 90-98
10. Wu, Y. H., Zhou, J. N., Van Heerikhuize, J., Jockers, R., and Swaab, D. F. (2007) Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **28**, 1239-1247
11. Wang, L., Li, J., Ruan, Y., Lu, T., Liu, C., Jia, M., Yue, W., Liu, J., Bourgeron, T., and Zhang, D. (2013) Sequencing ASMT identifies rare mutations in Chinese Han patients with autism. *PLoS One* **8**, e53727
12. Zisapel, N. (2000) Development of a melatonin-based formulation for the treatment of insomnia in the elderly. *Drug Develop Res* **50**, 226-234
13. Uchiyama, M., Hamamura, M., Kuwano, T., Nishiyama, H., Nagata, H., and Uchimura, N. (2011) Evaluation of subjective efficacy and safety of ramelteon in Japanese subjects with chronic insomnia. *Sleep Med* **12**, 119-126
14. de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaer, E., Renard, P., Munoz, C., and Millan, M. J. (2010) Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 628-642

15. Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., and Reppert, S. M. (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**, 91-102
16. Zisapel, N., Egozi, Y., and Laudon, M. (1982) Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res* **246**, 161-163
17. Dubocovich, M. L. (1983) Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* **306**, 782-784
18. Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J. M., and Cussac, D. (2003) The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 954-964
19. Chenu, F., El Mansari, M., and Blier, P. (2013) Electrophysiological effects of repeated administration of agomelatine on the dopamine, norepinephrine, and serotonin systems in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* **38**, 275-284
20. Wang, L. M., Suthana, N. A., Chaudhury, D., Weaver, D. R., and Colwell, C. S. (2005) Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* **22**, 2231-2237
21. Larson, J., Jessen, R. E., Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., and Manev, H. (2006) Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT₂ receptor-deficient mice. *Neurosci Lett* **393**, 23-26
22. Rawashdeh, O., de Borsetti, N. H., Roman, G., and Cahill, G. M. (2007) Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science* **318**, 1144-1146
23. Ramirez-Rodriguez, G., Klempin, F., Babu, H., Benitez-King, G., and Kempermann, G. (2009) Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2180-2191
24. Hutchinson, A. J., Hudson, R. L., and Dubocovich, M. L. (2012) Genetic deletion of MT₁ and MT₂ melatonin receptors differentially abrogates the development and expression of methamphetamine-induced locomotor sensitization during the day and the night in C3H/HeN mice. *J Pineal Res* **53**, 399-409
25. Uz, T., Akhisaroglu, M., Ahmed, R., and Manev, H. (2003) The pineal gland is critical for circadian Period1 expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* **28**, 2117-2123
26. Comai, S., Ochoa-Sanchez, R., and Gobbi, G. (2013) Sleep-wake characterization of double MT₁/MT₂ receptor knockout mice and comparison with MT₁ and MT₂ receptor knockout mice. *Behav Brain Res* **243**, 231-238
27. Zlotos, D. P., Jockers, R., Cecon, E., Rivara, S., and Witt-Enderby, P. A. (2013) MT and MT Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*
28. Schiller, E. D., Champney, T. H., Reiter, C. K., and Dohrman, D. P. (2003) Melatonin inhibition of nicotine-stimulated dopamine release in PC12 cells. *Brain Res* **966**, 95-102
29. Hardeland, R. (2009) Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* **35**, 183-192
30. Bockaert, J., Perroy, J., Becamel, C., Marin, P., and Fagni, L. (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 89-109
31. Maurice, P., Guillaume, J. L., Benleulmi-Chaachoua, A., Daulat, A. M., Kamal, M., and Jockers, R. (2011) GPCR-interacting proteins, major players of GPCR function. *Adv Pharmacol* **62**, 349-380
32. Gavarini, S., Becamel, C., Chanrion, B., Bockaert, J., and Marin, P. (2004) Molecular and functional characterization of proteins interacting with the C-terminal domains of 5-HT₂ receptors: emergence of 5-HT₂ "receptosomes". *Biol Cell* **96**, 373-381
33. Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J., Dekeyne, A., Seveno, M., Rivet, J. M., Gaven, F., Deleris, P., Herve, D., Fone, K. C., Bockaert, J., Millan, M.

- J., and Marin, P. (2012) 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* **4**, 1043-1056
34. Ramos, C., Chardonnet, S., Marchand, C. H., Decottignies, P., Ango, F., Daniel, H., and Le Marechal, P. (2012) Native presynaptic metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) interacts with exocytosis proteins in rat cerebellum. *J Biol Chem* **287**, 20176-20186
 35. Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpaux, B., Borg-Capra, C., and Jockers, R. (2008) The PDZ protein mupp1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *J Biol Chem* **283**, 16762-16771
 36. Daulat, A. M., Maurice, P., and Jockers, R. (2009) Recent methodological advances in the discovery of GPCR-associated protein complexes. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 72-78
 37. Maurice, P., Daulat, A. M., Broussard, C., Mozo, J., Clary, G., Hotellier, F., Chafey, P., Guillaume, J. L., Ferry, G., Boutin, J. A., Delagrang, P., Camoin, L., and Jockers, R. (2008) A generic approach for the purification of signaling complexes that specifically interact with the carboxy-terminal domain of G protein-coupled receptors. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1556-1569
 38. Hosaka, M., Hammer, R. E., and Sudhof, T. C. (1999) A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* **24**, 377-387
 39. Deery, M. J., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Sladek, M., Karp, N. A., Green, E. W., Charles, P. D., Reddy, A. B., Kyriacou, C. P., Lilley, K. S., and Hastings, M. H. (2009) Proteomic analysis reveals the role of synaptic vesicle cycling in sustaining the suprachiasmatic circadian clock. *Curr Biol* **19**, 2031-2036
 40. Tallent, M. K., Varghis, N., Skorobogatko, Y., Hernandez-Cuebas, L., Whelan, K., Vocadlo, D. J., and Vosseller, K. (2009) In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 174-181
 41. Carrel, D., Masson, J., Al Awabdh, S., Capra, C. B., Lenkei, Z., Hamon, M., Emerit, M. B., and Darmon, M. (2008) Targeting of the 5-HT1A serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J Neurosci* **28**, 8063-8073
 42. Carrel, D., Simon, A., Emerit, M. B., Rivals, I., Leterrier, C., Biard, M., Hamon, M., Darmon, M., and Lenkei, Z. (2011) Axonal targeting of the 5-HT1B serotonin receptor relies on structure-specific constitutive activation. *Traffic* **12**, 1501-1520
 43. Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* **7**, 118-125
 44. Evans, R. M., You, H., Hameed, S., Altier, C., Mezghrani, A., Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2010) Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *J Biol Chem* **285**, 1032-1040
 45. Gerdin, M. J., Masana, M. I., Ren, D., Miller, R. J., and Dubocovich, M. L. (2003) Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT(1) and hMT(2) melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 931-939
 46. Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L., Couturier, C., Delagrang, P., and Jockers, R. (2006) The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT(1) melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* **25**, 3012-3023
 47. Bondi, C. D., McKeon, R. M., Bennett, J. M., Ignatius, P. F., Brydon, L., Jockers, R., Melan, M. A., and Witt-Enderby, P. A. (2008) MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *J Pineal Res* **44**, 288-298
 48. Barry, J., Gu, Y., Jukkola, P., O'Neill, B., Gu, H., Mohler, P. J., Rajamani, K. T., and Gu, C. (2014) Ankyrin-g directly binds to Kinesin-1 to transport voltage-gated na(+) channels into axons. *Dev Cell* **28**, 117-131
 49. Leterrier, C., Laine, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., and Lenkei, Z. (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci* **26**, 3141-3153

50. Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A. D., Freissmuth, M., Jockers, R., and Nanoff, C. (1999) Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* **56**, 1014-1024
51. Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Delagrangé, P., Spadoni, G., Cohen, W., Malpoux, B., Boutin, J. A., and Nosjean, O. (2012) Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res* **53**, 29-37
52. Deak, F., Shin, O. H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., Rizo, J., Kavalali, E. T., and Sudhof, T. C. (2006) Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *EMBO J* **25**, 2856-2866
53. MacDonald, J. I., Dietrich, A., Gamble, S., Hryciw, T., Grant, R. I., and Meakin, S. O. (2012) Nesca, a novel neuronal adapter protein, links the molecular motor kinesin with the pre-synaptic membrane protein, syntaxin-1, in hippocampal neurons. *J Neurochem* **121**, 861-880
54. Holt, M., Varoqueaux, F., Wiederhold, K., Takamori, S., Urlaub, H., Fasshauer, D., and Jahn, R. (2006) Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *J Biol Chem* **281**, 17076-17083
55. Zamponi, G. W., and Currie, K. P. (2013) Regulation of Ca(V)2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 1629-1643
56. Kisilevsky, A. E., Mulligan, S. J., Altier, C., Iftinca, M. C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B. A., and Zamponi, G. W. (2008) D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* **58**, 557-570
57. Kisilevsky, A. E., and Zamponi, G. W. (2008) D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels (Austin)* **2**, 269-277
58. Khanna, R., Zougman, A., and Stanley, E. F. (2007) A proteomic screen for presynaptic terminal N-type calcium channel (CaV2.2) binding partners. *J Biochem Mol Biol* **40**, 302-314
59. Muller, C. S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H. G., Meissner, M., Rammner, B., Striessnig, J., Flockerzi, V., Fakler, B., and Schulte, U. (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14950-14957
60. Cardinali, D. P., Nagle, C. A., Freire, F., and Rosner, J. M. (1975) Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **18**, 72-85
61. Zisapel, N., and Laudon, M. (1982) Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus in vitro: inhibition by melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* **104**, 1610-1616
62. Zisapel, N., and Laudon, M. (1983) Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res* **272**, 378-381
63. Escames, G., Macias, M., Leon, J., Garcia, J., Khaldy, H., Martin, M., Vives, F., and Acuna-Castroviejo, D. (2001) Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum. *J Neuroendocrinol* **13**, 459-466
64. Jiang, Z., Nelson, C., and Allen, C. (1995) Melatonin activates an outward current and inhibits I_h in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* **687**, 125-132
65. van den Top, M., Buijs, R. M., Ruitjer, J. M., Delagrangé, P., Spanswick, D., and Hermes, M. L. (2001) Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience* **107**, 99-108
66. Huan, C. L., Zhou, M. O., Wu, M. M., Zhang, Z. H., and Mei, Y. A. (2001) Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Brain Research* **917**, 182-190
67. 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
68. Fromont-Racine, M., Rain, J. C., and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genetics* **16**
 69. Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chagnet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J. A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M. P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., and Daviet, L. (2005) Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res* **15**, 376-384
 70. Rain, J. C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A., and Legrain, P. (2001) The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori. *Nature* **409**, 211-215
 71. Wojcik, J., Boneca, I. G., and Legrain, P. (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J Mol Biol* **323**, 763-770
 72. Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., and Stagljar, I. (2010) Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat Protoc* **5**, 1281-1293
 73. Gietz, R. D., and Woods, R. A. (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* **313**, 107-120
 74. Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrangue, P., and Jockers, R. (2007) Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* **6**, 835-844

Figure 1

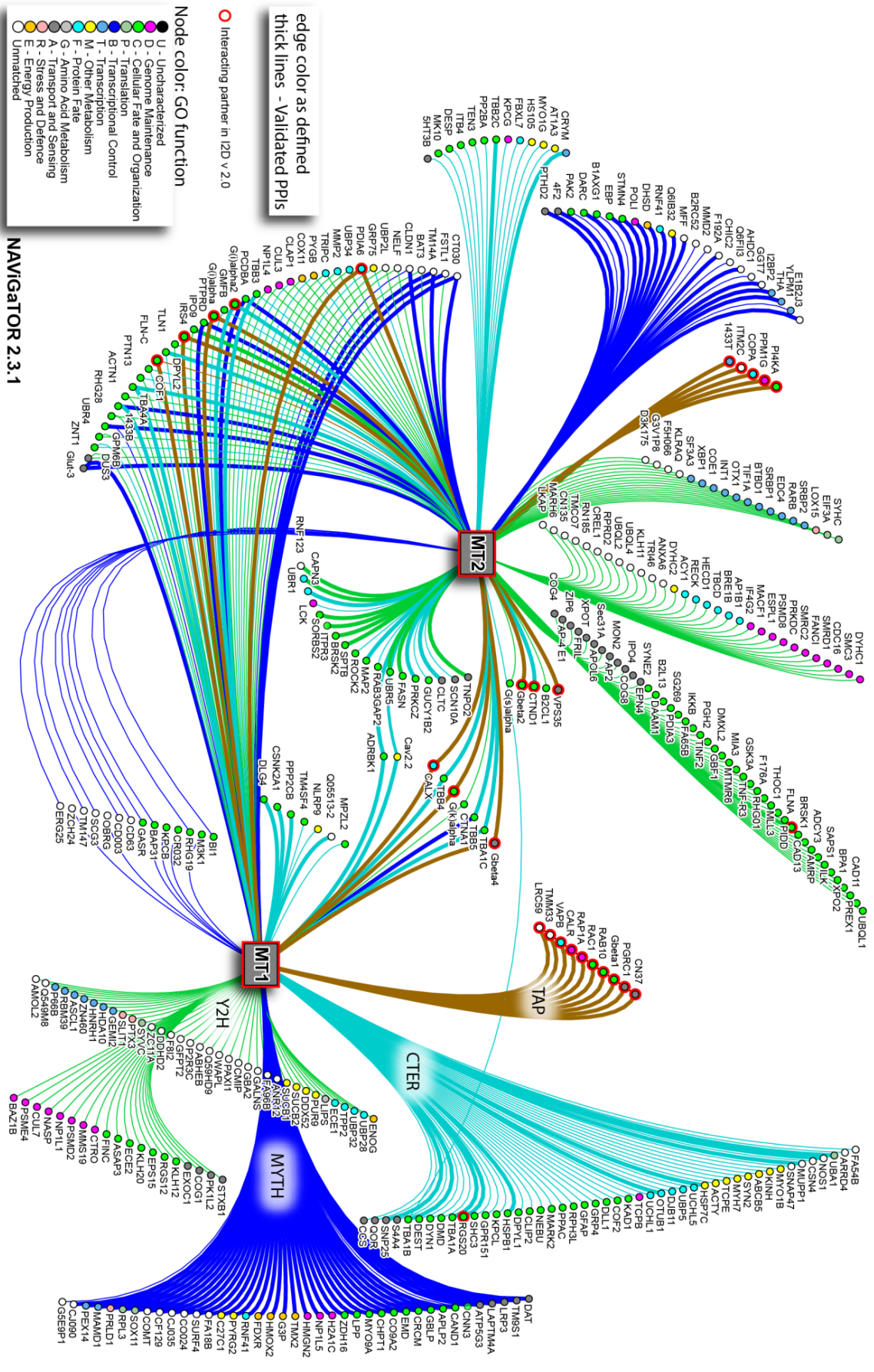


Figure 1 (suite)

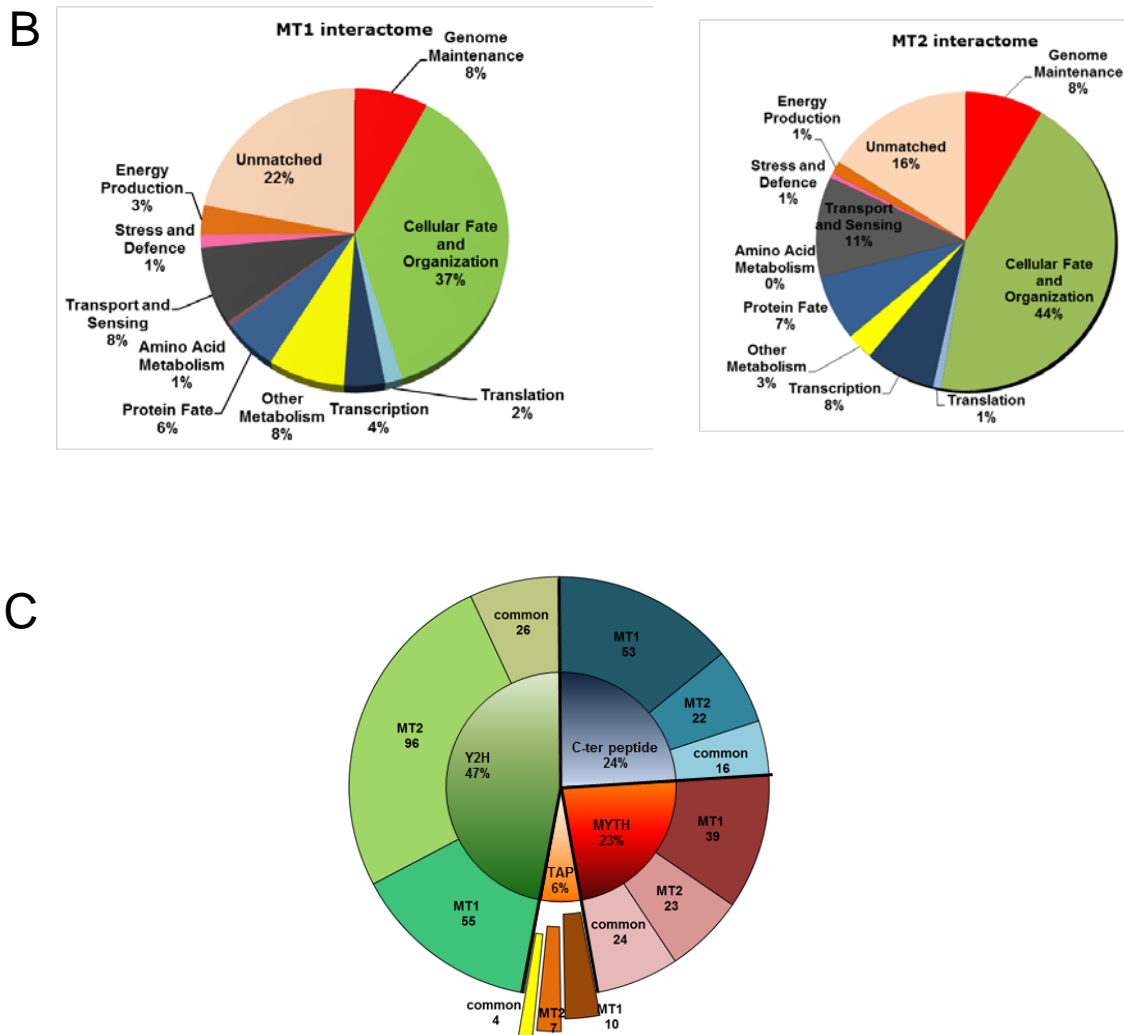


FIGURE 1. MT₁ and MT₂ receptor interactome. (A) Melatonin receptor network based on 19 different screens. Identified proteins are clustered based on the method used. Edge colors consider the identification methods applied as defined: dark blue for the MYTH, blue for Cter peptide purification, green for the Y2H and brown for the TAP. Thick lines correspond to confirmed protein-protein interactions (PPIs) and node colors refer to Gene Ontology (GO) function as described in the legend. Red Highlighted nodes consider known PPIs available in protein-protein interaction data I2D version 2.0. The network contains 376 interacting partners of which 156, 157 and 63 are specific for MT₁, MT₂ or common for both receptors, respectively. The network is visualized using NAViGaTOR 2.3.1 tools <http://ophid.utoronto.ca>. (B) Classification of PPIs of the MT₁ and MT₂ receptor interactomes depending on Gene Ontology entries. The relative abundance of each class is expressed as percentage of the total number of PPIs identified. (C) Relative abundance of PPIs of the combined MT₁ and MT₂ receptor interactome identified by each technique (inner circle) and absolute number of PPIs specific or common for MT₁ and MT₂ receptors and identified by each technique (outer circle). CTER, carboxyl terminus peptide affinity chromatography; MYTH, membrane yeast two-hybrid; TAP, tandem affinity purification; Y2H, yeast two-hybrid.

Figure 2

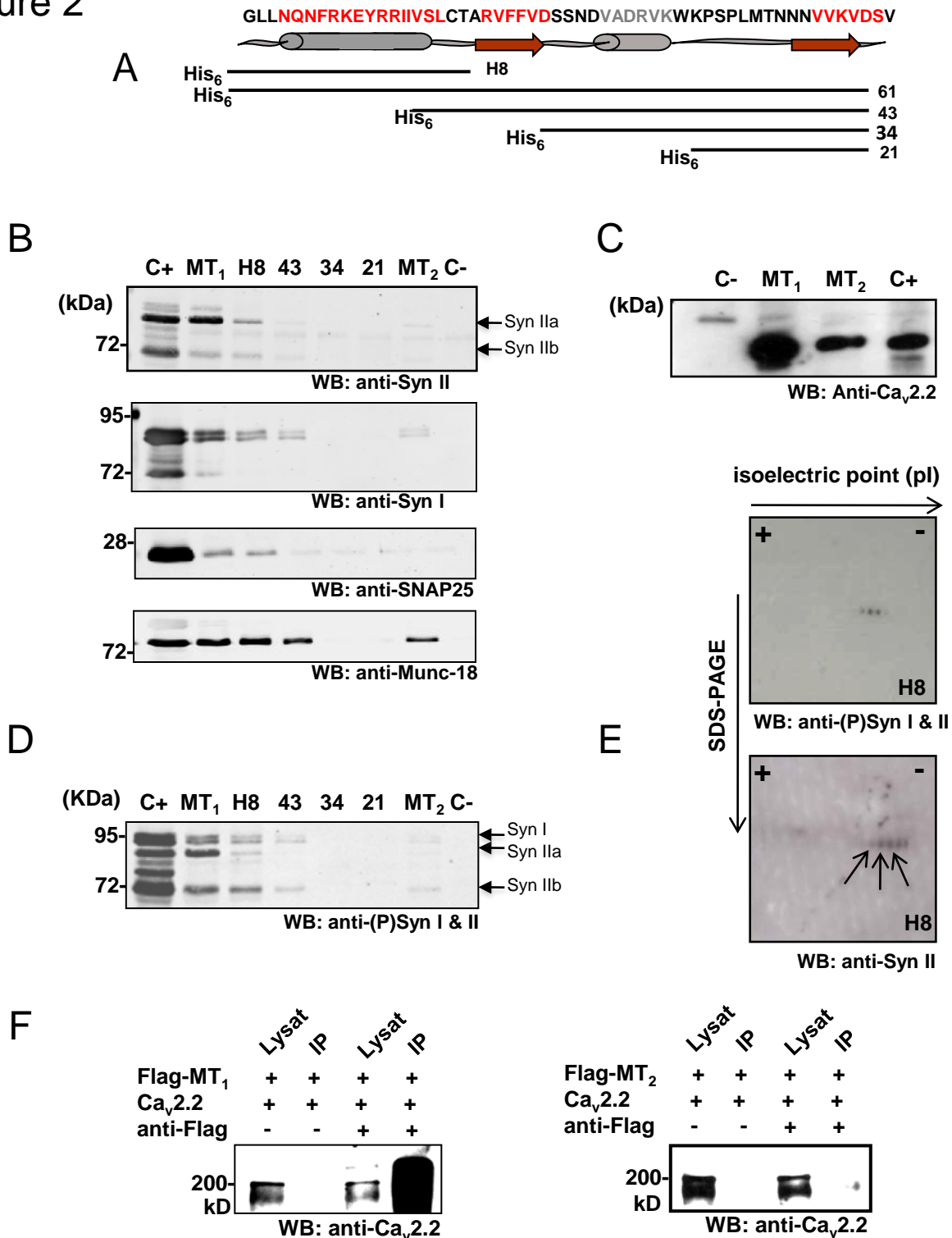


FIGURE 2: Presynaptic proteins interact with the Cter peptide of MT₁. (A) Schematic representation of MT₁ Cter and localization of Cter fragments. (B-D) Pull-down analysis using 25 nM of full length or fragments of His₆-MT₁ Cter immobilized on Ni-NTA beads. Beads are incubated with mice brain lysate, retained proteins separated by SDS-PAGE and analyzed by Western-blot with the indicated antibodies. (E) Separation of proteins associated with peptide H8 by 2D gel electrophoresis followed by western blot analysis with indicated antibodies. Arrows indicate three spots corresponding to phosphorylated forms of synapsin. (F) Coimmunoprecipitation of Ca_v2.2 and MT₁ or Flag-MT₂. Lysates from HEK293T cells expressing Ca_v2.2 α, β, γ subunits and Flag-MT₁ or Flag-MT₂, were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and coprecipitated Ca_v2.2 detected with anti-Ca_v2.2 antibodies. C+: brain lysate input; C-: beads without peptide. Western blots are representative of at least two further experiments.

Figure 3

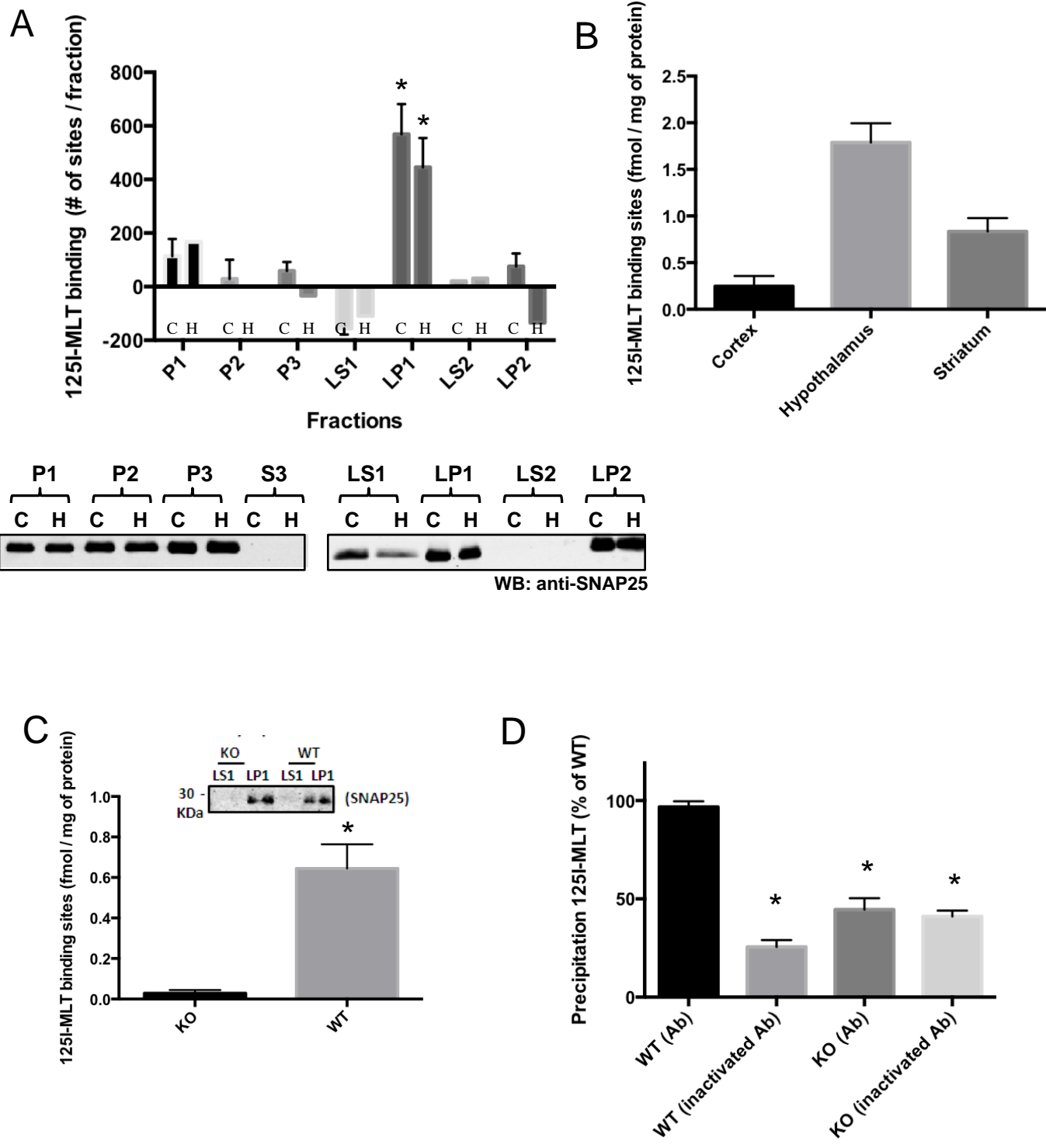


Figure 3 (suite)

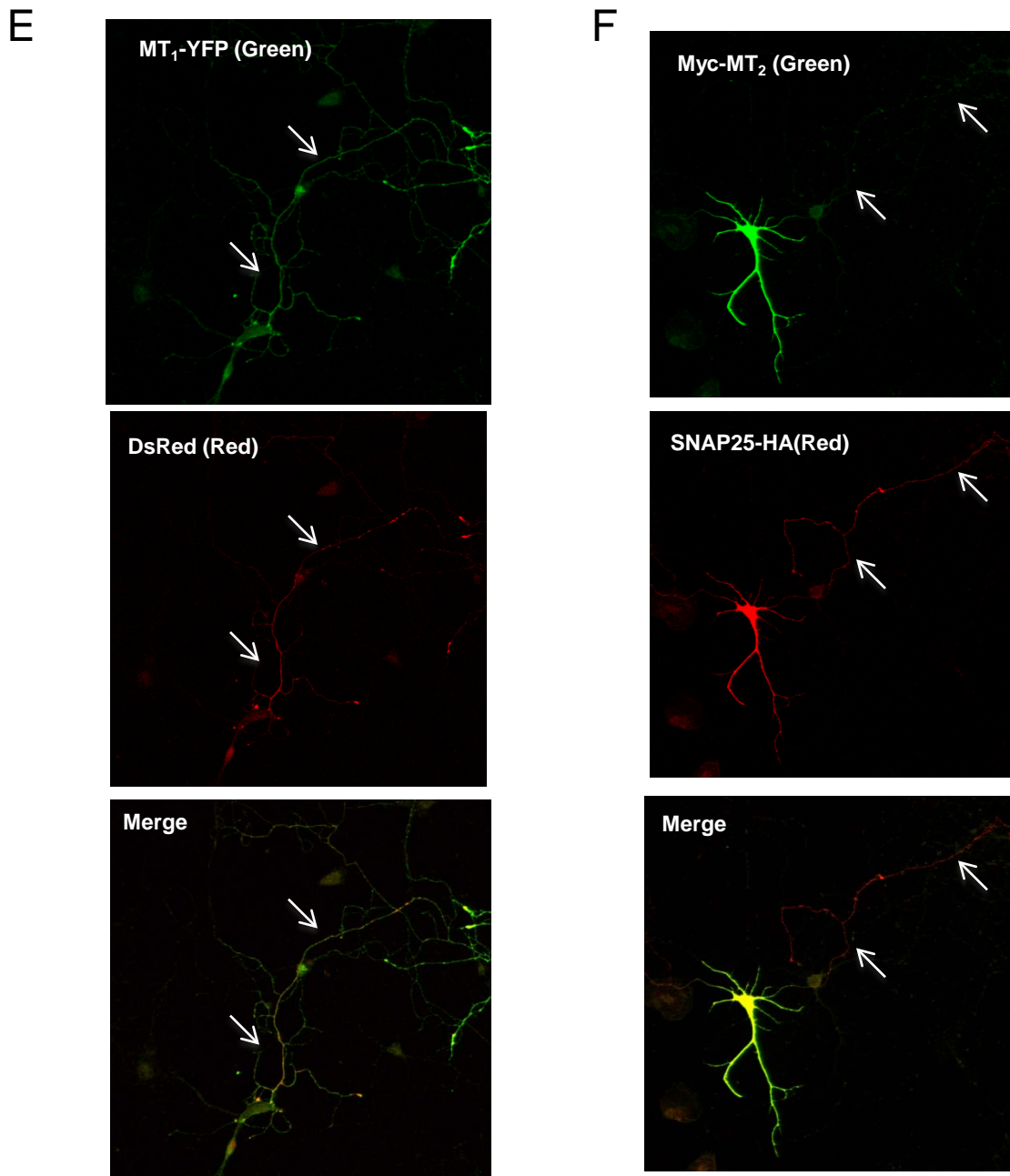


FIGURE 3. Melatonin receptors are localized in presynaptic membranes. (A) Subcellular fractionation of rat hypothalamic (*H*) or cortex (*C*) homogenates. Distribution of 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin binding and SNAP25 immunoreactivity in P1: Nuclear fraction; P2: Mitochondria and synaptosomes; P3: Microsomal fraction; S3: Cytosolic fraction; LS1: Synaptosomal supernatant, LP1: Synaptosomal membrane; LS2: Synaptosomal fraction; LP2: Crude synaptic vesicles pellet. (B,C) Number of specific 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin binding sites in presynaptic membranes from rat cortex, hypothalamus or striatum (B) or the cortex of wild-type (WT) or MT₁^{-/-}/MT₂^{-/-} double knockout (KO) mice (C). Non-specific binding was determined in the presence of an excess of non-labeled melatonin. The quality of the fractionation was monitored by SNAP25 western blots. (D) Immunoprecipitation of 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin-labeled melatonin receptors from presynaptic membrane lysates from mouse cortex of WT or KO mice with anti-Ca_v2.2, -SNAP25 and -synapsin I and II antibodies. Heat-inactivated antibodies (Ab) were used as a negative control. (E,F) Confocal images of rat primary hippocampal neurons expressing MT₁-YFP and DsRed (E) or 6Myc-MT₂ and SNAP25-HA (F). Arrows indicate the location of the axon. Representative images are shown. 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin data are presented as mean ± SEM; n = 3. *P < 0.05, t test. Western blots were representative of two further experiments.

Figure 4

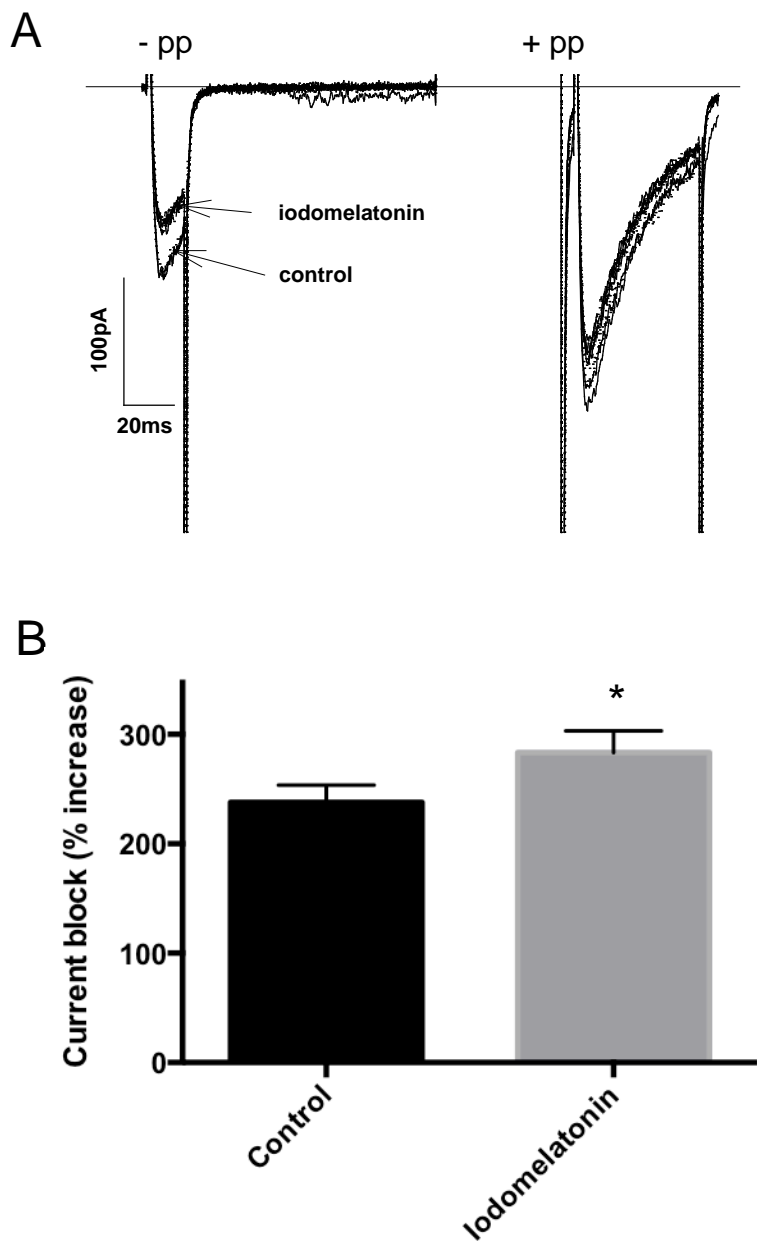


FIGURE 4: Inhibition of $Ca_v2.2$ channel activity by MT_1 receptors. (A) Current records obtained from $Ca_v2.2$ channels expressed in a CHO cell line that stably expresses MT_1 receptors, in the absence and the presence of iodometatonin ($1\mu M$). The first set of current records were obtained by a step depolarization from -100 mV to $+20$ mV, the second set of traces were recorded after application of a strong (150 mV) depolarizing prepulse (pp). Note the increase in current amplitude that is consistent with relief of tonic $G_{\beta\gamma}$ modulation. (B) Summary of the extent of prepulse facilitation in the absence and the presence of receptor agonist. Note the small increase, which is consistent with additional agonist induced, voltage dependent G protein inhibition. * $P < 0.05$ (paired t test), control vs. iodometatonin treated.

Figure 5

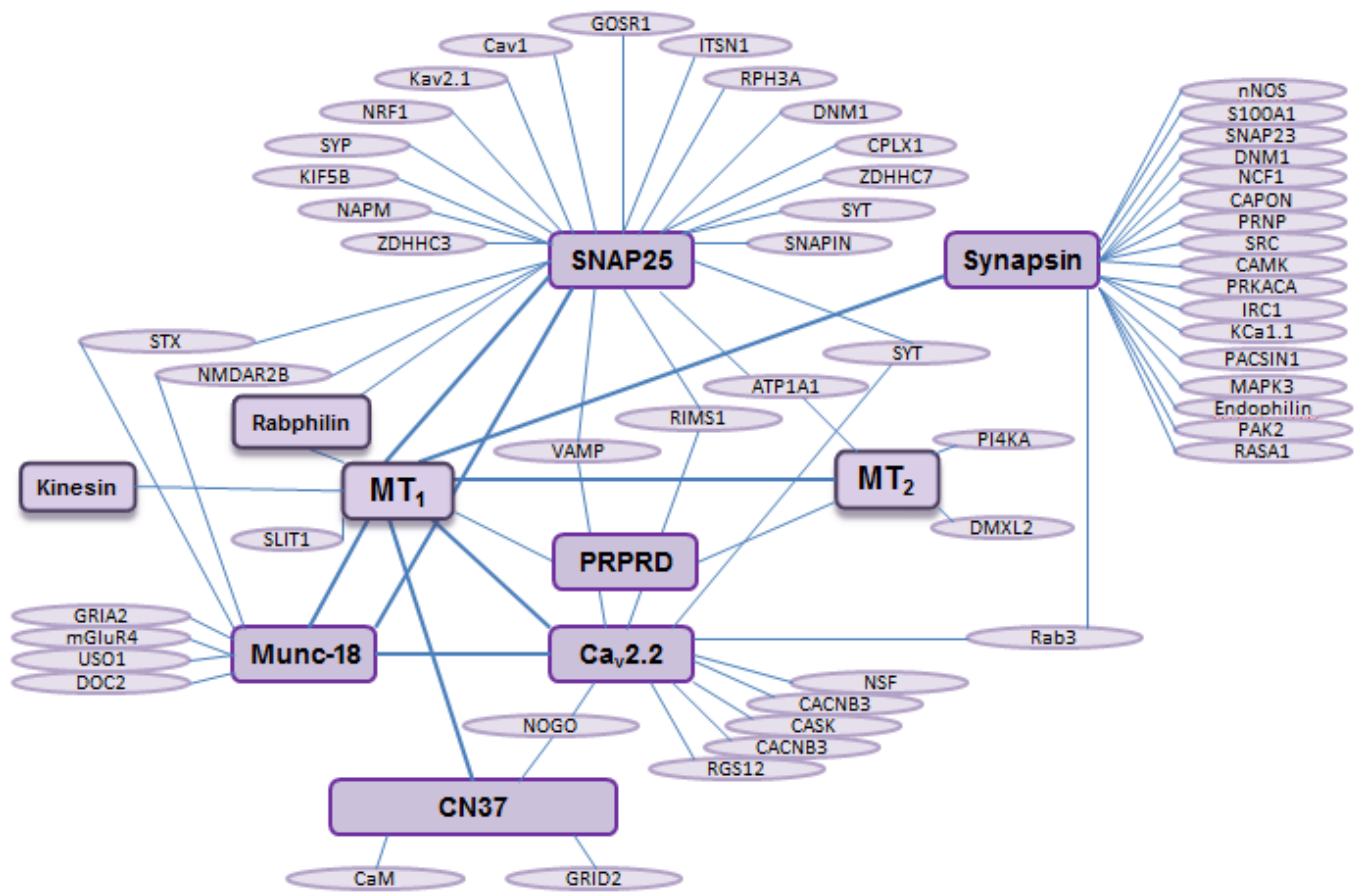
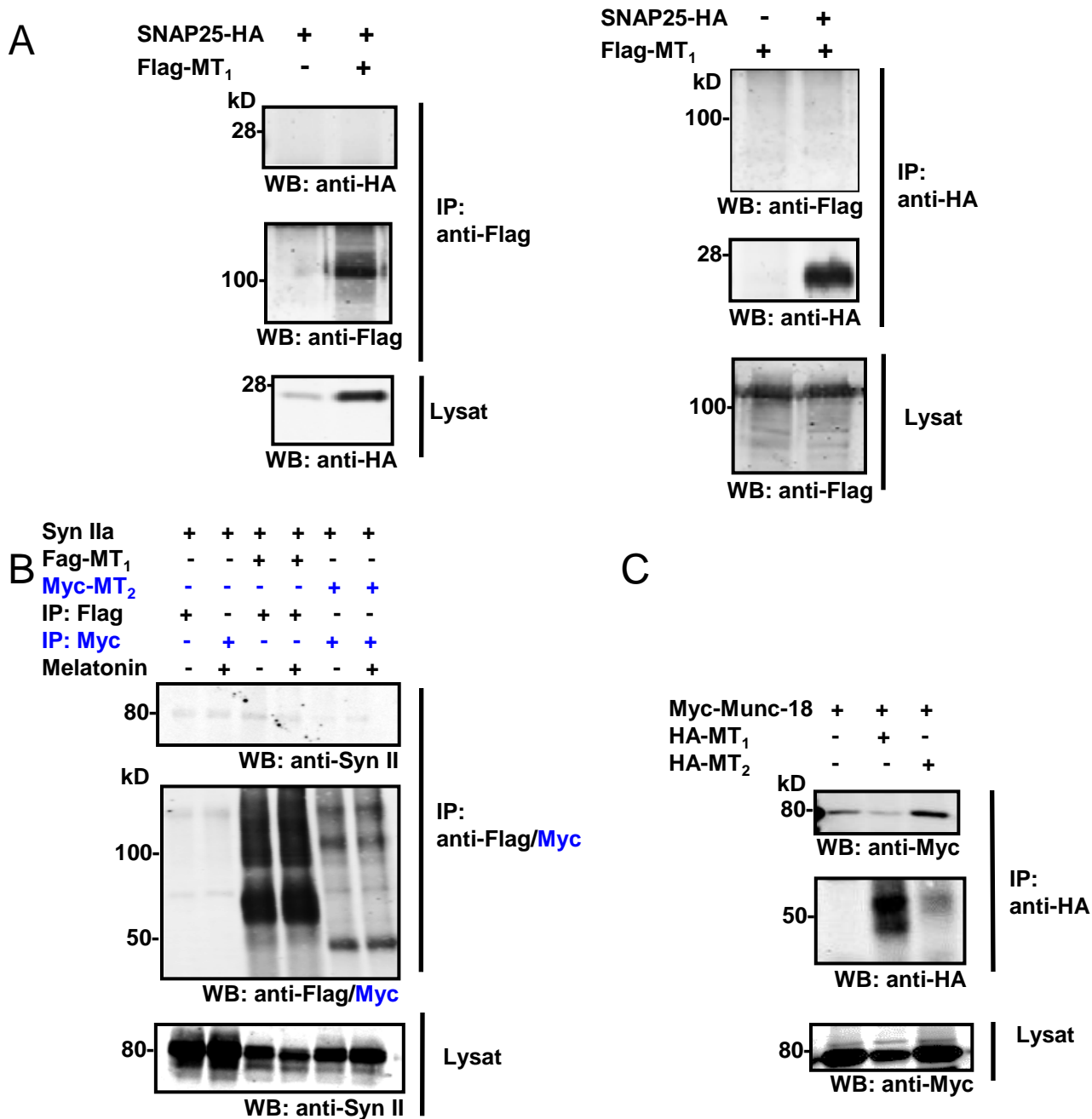


FIGURE 5: Melatonin receptor sub-network in the synapse. The network includes synaptic proteins of MT₁ receptors identified in the current study and connected proteins from the protein-protein interaction Data bank I2D version 2.0.

Supplementary Figure 1



SUPP. FIGURE 1: Co-immunoprecipitation experiments between MT₁ and MT₂ and SNAP25, Synapsin and Munc-18. (A) No co-IP is observed between Flag-MT₁ and SNAP25-HA in transfected HEK293 cells (coIP of SNAP25-HA, left site, and Flag-MT₁ shown, right site). (B) No co-IP is observed between Flag-MT₁ and Synapsin IIa (Syn IIa) and between Myc-MT₂ and Syn IIa in transfected HEK293 cells. IP with anti-Myc antibodies is highlighted in blue. Melatonin stimulation at 1 μM for 30 minutes prior to cell lysis. (C) Co-IP experiments between HA-MT₁ and Myc-Munc-18 and between HA-MT₂ and Myc-Munc-18 in transfected HEK293 cells. Technical problem with non-specific binding of Myc-Munc-18 protein to protein G beads does not allow to conclude on the co-IP between MT₁, MT₂ and Munc-18. Further optimization of experimental conditions is on-going. Western blots are representative of at least two further experiments.

Supplementary Table 1

MT₁ (peptide affinity chromatography)

Cter: mouse brain lysate

SwissProtID	Protein	SwissProtID	Protein
O88343	Electrogenic sodium bicarbonate transporter	O89058	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
Q9CQV8	14-3-3 protein beta	O89052	Alpha-tubulin
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	P68370	Tubulin alpha-1A chain
Q61177	Casein kinase II α chain	P05213	Tubulin alpha-1B chain
O88544	COP9 signalosome complex subunit 4	Q3TIZ0	unnamed protein product
Q7TST7	PKC zeta	P68362.1	Tubulin alpha-1A chain
Q9D7X3	Dual specificity protein phosphatase 3	P68366	Tubulin alpha-4A chain
Q8VED4	Ppp2cb	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain
Q768S4	Rabphilin 3A-like (NOC2)	Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
Q9QZB1	RGSZ1 (RGS20)	Q6XS93	Voltage gated N-type calcium channel Ca(V)2.2
P56399	Ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)	P60881	SNAP-25
Q77QI3	Ubiquitin thiolesterase	Q7TRP3	Olfactory receptor 670
Q8R5C5	Beta-centractin (=ARP 1B)	P49111.1	Transmembr. 4 superfamily member I (CD81)
Q80TV8	CLIP-associating protein 1 isoform 23	Q7TSN6	Galanin receptor-like protein
P18760	Cofilin-1 (non muscle isoform)	O70255.1	Epithelial V-like antigen 1 [precursor]
P45591	Cofilin-2 (muscle isoform)	Q61483	Delta-like protein 4
Q9Z0H8	Cytoplasmic linker protein 2	Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1
Q9R0P5	Dextrin	Q64332	Synapsin-2
P39053	Dynamin 1	Q66X03.1	NALP9A
P03995	Glial fibrillary acidic protein	Q60737.1	Casein kinase II α chain
Q61768	Kinesin	P23298	PKC eta
Q9CQI3	Glial maturation factor, beta	Q8BTM9	RAS guanyl releasing protein 4
Q91Z83	Myosin heavy polypeptide 7	Q768S4	Novel protein similar to rat rabphilin-3a related protein (NOC-2)
Q68FQ0	Chaperonin containg TCP1, subunit 5, epsilon \$	Q05512	Mark2 protein
Q542X7	Chaperonin subunit 2 (beta)	Q9WUP7	Ubiquitin C-terminal hydrolase
Q99KV1	DnaJ homolog, subfamily B, member 11	Q9R0P9	Ubiquitin C-terminal hydrolase isoenzyme L1 (UCHL1)
P97427	Collapsin response mediator protein (CRMP) 1	Q8VD69	Arrestin domain containg 4
Q8CI94	Brain glycogen phosphorylase	P46735.2	Myosin Ib
O08553	Dihydropyrimidinase-like 2	Q62411	Nebulin
Q8R570	Hypothetical protein LOC-67826 (SNAP 47)	P11531.2	Dystrophin
Q9CWE0	Hypothetical protein LOC-76824 (Protein FAM54B)	P38647	Stress-70 protein (GRP75)
Q9D358	LMW-PTPase	P14602	Heat shock protein 1
Q9CTU3	Unnamed protein product	P63017	HSP70 protein
Q52L87	Tubulin α -6 chain	P47199	Zeta crystallin / quinone reductase
Q9ERD7	Tubulin β chain	Q9JK72	Copper chaperone for SOD
P05213	Tubulin alpha-1B chain		
P68373	Tubulin alpha-1C chain		

Supplementary Table 1 (suite 1)

MT₂ (peptide affinity chromatography)

Cter: mouse brain lysate

SwissProtID	Protein	SwissProtID	Protein
P06687	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	P63318	Protein kinase C gamma type
Q8CGD9	Atp1a3 protein	P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform
Q61177	casein kinase II alpha subunit	P49187	Mitogen-activated protein kinase 10
P30999.1	Catenin delta-1	P30999	Catenin delta-1
Q5SXR6	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	Q5BJ29	F-box/LRR-repeat protein 7
Q9D7X3	Dual specificity protein phosphatase 3	Q8BMG7	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit
Q80U89	MKIAA0034 protein	Q91XJ7	Soluble guanylyl cyclase beta 2 subunit
Q7TST7	protein kinase C-zeta 2	P70336	Rho-associated protein kinase 2
Q64512	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	P68366	Tubulin alpha-4A chain
Q9CQI3	Glia maturation factor beta	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain
P15146	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	P68372	Tubulin beta-4B chain
P68373	Tubulin alpha-1C chain	P99024	Tubulin beta-5 chain
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	Q5SXR6	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)
Q7T SZ0	Heat shock protein 9	P68373	Tubulin alpha-1C chain
Q61699	Heat shock protein 105 kDa	Q9CQI3	Glia maturation factor beta (GMF-beta)
Q8CI94	Glycogen phosphorylase, brain form	Q5SUA5	Unconventional myosin-Ig
Q3UPX0	Crystallin, mu	P15146	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)	Q99KA2	Tuba1b protein
Q762C5	MUp76 (Calpain 3)	P18760	Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)
Q5SUA5	Unconventional myosin-Ig	Q8CI94	Brain glycogen phosphorylase
Q9JJ16	5-hydroxytryptamine receptor 3B	Q61699	Heat shock protein 105 kDa
G3X907	odd Oz/ten-m homolog 3	O08553	Dihydropyrimidinase-like 2
Q64632	Integrin beta-4 (GP150)	Q5SXR6	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)
P70276	Voltage-gated sodium channel		
FILMV6	desmoplakin isoform 2		

Supplementary Table 1 (suite 2)

MT₁ (TAP)

MT₂ (TAP)

Full-length MT₁ : HEK293 cells

Full-length MT₂ : HEK293 cells

SwissProtID	Protein
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta-1
Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4
P08754	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha
P63096	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
P62834	Ras-related protein Rap-1A
P63000	p21-Rac1 - Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
P26641	Elongation factor 1-gamma
O14654	Insulin receptor substrate 4
Q60FE5	Filamin A
P27824	Calnexin - IP90
P11021	78 kDa glucose-regulated protein
P27797	Calreticulin
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
P61026	Ras-related protein Rab-10
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59
P57088	Transmembrane protein 33
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0

SwissProtID	Protein
P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4
P63096	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1
P08754	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha - G(i) alpha-3
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
O14654	Insulin receptor substrate 4
Q60FE5	Filamin A
O60716	Catenin delta-1
O15355	Protein phosphatase 1G
P27824	Calnexin - IP90
P11021	78 kDa glucose-regulated protein - GRP-78
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6
P27348	14-3-3 protein theta
Q5T201	Coatamer subunit alpha
Q96QK1	Vacuolar protein sorting-associated protein 35
P42356	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
Q9NQX7	Integral membrane protein 2C - Cerebral protein 14

Supplementary Table 1 (suite 3)

MT₁ (MYTH)

Full-length MT₁ : human fetal brain library

SwissProtID	Protein
P63244	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1)
Q9H4P4	Homo sapiens ring finger protein 41 (RNF41), transcript variant 2,
Q9UN67	Homo sapiens protocadherin beta 10 (PCDHB10)
Q3KPI0	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, D (PTPRD), transcript variant 2
Q9BWC7	Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT), transcript variant 1
Q96A57	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30 (C20orf30), transcript variant 4
Q01959	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 (SLC6A3)
Q8WUD6	Voltage-gated sodium channel
O75381	Homo sapiens peroxisomal biogenesis factor 14 (PEX14)
Q13495-3	Homo sapiens mastermind-like domain containing 1 (MAMLD1), transcript variant 2
Q9P0B6	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)
Q6IBP4	Homo sapiens lysosomal protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4A)
Q9BT63	Homo sapiens ribosomal protein L3 (RPL3), transcript variant 1
P05204	Homo sapiens high-mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2)
O15321	Homo sapiens transmembrane 9 superfamily member 1 (TM9SF1), transcript variant 1
O15260	Homo sapiens surfactant protein 4 (SURF4)
Q9NPA0	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 24 (C15orf24)
Q96M02	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 90 (C10orf90)
P11169	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3)
Q9NRF8	Homo sapiens CTP synthase II (CTPS2), transcript variant 3
P04406	Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA
Q969W1	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 16 (ZDHHC16), transcript variant 1
P50402	Homo sapiens emerin (EMD)
Q96D05	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 35 (C10orf35)
P31946	Homo sapiens 14-3-3 beta/alpha (YWHAB), transcript variant 2
O75074	Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 3 (LRP3)
P07437	Homo sapiens tubulin, beta (TUBB)
Q9Y320	Homo sapiens thioredoxin-related transmembrane protein 2 (TMX2), transcript variant 1
Q9NYZ1	Homo sapiens family with sequence similarity 18, member B1 (FAM18B1)
Q9Y6G1	Homo sapiens transmembrane protein 14A (TMEM14A)
Q86VP6	Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1)
Q12841	Homo sapiens follistatin-like 1 (FSTL1), mRNA
P23508	Homo sapiens mutated in colorectal cancers (MCC), transcript variant 2
B2RTY4	Homo sapiens myosin IXA (MYO9A)
Q6GSK2	Homo sapiens ferredoxin reductase (FDXR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1
P30519	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 2 (HMOX2), transcript variant 2
Q93077	Homo sapiens histone cluster 1, H2ac (HIST1H2AC)
P35716	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 11 (SOX11)
Q6LEU9	Homo sapiens ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 transcript variant 3, mRNA
Q14055	Homo sapiens collagen, type IX, alpha 2 (COL9A2)
Q9Y255	Homo sapiens PRELI domain containing 1 (PRELID1)
Q4G0S4	Homo sapiens cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1 (CYP27C1), mRNA
Q93052.1	Homo sapiens LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma (LPP), transcript variant 2, mRNA
Q96NT1	Homo sapiens nucleosome assembly protein 1-like 5 (NAP1L5), mRNA

Supplementary Table 1 (suite 4)

MT₂ (MYTH)

Full-length MT₂ : human fetal brain library

SwissProtID	Protein
Q9NY35	Homo sapiens claudin domain containing 1 (CLDND1), transcript variant 1
Q13491	Homo sapiens glycoprotein M6B (GPM6B), transcript variant 4
Q3KPJ0	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, D (PTPRD), transcript variant 2
Q9H169	Homo sapiens stathmin-like 4 (STMN4)
A6NFW0	Homo sapiens ring finger protein 41 (RNF41), transcript variant 2
Q9GZU8	Homo sapiens family with sequence similarity 192, member A (FAM192A)
Q9GZY8	Homo sapiens mitochondrial fission factor (MFF), nuclear gene encoding mitochondrial protein
E1B2J3	Homo sapiens methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome) (MECP2), transcript variant 1
O14521	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein (SDHD)
Q9Y6G1	Homo sapiens transmembrane protein 14A (TMEM14A)
Q15125	Homo sapiens emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)
Q7Z5L9	Homo sapiens interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (IRF2BP2), transcript variant 2
Q6IB32	Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b (ATP6V0B), transcript variant 1
Q9UN67	Homo sapiens protocadherin beta 10 (PCDHB10), mRNA
Q6FII3	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 1 (C14orf1), mRNA
P10827	Homo sapiens thyroid hormone receptor, alpha transcript variant 2
P08195	Homo sapiens solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 (SLC3A2)
P11169	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), Glut-3
Q9UJ14	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase 7 (GGT7)
Q96A57	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30 (C20orf30), transcript variant 4
P31946	Homo sapiens 14-3-3 beta/alpha (YWHAB), transcript variant 2
Q9P2K9	Homo sapiens patched domain containing 2 (PTCHD2)
Q4VBN9	Homo sapiens Duffy blood group, chemokine receptor (DARC), transcript variant 1
Q9UNA4	Homo sapiens polymerase (DNA directed) iota (POLI)

Supplementary Table 1 (suite 5)

MT₁ (Y2H)

MT₁ Ctail: human fetal brain library

MT₁ i3 loop: human differentiated brown adipocyte cell line (PAZ6) library

#	SwissProtID	Protein	#	SwissProtID	Protein
E	P60709	Homo sapiens actin, beta	D	Q6UB98	Ankyrin repeat domain-containing protein 12
D	P50553	Achaete-scute homolog 1 - ASCL1	E	Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A
D	P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	A	Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
D	Q549M8	UPF0568 protein C14orf166	E	P14209	CD99 antigen (12E7)
D	Q8WTW3	COG complex subunit 1	E	Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD-4)
D	O94830	Phospholipase DDHD2	D	O14578	Citron Rho-interacting kinase (CRIK)
D	O60344	Endothelin-converting enzyme 2 (ECE-2)	D	Q9Y6N1	Cytochrome c oxidase assembly protein COX11
D	P23610	Factor VIII intron 22 protein (CpG island protein)	D	Q14999	Cullin-7 (CUL-7)
D	O94808	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase 2	D	P42566	Epidermal growth factor receptor substrate 15
E	P31629	Transcription factor HIVEP2	D	Q9Y3D0	Mitotic spindle-associated MMXD complex subunit MIP18
D	Q05469	Hormone-sensitive lipase	D	P02751	Fibronectin (FN) (Cold-insoluble globulin) (CIG)
D	P08253	(MMP-2) 72 kDa type IV collagenase	D	Q9HCG7	Non-lysosomal glucosylceramidase (NLGase)
E	Q15014	Mortality factor 4-like protein 2	D	Q969S8	Histone deacetylase 10 (HD10) HDAC10
D	Q6ZW49	PAX-interacting protein 1	E	P31629	Transcription factor HIVEP2
C	Q969Q6	PPP2R3C subunit gamma	D	Q96P70	Importin-9
D	Q14498	RNA-binding protein 39 - RBM39	E	Q2M389	WASH complex subunit 7
D	O14924	Regulator of G-protein signaling 12 (RGS12)	D	Q8IY22	C-Maf-inducing protein (c-Mip)
E	Q99496	RNF2 E3 ubiquitin-protein ligase RING2	D	Q9Y2M5	Kelch-like protein 20
D	Q9NV70	Exocyst complex component Sec3	D	Q59HD9	Kelch-like 5 isoform 2 variant
D	O14893	Gem-associated protein 2 (Gemin-2) SIP1	E	Q14974	Importin subunit beta-1
D	O75093	Slit homolog 1 protein (Slit-1)	E	Q14696	LDLR chaperone MESD
E	O95295	SNARE-associated protein Snapin	D	Q96T76	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19)
E	P30626	Sorcin	D	Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4 (NAP-2)
D	P61764	Syntaxin-binding protein 1 - (Munc-18) STXB1	A	P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)
D	P22314	UBA1 Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	B	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
E	Q9UMX0	Ubiquilin-1 (Protein linking IAP with cytoskeleton 1)	D	Q14997	Proteasome activator complex subunit 4
D	Q96RU2	USP28 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	C	Q9P2R7	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta
E	Q9GZX5	Zinc finger protein 350	B	Q96I99	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta
			D	Q9Y490	Talin-1
			D	P29144	Tripeptidyl-peptidase 2 (TPP-2)
			D	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
			D	Q8NFA0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32
			A	Q7Z5K2	Wings apart-like protein homolog WAPAL
			D	O75152	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A
			D	Q14592	Zinc finger protein 460
			D	P09104	Gamma-enolase
			C	P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1

: Predicted Biological Score

From A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags interactions involving highly connected prey domains previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism.

Supplementary Table 1 (suite 6)

MT₁ (Y2H)

MT₁ Ctail: human differentiated brown adipocyte cell line (PAZ6) library

#	SwissProtID	Protein
D	P46379	Large proline-rich protein BAG6
D	Q13618	Cullin-3 (CUL-3)
D	P42892	Endothelin-converting enzyme 1
C	Q8WXI9	Transcriptional repressor p66-beta
D	Q9P2N2	Rho GTPase-activating protein 28
A	P08253	MMP-2 / 72 kDa type IV collagenase
A	O75970	MUPP1 / Multiple PDZ domain protein
D	Q969Q6	PP 2A regulatory subunit B ^γ subunit gamma
D	Q12923	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13
E	Q99496	E3 ubiquitin-protein ligase RING2 RNF2
E	O95295	SNARE-associated protein Snapin
D	Q4LDE5	Sushi, von Willebrand factor type A
D	Q14669	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
E	Q9UMX0	Ubiquilin-1 (Protein linking IAP with cytoskeleton 1)
D	P26640	Valine--tRNA ligase
E	P63104	14-3-3 protein zeta/delta
D	P35221	Catenin alpha-1 (Alpha E-catenin)
E	P21333	Filamin A

MT₁ Cter + i2 loop + i3 loop: human differentiated brown adipocyte cell line (PAZ6) library & rat hippocampus library

#	SwissProtID	Protein
D	Q7Z460	CLIP-associating protein 1
C	Q14573	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
D	P26022	Pentraxin-related protein PTX3
C	Q14157	Ubiquitin-associated protein NICE-4
D	Q70CQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
C	Q96IU4	Abhydrolase domain-containing protein 14B
D	P12814	Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform)
D	Q9Y2J4	Angiomotin-like protein 2
D	Q8TDY4	Arf-GAP with SH3 domain
D	P46379	Large proline-rich protein BAG6
D	Q53G59	Kelch-like protein 12 (CUL3-interacting protein 1)
D	Q13618	Cullin-3
D	Q9Y2R4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52
D	P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase
C	Q8WXI9	Transcriptional repressor p66-beta
D	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
D	Q7Z442	Polycystic kidney disease protein 1-like 2 (Polycystin-1L2)
A	O75970	MUPP1 / Multiple PDZ domain protein
D	Q9EPI6	Nasal embryonic LHRH factor
D	Q9Y6M5	Zinc transporter 1 (Solute carrier family 30 member 1)

: Predicted Biological Score

From A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags interactions involving highly connected prey domains previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism.

Supplementary Table 1 (suite 7)

MT₂ (Y2H)

MT₂ Ctail: human fetal brain library

#	SwissProtID	Protein
D	Q9H0C5	BTB/POZ domain-containing protein 1
D	Q63HM2	Pecanex-like protein C14orf135
D	Q9Y4F9	Protein FAM65B
D	Q9H9E3	COG complex subunit 4
D	Q96MW5	COG complex subunit 8
D	Q9UQE7	SMC protein 3
D	Q8TDJ6	Rabconnectin-3
D	Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
D	Q8NCM8	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
D	Q8N201	Integrator complex subunit 1 (Int1)
D	Q9Y4F3	Meiosis arrest female protein 1 (Limkain-b1)
D	Q5VT52	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2
D	Q8NEZ4	Histone-lysine N-methyltransferase MLL3
D	Q7Z3U7	Protein MON2 homolog
D	O15164	TIF1-alpha

MT₂ Ctail: human differentiated brown adipocyte cell line (PAZ6) library

#	SwissProtID	Protein
D	P12814	Alpha-actinin-1
D	Q86X54	AP1B1 protein
D	Q9UPM8	AP-4 complex subunit epsilon-1
D	Q07960	Rho GTPase-activating protein 1
E	P14209	CD99 antigen
D	Q9Y6N1	COX11
D	P55060	Exportin-2
B	Q9UH73	Transcription factor COE1
B	P02792	Ferritin light chain
B	P30101	Protein disulfide-isomerase A3
B	Q8TEX9	Importin-4 (Imp4)
D	Q14573	IP3 receptor isoform 3
D	Q9P2N2	Rho GTPase-activating protein 28
D	Q9HB75	p53-induced protein
D	P08253	MMP2 7 type IV collagenase
D	Q9Y217	Myotubularin-related protein 6
D	P78527	DNA-PK catalytic subunit
D	P48556	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8
D	O95980	hRECK(Suppressor of tumorigenicity 15 protein)
D	P36956	Sterol regulatory element-binding protein 1
D	Q9BTW9	Tubulin-specific chaperone D
B	Q9C0B7	calphoglin
D	Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
D	Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like (NICE-4)
E	Q9UHD9	Ubiquilin-2 (Chap1)
E	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
D	Q70CQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
A	P35221	Catenin alpha-1 (Alpha E-catenin)

MT₂ i2 loop: human differentiated brown adipocyte cell line (PAZ6) library

#	SwissProtID	Protein
D	Q9NRR5	Ubiquilin-4 (A1Up)
D	Q7Z460	CLIP-associating protein 1
B	Q13618	Cullin-3 (CUL-3)
D	Q14674	Separin
D	P63092	G(s) subunit alpha isoforms short
D	P32242	Homeobox protein OTX1
D	Q12874	Splicing factor 3A subunit 3 (SAP 61)
A	Q9Y490	Talin-1
D	Q7Z4K8	Tripartite motif-containing protein 46
D	Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12

: Predicted Biological Score

From A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags interactions involving highly connected prey domains previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism.

Supplementary Table 1 (suite 8)

MT₂ (Y2H)

MT₂ Ctail: rat hippocampus library

MT₂ i3 loop: human differentiated brown Adipocyte cell line (PAZ6) library

#	SwissProtID	Protein
D	Q6AYS7	Aminoacylase-1A (ACY-1A)
D	Q02759	Arachidonate 12-lipoxygenase
D	P62944	AP-2 complex subunit beta
D	O35413	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2
D	Q6MG49	BCL2-associated athanogene 6
C	B2DD29	Serine/threonine-protein kinase BRSK1
D	D3ZML2	Serine/threonine-protein kinase BRSK2
D	Q5U302	Catenin
D	D4ABM3	Protein Daam1
D	P38650	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
D	Q3ZAV8	Enhancer of mRNA-decapping protein 4
D	Q1RP76	ZH8 protein
D	P12785	Fatty acid synthase
D	P18265	Glycogen synthase kinase-3 alpha
D	Q497C1	Thyroid hormone receptor interactor 12
B	Q9QY78	IKK-beta
D	Q99J82	Integrin-linked protein kinase
D	D4A857	Protein Ipo9
D	Q6DGF2	Enthoprotin
D	D4A510	Protein Smarcc2
D	Q99068	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein
D	Q5U2Z3	Nucleosome assembly protein 1-like 4
D	Q9EPI6	Nsmf
D	D3ZS72	Protein Prex1
D	P35355	Prostaglandin G/H synthase 2
B	Q2TL32	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
B	F1LM17	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123
D	Q9Z2Q1	Protein transport protein Sec31A
D	D3ZER6	Protein Tnpo2
D	Q9JJP9	Ubiquilin-1 (PLIC-1)
D	D4AA63	Protein Ubqln2 (Ubiquilin 2)
D	D5MTG9	UBR1 protein
D	Q62671	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5
D	D3ZZ62	Exportin Nuclear export receptor for tRNAs
D	Q6XDA0	Erythroid spectrin beta

#	SwissProtID	Protein
D	P08133	Annexin A6
D	Q07817	Bcl-2-like protein 1 (Bcl2-L-1)
D	Q9BXX5	Bcl-2-like protein 13
D	Q13042	Cell division cycle protein 16 homolog
D	P55287	Cadherin-11
D	P55290	Cadherin-13
C	P55283	R-cadherin (retinal) (CDH4)
D	P55060	Exportin-2
B	Q13618	Cullin-3 (CUL-3)
D	Q03001	Dystonin
D	Q14152	eIF3a
D	Q9NV11	Fanconi anemia group I protein (Protein FACI)
D	P21333	Filamin-A
A	Q12841	Follistatin-related protein 1
D	P12081	Histidine--tRNA ligase
D	Q9ULT8	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1
D	Q96P70	Importin-9 (RanBP9)
A	Q9UPN3	MACF1 Microtubule-actin cross-linking factor 1
D	P78527	DNA-PK catalytic subunit
D	O75150	E3 RNF40
D	Q9UPN7	SAPS1
D	Q9H792	Tyrosine-protein kinase SgK269
D	Q96GM5	SWI/SNF complex 60 kDa subunit
D	Q8WXH0	Nesprin-2
D	Q96FV9	THO complex subunit 1 (Tho1)
D	Q9BSI4	TERF1-interacting nuclear factor 2
D	Q14669	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
D	O60266	Adenylate cyclase type 3
D	Q9BWW8	Apolipoprotein L6
D	Q96HD1	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 1
D	Q9H8M9	Protein FAM176A
D	P36941	LTBR Tumor necrosis factor receptor
C	Q5JRA6	Melanoma inhibitory activity protein 3
C	Q6ZMI0	Protein phosphatase PPP1R21
D	Q96GF1	E3 RNF185
D	F5H066	Solute carrier family 12 member 4
A	Q9Y6M5	Zinc transporter 1 (ZnT-1)
B	Q13433	Zinc transporter ZIP6
D	O60337	TEB-4 E3 ubiquitin-protein ligase
D	P17861	X-box-binding protein 1 (XBP-1)
C	Q12772	Transcription factor 2 (SREBP-2)
B	D3K175	Sodium bicarbonate cotransporter 3

: Predicted Biological Score

From A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags interactions involving highly connected prey domains previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism.

Supplementary Table 2

% Cov	Accession #	Name	RATIO (1AM/1PM)	P value (1AM/1PM)
17,5	IPI00675855.2	Nefh MKIAA0845 protein (Fragment)	1,52	0,022
26,1	IPI00127942.4	Dstn Destrin	1,50	0,054
17,3	IPI00109033.3	Fam54b Isoform 1 of Protein FAM54B	1,42	0,039
15	IPI00117754.1	Sdf4 Isoform 1 of 45 kDa calcium-binding protein	1,34	0,013
15,9	IPI00874456.1	Dld Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	0,62	0,058
10,9	IPI00469548.2	Syn2 Isoform IIa of Synapsin-2	0,56	0,015
7,5	IPI00651909.1	Slc4a8 Putative uncharacterized protein	0,41	0,038

SUPPLEMENTARY TABLE 2: Quantitative analysis of proteins interacting with the MT₁ Cter in mouse brain lysates at different circadian times. Brain lysates were recovered during the night (1 AM) and the day (1 PM) and incubated with the His₆-tagged MT₁ Cter peptide bound to Ni-NTA beads. Recovered proteins were labeled according to the iTRAQ procedure and analyzed by mass spectrometry. Proteins significantly enriched at 1AM are highlighted in green, proteins significantly enriched at 1PM in orange.

Discussion de l'article 2

Cet article décrit l'interaction entre le récepteur de la mélatonine MT₁ et plusieurs partenaires présynaptiques : le canal calcique dépendant du voltage Ca_v2.2, SNAP25, Munc-18 et synapsine I et II. La caractérisation de ces interactions a permis de valider que MT₁ peut présenter une localisation axonale où il interagit avec la machinerie de l'exocytose. De plus, le lien fonctionnel entre MT₁ et le canal calcique Ca_v2.2 vient étayer cette hypothèse.

1) Partie I : l'interactome de MT₁ vs l'interactome de MT₂

Les récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂ présentent près de 60 % d'homologie de séquence au niveau de la protéine entière. Dans l'introduction de ce rapport, nous avons décrit que ces récepteurs présentent les mêmes motifs consensus des RCPG tel que le motif NRY et affichent des longueurs de domaines cytoplasmiques quasi-identiques.

L'utilisation des quatre techniques : TAP, la chromatographie d'affinité, le Y2H et le MYTH, a permis d'identifier 219 partenaires pour MT₁ et 220 partenaires pour MT₂. Parmi ces protéines, 63 sont communs aux deux récepteurs. De manière intéressante, la fraction des partenaires communs est constante (environ 20 à 30%) au sein de chaque technique, ce qui démontre la spécificité des partenaires identifiés à la séquence peptidique de MT₁ et à celle de MT₂ qui présentent elles-mêmes une forte homologie de séquence.

En ce qui concerne les fonctions des partenaires de chaque récepteur, le classement selon la désignation G.O (Gene Ontology) donne lieu à une distribution similaire. Le groupe le plus représenté est « cellular fate and organisation » qui correspond aux différentes protéines du cytosquelette, des phosphatases, des kinases et des molécules de signalisation.

1.1) L'analyse des interactomes des récepteurs de la mélatonine

D'un point de vue général, les récepteurs de la mélatonine interagissent avec plusieurs protéines chaperonnes ubiquitaires impliquées dans le processus de maturation telles que les protéines de la famille hsp70 (GRP75 pour MT₁ et GRP78 pour MT₂), la calréticuline, la calnexine et les protéines disulfures isomérases (Määttä et al ; 2010).

MT₁ et MT₂ interagissent aussi avec plusieurs régulateurs de l'ubiquitination: RNF2, RNF41, RNF123, NICE-4, TRIP12, UBA1, UBR4 et avec différentes isoformes de culline. Ces protéines régulent le trafic, la signalisation et la dégradation des RCPG (Wojcikiewicz et al ; 2004) (Hicke et al ; 2003).

L'interaction des RCPG avec les protéines du cytosquelette témoignent d'une part que ces récepteurs régulent la morphologie et la dynamique cellulaire, et d'autre part que les RCPG subissent une régulation par les éléments du cytosquelette ; ce qui rend les récepteurs dépendants des changements cellulaires. En effet, Jarzynka *et al.* ont démontré que l'activation du récepteur MT₁ induit le réarrangement du réseau des microtubules dans les cellules CHO. Cependant, la dépolymérisation des microtubules par le colcémide potentialise l'activation de la PKC de manière sensible à la PTX, suite à la stimulation par la mélatonine (Jarzynka *et al.* ; 2006). A cet égard, les peptides Cter de MT₁ et de MT₂ recrutent de multiples isoformes de la tubuline à partir du lysat de cerveau de souris.

MT₂ recrute la taline. La taline est une protéine ubiquitaire du cytosquelette impliquée dans les phénomènes d'adhérence cellulaire ; elle est aussi connue pour être un centre intégrateur de la signalisation des intégrines vers le réseau d'actine (Das *et al.* ; 2014). Le peptide Cter de MT₂ précipite plusieurs isoformes de la clathrine, tandis que MT₁ semble lier la dynamine1 qui est impliquée dans l'endocytose (dépendant très souvent de la dynamine et de la clathrine) et dans le recyclage des vésicules synaptiques au niveau de la zone active (Takei *et al.* ; 1996).

Par ailleurs, MT₂ s'associe avec les protéines MAP-2 et MAP-1C (MAP pour Microtubules Associated Protein). A ce sujet, la purification et l'identification des partenaires du peptide Cter de mGluR4 investies par Moritz *et al.* montrent que l'isomère MAP-1a/b ainsi que MAP-6 (connu sous le nom de la protéine STOP) interagissent avec le récepteur présynaptique mGluR4. Aussi, MAP-1b est responsable de l'adressage axonal du récepteur mGluR4 au niveau des synapses excitatrices (Moritz *et al.* ; 2009).

Pour ce qui est des molécules de signalisation, la technique TAP a notamment permis d'identifier plusieurs isoformes de la protéine Gi, ce qui est en adéquation avec les données de signalisation des récepteurs MTR (Brydon *et al.* ; 1999). La purification TAP a été appliquée en situation de non-stimulation, ce qui montre que MTR pré-couplent la protéine G en absence de ligand. Cette observation suggère l'existence d'une activité constitutive qui a en effet, été observée pour ces récepteurs (Roka *et al.* ; 1999) (Devavry *et al.* ; 2012) et qui conforte notre résultat de l'inhibition constitutive de Ca_v2.2 par MT₁ en l'absence de ligand.

Par ailleurs, plusieurs molécules de signalisation ont été identifiées pour les deux récepteurs : MAP3K1, MAPK10 (JNK3), MAPK6 (ERK4), AKT-3 et les protéines kinase PKC β, ζ, η, γ) entre autres. Cependant, MT₁ ne semble pas lier la camKinase ni la calmoduline, deux protéines partenaires de plusieurs RCPG (Bockaert *et al.* ; 2003).

La re-sensibilisation de plusieurs RCPG dépend de leur déphosphorylation dans les endosomes. Aussi, MT₁ interagit avec plusieurs phosphatases comme PP2B et PP-1γ, alors que MT₂ recrute PP2A et PP2B. Par ailleurs, les phosphatases peuvent également avoir des rôles dans la

régulation de la signalisation. Par exemple, PP2A se lie au récepteur mGluR5 et antagonise la signalisation ERK1/2 de la voie MAPK (Mao et al ; 2005b).

Les deux récepteurs MTR interagissent avec plusieurs RhoGAP : RhoGTPase activating protein 1, 19 et 28. Ces protéines sont les principaux régulateurs des petites RhoGTPases ainsi que des modulateurs de la différenciation cellulaire, de l'organisation du cytosquelette et du développement neuronal (Moon et al ; 2003). Parmi cette famille de protéines, notre étude montre que le récepteur MT₁ interagit avec Rab-10 et Rab-6, tandis que MT₂ couple Rab-3. En plus de Rab-10, MT₁ interagit avec plusieurs isoformes de la myosine, ce qui n'est pas le cas pour MT₂. A ce sujet, l'interaction entre la myosine5 et la protéine vésiculaire Rab-10 est importante pour les cellules polarisées et en particulier pour le développement et le transport axonal au niveau du neurone (Liu et al ; 2013). Les protéines Rab sont connues pour réguler la distribution cellulaire des phosphatases (Mochizuki et al ; 2013) et MT₂ couple par exemple la PI3-phosphatase myotubularin related protein 6 qui joue un rôle important dans le transport vésiculaire. Par ailleurs, d'autres cibles cellulaires des protéines RhoGTPase ont également pu être identifiées pour MT₁ et pour MT₂ comme les protéines PAK (p21 Activated Kinases).

Enfin, on peut remarquer que les récepteurs MTR interagissent avec plusieurs transporteurs. Ceci suggère un rôle dans la régulation des flux ioniques et des potentiels de membrane.

(MT₁ : Dopamine transporter DAT, Zinc transporter 1, electrogenic sodium bicarbonate transporter, facilitated glucose transporter GLUT3, ATP synthase H⁺ transporting *mitochondrial*, membrane magnesium transporter 1)

(MT₂ : Sodium/potassium-transporting ATPase subunit α -3, ATPase H⁺ transporting *lysosomal*, activators of dibasic and neutral amino acid transport 2, Facilitated glucose transporter GLUT3, Zinc transporter 1, Zinc transporter ZIP6, Solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter 7).

Cette analyse ne se veut pas exhaustive pour tous les partenaires identifiés, mais elle montre que les récepteurs interagissent avec une série de protéines soupçonnées comme les protéines impliquées dans la maturation, la signalisation et le trafic intracellulaire des récepteurs. En même temps, elle donne lieu à de nouvelles pistes intéressantes comme les protéines présynaptiques (voir article 2) et le transporteur de la dopamine (voir article 3).

1.2) L'importance du domaine Cter dans les interactions RCPG-GIP

Le domaine Cter des RCPG constitue une plateforme pour le recrutement de plusieurs partenaires régulateurs (Bockaert et al ; 2003). Par exemple, la majorité des protéines identifiées dans notre étude avec le MYTH interagissent avec le domaine Cter. Cela justifie pleinement l'utilisation du peptide Cter comme appât pour la chromatographie d'affinité. Cependant, les autres domaines internes comme la boucle i3 participent également dans le recrutement de GIP (Maurice et al ; 2011).

La queue Cter de certains RCPG contient un ligand PDZ reconnu par plusieurs protéines à domaines PDZ et qui peuvent rentrer en compétition pour la liaison du même récepteur (Bockaert et al ; 2004).

L'identification des partenaires des récepteurs de la sérotonine a mis en évidence des interactions avec plusieurs protéines à domaine PDZ ainsi que des protéines d'échafaudage : shank, Mint, PSD95, NHERF, les protéines MANUC, Veli3, Dlg3, la CamKinase et PICOT entre autres (Bécamel et al ; 2002a) (Bécamel et al ; 2002b). De manière intéressante, bien que MT₁ présente un domaine PDZ, aucune de ces protéines n'a pu lui être identifiée par spectrométrie de masse. Cependant, dans le cadre de la validation de la technique de chromatographie d'affinité sur le Cter de MT₁, un western blot pour PSD95, MUPP1 et eNOS a été réalisé et ces protéines se sont avérées interagir avec MT₁ mais pas avec MT₂ (Maurice et al ; 2008). Le récepteur 5-HT_{2C} interagit avec la protéine MUPP1 qui a été identifiée dans un crible double hybride. L'interaction entre les deux protéines se trouve altérée suite à la stimulation par le ligand sérotoninergique et la phosphorylation de la sérine⁴⁵⁸ (Parker et al ; 2003). MUPP1 a également été identifiée par crible double hybride pour le récepteur MT₁. Notre laboratoire a rapporté que l'état d'activation du récepteur par le ligand n'a aucune influence sur cette interaction, sans doute parce que le résidu important dans le recrutement de MUPP1 au niveau du Cter de MT₁ est le résidu valine du motif DSV. Aussi, la perturbation de l'interaction entre MT₁ et MUPP1 ne semble pas influencer la distribution cellulaire du récepteur, mais altère fortement la signalisation dépendante de la protéine Gi (Guillaume et al ; 2008).

En résumé, l'utilisation du peptide Cter constitue un moyen pertinent pour identifier une grande partie des protéines régulatrices des RCPG.

2) Partie II : L'interaction des RCPG avec les protéines présynaptiques

Dans cette partie, nous allons focaliser la discussion sur des connaissances générales en terme de localisation et de fonction de RCPG au niveau présynaptique, avec une attention particulière aux protéines identifiées dans notre étude.

2.1) L'interaction de MT1 et des RCPG avec des partenaires présynaptiques

(I)- Dans cette étude, nous avons mis en évidence le fait que tous les partenaires synaptiques tels que Ca_v2.2, SNAP25, synapsine I et II ainsi que Munc-18, soient préférentiellement recrutés au niveau du domaine Cter de MT₁ et plus précisément au niveau de l'extrémité proximale de ce domaine appelée l'hélice 8. Les figures 2A et 2B de l'article montrent que le peptide 43 peut recruter Munc-18 et qu'il chevauche avec la fin du peptide H8. Un autre point à remarquer est l'interaction de Munc-18 avec le Cter de MT₂ (cependant plus faiblement comparé avec MT₁). L'analyse de ces profils d'interaction laisse penser que le site de reconnaissance de Munc-18 par le Cter de MT₁ est décalé entre H8 et le peptide 43 en comparaison avec les sites de recrutement des autres partenaires comme SNAP25 et MUNC-18.

Dans la littérature, Ca_v2.2 est connu pour avoir un lien fonctionnel avec plusieurs RCPG. En ce qui concerne les protéines du complexe SNARE (à notre connaissance) seuls deux récepteurs interagissent avec ces protéines: les autorécepteurs muscariniques de l'acétylcholine dont le récepteur M2 (Linial et al; 1997) (Ilouz et al; 1999) (Borroto-Escuela et al; 2011) et le récepteur mGluR4 qui présente une localisation majoritairement présynaptique (Ramos et al ; 2012).

M2 interagit avec SNAP25, syntaxine I et avec la protéine vésiculaire synaptobrevine entre autres. De son côté, mGluR4 immunoprécipite avec SNAP25, NSF, syntaxine, synapsine I, synapsine II, Munc-18 et d'autres partenaires synaptiques à partir d'un lysat de cerveau de rat. De manière intéressante, Ramos *et al.* montrent que la synapsine, la syntaxine et Munc-18 interagissent au niveau du domaine Cter et de la boucle i2 du récepteur mGluR4, ce qui rejoint notre résultat. Par contre, les observations faites sur les récepteurs muscariniques de l'ACh sont plus compliquées. En effet, l'interaction de M2 avec SNAP25 et avec la syntaxine serait dépendante du voltage : les auteurs montrent que la dépolarisation membranaire perturbe l'interaction des protéines présynaptiques avec le récepteur. La perturbation de cette interaction coïncide avec l'étape de fusion membranaire et avec le relargage des neurotransmetteurs. Linial *et al.* expliquent alors que la dépolarisation entraîne une baisse d'affinité du ligand pour M2, mais que la présence du ligand consolide l'interaction de SNAP25 et de syntaxine avec M2 (Linial et al ; 1997) (Ilouz et al ; 1999).

Il est intéressant de noter qu'aucune de ces études ne fait état d'une co-immunoprécipitation entre le récepteur et les protéines présynaptiques dans des cellules transfectées (bien qu'une co-localisation entre Munc-18 et mGluR4 a été mise en évidence dans les cellules HEK293). A cet égard, l'échec de l'immunoprécipitation de SNAP25, Munc-18 et synapsine II avec MT₁ et avec MT₂ dans cet article laisse place à plusieurs hypothèses : (i) l'interaction peut dépendre du contexte cellulaire et de la présence des organites caractéristiques des synaptosomes telles que les vésicules synaptiques (ii) l'interaction avec ces partenaires présynaptiques peut se faire de manière indirecte et que la protéine

faisant le lien est absente dans les cellules HEK293. Un exemple de ces protéines peut être RIM, rab3 et synaptobrevine qui interagissent directement ou indirectement avec le canal calcique $Ca_v2.2$, quelques RCPG et avec le complexe SNARE (iii) cette interaction dépendrait de paramètres physiques donnés comme le potentiel membranaire à l'exemple du récepteur M2.

(II)- En plus des partenaires caractérisés dans l'article, MT_1 interagit également avec la protéine Snapin (Y2H : Cter). Cette protéine est un acteur important dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs et interagit directement avec SNAP25 (tSNARE) et avec la synaptotagmine (vSNARE). Snapin est notamment requise pour le recyclage vésiculaire. Aussi, les souris KO pour la Snapin présentent des altérations importantes au niveau de la libération des neurotransmetteurs ainsi qu'un déséquilibre entre les différents pools de vésicules synaptiques et l'invalidation du gène encodant la Snapin chez la drosophile est létale (Yu et al ; 2013) (Tian et al ; 2005). A noter que d'autres protéines présentes dans le compartiment présynaptique tels que la kinésine, la dynamine, 14-3-3, PTPRD, et le transporteur DAT, font partie de l'interactome de MT_1 soutenant l'hypothèse de la localisation présynaptique de ce récepteur.

2.2) L'interaction fonctionnelle entre les RCPG, $Ca_v2.2$ et les protéines présynaptiques

$Ca_v2.2$ est un membre de la famille des canaux calciques activés par une modification du potentiel électrique de membrane appelés VGCCs (pour Voltage-Gated Calcium Channels). Il existe cinq types de canaux calciques: L ($Ca_v1.x$), P/Q ($Ca_v2.1$), N ($Ca_v2.2$), R ($Ca_v2.3$) et T ($Ca_v3.x$). Ces canaux sont classés selon leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques, mais aussi selon les caractéristiques des flux calciques engendrés. La nature du flux est notamment déterminée par les isoformes des cinq sous-unités qui les composent (Figure 23). A ce titre, $Ca_v2.2$ est un canal de type N qui génère un courant calcique relativement soutenu (N pour Neither transient, Nor long lasting) et il appartient aux canaux HVA (High Voltage Activated) qui sont activable à haut voltage (Catterall et al, 2005).

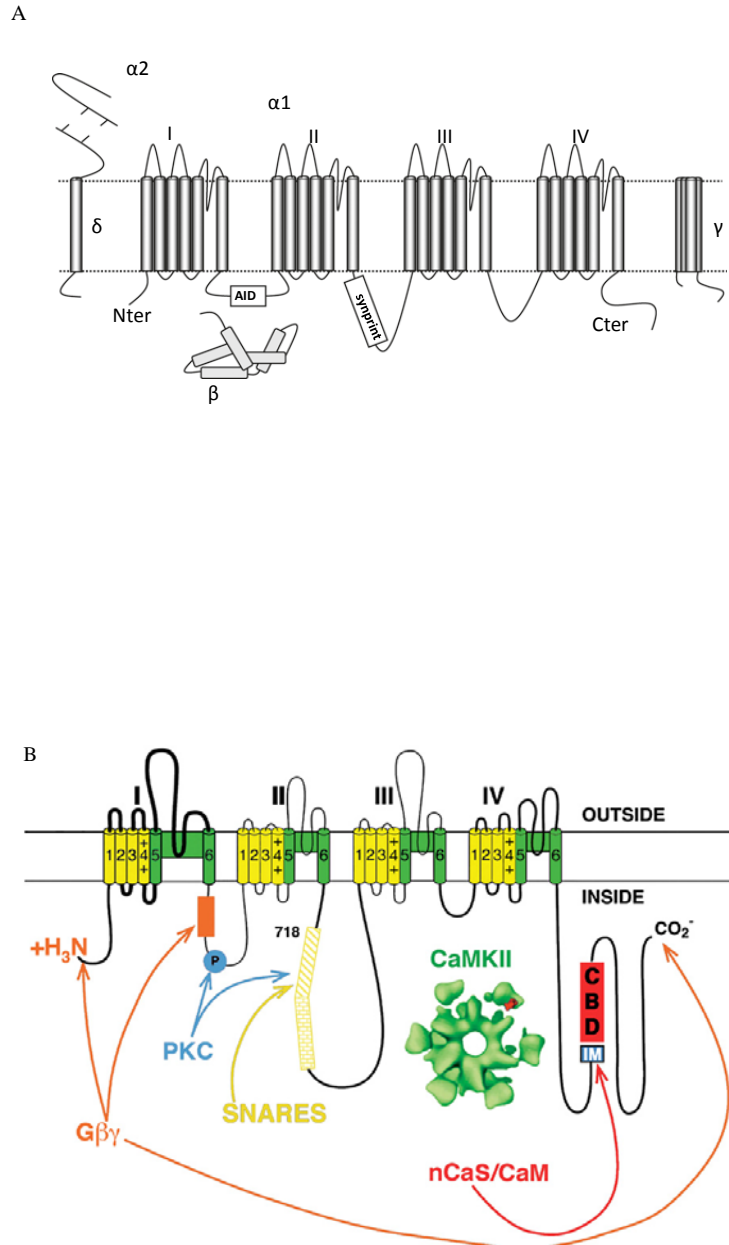


Figure 23 : A) Topologie membranaire des sous-unités de $Ca_v2.2$ à l'état natif. la sous-unité principale α est associée à plusieurs unités accessoires *in vivo*. Ces protéines accessoires affectent l'expression du récepteur ainsi que ses fonctions. Seule la sous-unité β est cytosolique, et la sous-unité α de $Ca_v2.2$ est représentée par l'isomère B caractéristique des canaux de type N.

B) schéma représentant les sites d'interaction des partenaires de la sous-unité α de $Ca_v2.2$. Adapté de (Catterall et al ; 2008) (Kisilevsky et al ; 2008).

Les canaux calciques représentent la principale voie d'entrée de calcium dans la cellule. Cependant, $Ca_v2.2$ est exclusivement neuronal en comparaison avec les autres canaux. $Ca_v2.2$ se localise principalement au niveau des terminaisons présynaptiques des synapses centrales et périphériques où il régule la plasticité synaptique et le relargage des neurotransmetteurs. Par ailleurs, il s'exprime aussi dans les dendrites et au niveau des cellules originaires du neuroderme embryonnaire comme les cellules β -pancréatiques qui sont caractérisées par une activité sécrétoire importante (Yang et al 2006) (Westenbroek et al ; 1992).

2.2.1) L'interaction entre $Ca_v2.2$ et les protéines présynaptiques

$Ca_v2.2$ possède un motif de recrutement spécifique pour les protéines présynaptiques appelé le domaine Sinprint (situé entre les blocs membranaires II et II) (Figure 23). L'interaction du complexe SNARE au niveau de ce motif est essentielle pour le relargage du neurotransmetteur (Leveque et al ; 1994). Au niveau de ce domaine, Munc-18 peut interagir avec le canal mais sans conséquence fonctionnelle sur l'état d'activation de $Ca_v2.2$. Cependant, elle semble intervenir dans le co-transport du complexe $Ca_v2.2$ /SNARE vers la zone active (Chan et al ; 2007b).

Munc-18 est une protéine soluble qui lie la syntaxine (d'où son nom Syntaxin-Binding Protein). La syntaxine I est connue pour inhiber la probabilité d'ouverture des canaux calciques $Ca_v2.2$. (Stanley et al ; 2003), mais la palmitoylation dynamique du canal le protège de cette inhibition (Chan et al ; 2007). La syntaxine interagirait également au niveau du domaine Sinprint de la sous-unité α du canal (Sheng et al ; 1994).

La synapsine II ne fait pas partie du complexe moléculaire SNARE. Elle interagit avec $Ca_v2.2$ et exerce un effet plutôt inhibiteur sur la libération du neurotransmetteur, sans doute par compétition avec les SNARE pour la liaison au niveau de Sinprint (Medrihan et al ; 2013).

De manière intéressante, les données bibliographiques montrent que $Ca_v2.2$ est capable d'interagir directement avec les vésicules synaptiques via son extrémité Cter, bien qu'une interaction indirecte est également envisageable par le biais de la protéine à domaine PDZ RIM (Rab3 Interacting Molecule) qui peut lier le canal à la protéine rab3 vésiculaire (Wong et al ; 2010) (Wong et al ; 2014).

2.2.2) L'adressage présynaptique de $Ca_v2.2$

Le canal $Ca_v2.2$ interagit avec les protéines SNARE par le biais du motif Synprint. Aussi, la découverte d'un variant d'épissage au niveau de cette région a mis en évidence le fait que le canal mutant dépourvu de Synprint ne lie pas le complexe SNARE et n'est pas adressé vers le compartiment

présynaptique (Szabo et al ; 2006) (Kaneko et al ; 2002). Ceci indique que l'adressage présynaptique du canal calcique est facilité par l'interaction avec le complexe SNARE de manière à ce que l'acheminement du complexe SNARE vers la zone active co-transporte $Ca_v2.2$. Par ailleurs, l'interaction du domaine Cter de $Ca_v2.2$ avec les protéines à domaines PDZ CASK et Mint, peut également faciliter l'adressage du canal vers la synapse.

2.2.3) L'interaction des RCPG, de la protéine G et de ses régulateurs avec $Ca_v2.2$

Dans la littérature, plusieurs récepteurs sont connus pour inhiber $Ca_v2.2$ comme les récepteurs opioïdes (Seward et al ; 1991), les récepteurs de la dopamine D2 (Cabrera-Vera et al ; 2004), les récepteurs GABA_BR (Menon-Johansson et al ; 1993) et le récepteur de la nociceptine ORL1 (Altier et al ; 2006) (Beedle et al ; 2004).

D'une part, la sous-unité α du canal calcique présente deux variants d'épissages e37a et e37b aussi répandus l'un que l'autre. Ces deux variants sont conservés chez l'homme, la souris, le rat, le macaque et chez le chien et présentent des différences de quelques acides aminés au niveau de la partie Cter. D'autre part, il est connu que les récepteurs couplés aux protéines Gi/o sont capables d'inhiber les canaux $Ca_v2.2$. Cette inhibition se fait généralement par trois mécanismes : (i) les récepteurs couplés à la protéine Gi/o inhibent le canal de manière sensible à la PTX. Cette inhibition dépend de la libération des protéines $G\beta\gamma$ et constitue le type de modulation de $Ca_v2.2$ le plus répandu chez les RCPG (Altier & Zamponi ; 2008), (ii) les RCPG peuvent médier une inhibition sensible également à la PTX mais qui induit la phosphorylation du résidu Y1747 présent seulement au niveau du variant e37a. La phosphorylation de ce résidu par la Src tyrosine kinase pp60c-src activée par le RCPG est à l'origine de l'inhibition du canal calcique (Raingo et al ; 2007) (iii) enfin, les RCPG couplés à Gq/11 peuvent également inhiber $Ca_v2.2$ via l'activation de la PLC mais ce dernier cas est moins fréquent (Delmas et al ; 2005) (Kammermeier et al ; 1999).

Le mécanisme d'inhibition de $Ca_v2.2$ par les sous-unités $G\beta\gamma$

Les protéines $G\beta\gamma$ libérées suite à l'activation du RCPG peuvent interagir avec $Ca_v2.2$ sur plusieurs motifs (Figure 23) : (i) $G\beta\gamma$ peut se lier au niveau du domaine AID (Alpha Interaction Domain) qui constitue le site de reconnaissance de la sous-unité β du canal calcique avec la sous-unité α . Sachant que la sous-unité β détermine en partie les propriétés d'ouverture du canal, le recrutement de $G\beta\gamma$ à ce niveau perturbe alors les fonctions de $Ca_v2.2$ (ii) $G\beta\gamma$ peut aussi se lier au niveau du domaine Nter et Cter du $Ca_v2.2$ et interfèrent dans la liaison du canal avec différentes protéines régulatrices (Li et al ; 2004b) (iii) enfin, l'interaction de $G\beta\gamma$ sur le motif Sinprint perturbe l'arrimage du complexe $Ca_v2.2$, des SNARE et de la vésicule synaptique au niveau de la zone active. Il en résulte alors une inhibition du relargage des neurotransmetteurs. Ceci a été notamment validé par

l'observation qu'un canal muté au niveau du domaine Sinprint entraîne une diminution des phénomènes sécrétoires au niveau des cellules phéochromocytaires de souris (Harkins et al ; 2004) (Yoon et al ; 2007) (Tedford & Zamponi ; 2006).

Hormis ces différents mécanismes d'inhibition de $Ca_v2.2$ par les RCPG, le récepteur peut aussi se lier directement au canal. C'est le cas du récepteur D2 qui hétérodimérise avec $Ca_v2.2$ pour ainsi moduler son expression à la surface (Kisilevsky et al ; 2008b).

Notre étude indique que MT_1 interagit avec $Ca_v2.2$ dans les cellules HEK293. En l'absence des protéines synaptiques capables de faire le lien entre MT_1 et le canal, l'expérience d'immunoprécipitation dans les cellules HEK293 suggère que le récepteur MT_1 peut se lier directement à $Ca_v2.2$, de la même manière que le récepteur D2.

En outre, les régulateurs de la protéine G tels que les RGS et les AGS peuvent être recrutés au niveau du canal calcique afin de moduler son activité, ce qui constitue un niveau de régulation supplémentaire (Richman et al ; 2005) (Schiff et al ; 2000) (Cabrera-Vera et al ; 2004) (Thapliyal et al ; 2008). Par ailleurs, il est intéressant de noter que le Cter de MT_1 ne lie pas uniquement $Ca_v2.2$, mais également la protéine RGS20 (Maurice et al ; 2010) ; et l'on ne sait en fait pas si RGS20 et $Ca_v2.2$ peuvent se lier simultanément à un seul protomère de récepteur MT_1 ou à un dimère.

3) Partie III : Les arguments en faveur d'une localisation synaptique des récepteurs de la mélatonine

3.1) La comparaison de l'interactome de MTR avec l'interactome des protéines présynaptiques

Une des manières de savoir si les récepteurs MTR se localisent au niveau présynaptique est le recours à la comparaison de l'interactome de ces récepteurs avec celui de protéines ou de structures connues pour être présynaptiques. De plus, la comparaison du protéome de $Ca_v2.2$ avec celui de la zone active avait déjà permis de valider la présence de $Ca_v2.2$ au niveau de ce compartiment (Müller et al ; 2007) (Figure 24).

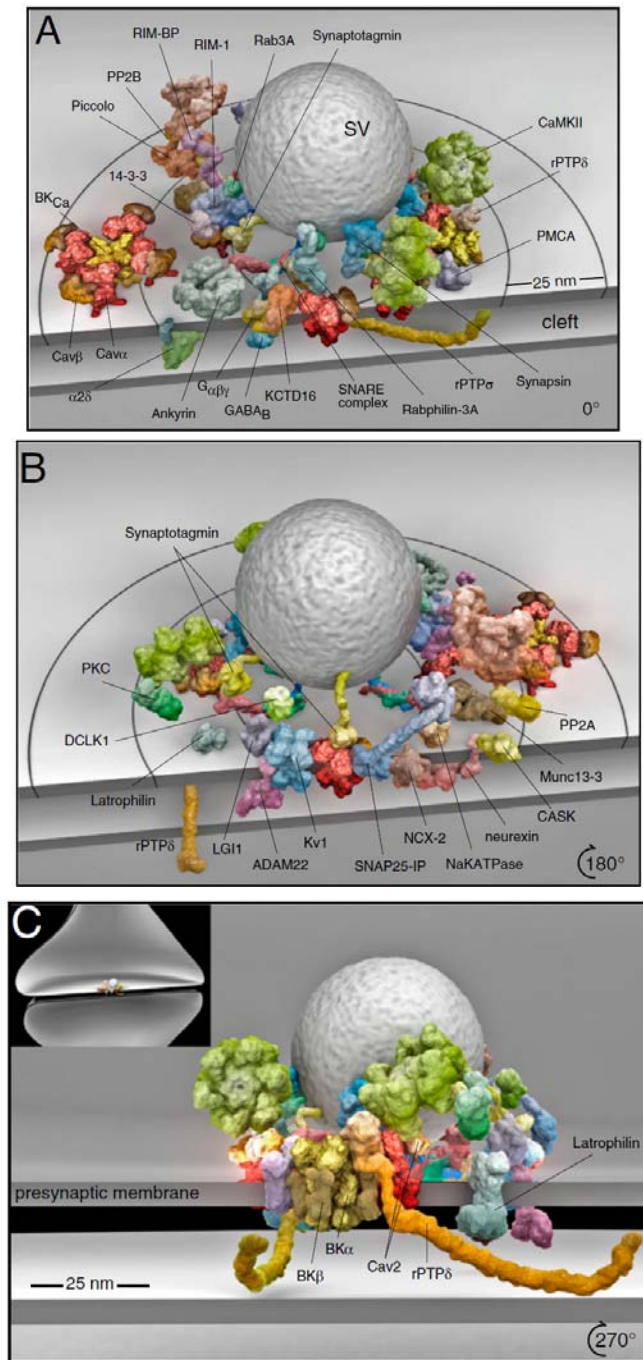


Figure 24 : Modélisation moléculaire du micro-environnement du canal Ca_v2.2 au niveau de la zone active. (Muller et al ; 2010).

En effet, les protéomes de la zone active (Volkandt. M; 2012) (Morciano et al ; 2009) (Weingarten et al ; 2014), de la vésicule synaptique (Barth et al ; 2012) (Burré & Volkandt ; 2007), des synaptosomes (Bai & Witzmann ; 2007, revue), du complexe SNARE (Klemmer et al ; 2009) et de Ca_v2.2 (Khanna et al ; 2007) (Müller et al ; 2007) sont décrits dans plusieurs publications.

De même, plusieurs équipes ont investi l'identification du protéome de la fraction post-synaptique (Cheng et al ; 2006) (Yoshimura et al ; 2004).

Le résultat de cette comparaison montre que le protéome de MT₁ et de MT₂ présente plusieurs similitudes avec tous les protéomes présynaptiques sus-cités : SNAP25, synapsine, dynamine, les petites GTPase, Myosine, 14-3-3, snapin, DAT, Ca_v2.2, Munc-18. Par là même, le protéome de MT₁ compte très peu de protéine d'achaffaudage de la densité post-synaptique. De plus, les expériences de radiolisation montrent que les récepteurs MTR se localisent au niveau des synaptosomes comme démontré dans notre étude. Le protéome des synaptosomes inclue en fait celui des vésicules synaptiques et celui de la zone active. De ce fait, MT₁ peut être localisé au niveau de la zone active. En outre, Ca_v2.2 est une protéine qui fait partie de la machinerie du relargage des neurotransmetteurs avec le complexe SNARE. Aussi, le protéome des SNARE et de Ca_v2.2 est très proche. Le fait que MT₁ interagisse fonctionnellement avec Ca_v2.2 dans les cellules en culture constitue un élément en faveur de leur proximité *in vivo* et un argument supplémentaire pour la présence de MT₁ au niveau de la zone active.

Cependant, on peut noter l'absence (dans l'interactome de MTR) de certaines protéines retrouvées par exemple dans les protéomes de Ca_v2.2 et de la vésicule synaptique comme SV2 et synaptobrevine. Par ailleurs, MT₁ n'interagit pas avec plusieurs protéines de la densité post-synaptiques ; aussi, MUPP1 et PSD95 n'ont pas été identifiées par SM dans les protéomes de MTR mais ont été seulement révélées en Western-blot comme partenaires du peptide Cter de MT₁. Ceci est probablement lié au fait que ces protéines sont minoritaires par rapport à SNAP25, synapsine et à Munc-18 dans la soupe de partenaires purifiés par le Cter de MT₁; chose qui aurait entravé l'identification des partenaires post-synaptiques par SM ; et qui suggère une localisation de MT₁ principalement au niveau pré-synaptique.

3.2) La comparaison de l'interactome de MTR avec le protéome d'autres RCPG

Le protéome du récepteur présynaptique mGluR4 établi par (Ramos et al ; 2012) et par (Moritz et al ; 2009) présente plusieurs partenaires communs avec les récepteurs de la mélatonine. La purification des partenaires du récepteur natif par Ramos *et al.* (à partir du cervelet de rat) a conduit à l'identification des partenaires présynaptiques : Munc-18, syntaxine, synapsine et SNAP25 retrouvés uniquement avec MT₁ et non pas avec MT₂.

Cela soutient l'hypothèse que MT₁ est un récepteur présynaptique tout comme mGluR4. De plus, les divergences entre la liste des partenaires de MT₁ et celle de plusieurs récepteurs sérotoninergiques (qui sont présents aussi bien au niveau pré-synaptique que post-synaptique) notamment avec l'absence de protéine du compartiment post-synaptique pour MT₁, suggèrent que ce récepteur ne fait pas partie de ce complexe de densité post-synaptique (Bécamel et al ; 2001) (Bécamel et al ; 2002 a & b) (Bécamel et al ; 2004).

La purification des partenaires du domaine Cter de mGluR4 à partir du lysat de cerveau de rat résulte en l'identification de plusieurs protéines dont les MAP (Microtubules Associated Proteins) retrouvées avec MT₂. Les isoformes suivants ont été identifiés : MAP-1 et MAP-2 avec MT₂ (notre étude), MAP-1 avec mGluR4 (Moritz, et al ; 2009) et MAP-2 avec le récepteur présynaptique et post-synaptique mGluR5 (Farr et al ; 2004). Sachant que les MAP-1 et MAP-2 sont des protéines exclusivement post-synaptiques et dendritiques (Dehmelt & Halpain ; 2004) (Kaech et al ; 1997), MT₂ peut alors être localisé au niveau du compartiment post-synaptique, particulièrement dans les épines dendritiques. Cette hypothèse mérite alors d'être explorée expérimentalement.

3.3) Les effets connus de la mélatonine et de ses récepteurs qui requièrent une localisation présynaptique de MTR

La mélatonine peut avoir un effet anti-nociceptif. Cet effet passe par l'inhibition de la potentiation synaptique au niveau des neurones de la racine dorsale de la moelle épinière. L'antinociception via la mélatonine peut être inhibée par l'administration du luzindole suggérant un rôle des récepteurs de la mélatonine (Nosedá et al ; 2004). En outre, la mélatonine peut réguler le relargage des neurotransmetteurs: au niveau de la rétine de la carpe, la transmission synaptique entre les cônes et les cellules horizontales se fait par le glutamate. Ainsi, la mélatonine potentialise le relargage du glutamate et l'activation des cellules horizontales. La même étude montre que cet effet est bloqué par le luzindole et que seul MT₁ est exprimé dans les cônes. Cette étude laisse penser que MT₁ joue un rôle dans la régulation du relargage du glutamate au niveau de la rétine (Huang et al ; 2005).

Par ailleurs, Escames *et al.* montrent que la mélatonine inhibe la transmission synaptique glutamergique au niveau des neurones du striatum qui projettent dans les aires sensorielles du cortex de rat. L'équipe a étudié l'excitabilité de 111 neurones du cortex qui est induite par le relargage de glutamate à partir des neurones du striatum pré-synaptique. L'étude montre que la mélatonine inhibe 80 % de neurones de cortex. Cette inhibition est également observée par l'utilisation du calcium ionophore. Cependant, le bloqueur des canaux Ca_v1 n'a pas d'effet, tandis que la toxine spécifique de Ca_v2.2 (la ω -conotoxine) induit l'inhibition de 50 % des neurones. Ce résultat suggère fortement que l'effet de la mélatonine passe par des neurones qui utilisent Ca_v2.2 dans leur machinerie d'exocytose.

Il indique également que la mélatonine active d'autres neurones qui ne font pas appel à $Ca_v2.2$, car la mélatonine inhibe 30 % de neurones supplémentaires par rapport à la ω -conotoxine (Escames et al ; 2005).

Enfin, plusieurs études montrent que la mélatonine inhibe la potentiation neuronale à long terme (LTP). La LTP est un phénomène de plasticité neuronale qui se traduit par l'augmentation de la taille de la zone active et du compartiment post-synaptique, ainsi que par le changement du nombre des contacts inter-neuronaux. La LTP subit une régulation circadienne (Chaudhury et al ; 2005) (Ozcan et al ; 2006). De plus, Collins *et al.* démontrent l'occurrence de la LTP au niveau de l'hippocampe, mais ne présentent aucune explication mécanistique dans l'article (Collins et al ; 1997). Plus tard, plusieurs études montrent que l'effet de la mélatonine sur la LTP au niveau de l'hippocampe est perdu chez les souris KO-MT₂, suggérant le rôle de ce récepteur au niveau neuronal (Wang et al ; 2005) (Larson et al ; 2006).

3.4) L'inhibition du relargage de la dopamine par la mélatonine

Ce paragraphe s'intéresse au lien fonctionnel entre la mélatonine et la dopamine. Les effets ont été décrits il y a près de 30 ans par deux équipes: Dr M. Dubocovich et Dr N. Zisapel. Plusieurs de leurs publications font état d'une inhibition très forte du relargage de la dopamine par la mélatonine et ce dans plusieurs structures du cerveau et au niveau de la rétine. Au niveau du cerveau, la mélatonine inhibe la libération de la dopamine dans l'hypothalamus de manière dépendante d'une entrée de calcium (Zisapel et al ; 1982b) (Zisapel et al ; 1983). L'hypothalamus étant un site privilégié de l'expression des récepteurs de la mélatonine, une analyse conjointe de ces observations avec les résultats de notre étude suggère l'implication de MT₁ et du canal calcique $Ca_v2.2$ dans l'inhibition de la libération de la dopamine. De plus, l'inhibition présente une régionalisation au niveau de différentes structures du cerveau. La mélatonine inhibe alors la libération de la dopamine au niveau de l'hypothalamus, de l'hippocampe et au niveau du cervelet, mais n'aurait pas d'effets dans le striatum et dans le cortex (Zisapel et al ; 1982). L'hypothalamus, l'hippocampe et le cervelet sont des structures connues pour exprimer les récepteurs de la mélatonine. Ceci porte à penser que cet effet, qui est dépendant du calcium, pourrait être en fait dépendant de la présence de MT₁ et d'un canal calcique. Par conséquent, l'absence d'effet dans le cortex peut alors s'expliquer par une faible densité de récepteurs comme indiqué dans notre étude. Par ailleurs, M Dubocovich rapporte que de la même manière que dans le cerveau, la mélatonine est un fort inhibiteur de la libération de la dopamine au niveau de la rétine. Cet effet est là encore dépendant du flux de calcium (Dubocovich et al ; 1983) (Dubocovich et al ; 1986).

Enfin, ces effets ont été validés plus tard par Drag-Kozak *et al.* qui ont montré l'inhibition par la mélatonine de la sécrétion de la dopamine au niveau de l'hypothalamus de la carpe (Drag-Kozak *et al.* ; 2006).

3.5) Le phénotype des souris KO pour Ca_v2.2

D'un point de vue physiopathologique, les canaux de type N occupent une place centrale dans les mécanismes moléculaires de la nociception (Altier *et al.* ; 2007) (Zamponi *et al.* ; 2009). Cependant, la délétion chez les souris de la sous-unité principale de Ca_v2.2 (l'unité α B), entraîne la perturbation des rythmes circadiens, une hyperactivité et des dérégulations de l'état du sommeil et de la vigilance pendant l'éveil (Beuckmann *et al.* ; 2003). De manière intéressante, cette étude laisse penser que certains effets régulateurs des récepteurs de la mélatonine pourraient éventuellement passer par la modulation du canal Ca_v2.2, suggestion qui conforte notre résultat à propos de l'interaction fonctionnelle de MT₁ et de Ca_v2.2 dans les cellules CHO.

3.6) Certains effets neuroprotecteurs liés à la mélatonine passent par les récepteurs MTR et ne sont pas seulement dus aux propriétés anti-oxydantes de la mélatonine

En dépit de plusieurs études qui rapportent les effets de la mélatonine au niveau neuronal, les récepteurs MTR n'ont malheureusement pas bénéficié de la même attention (Baydas *et al.* ; 2002) (Sotthibundhu *et al.* ; 2010). Certaines études, dont celle de Niles *et al.* avaient décrit la co-localisation des récepteurs MT₁ avec des marqueurs gliaux au niveau des cellules souches neuronales C17.2 (Niles *et al.* ; 2004). Cette étude valide indirectement deux de nos candidats, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et le Glia maturation factor β GMF- β , deux partenaires identifiés pour MT₁ par la technique de chromatographe d'affinité dans notre étude. A noter également que GMF- β a aussi été identifié pour MT₂. En outre, l'identification de la GFAP et du GMF- β suggère un rôle des MTR dans le développement neuronal. En effet, certaines cellules souches du cervelet continuent la neurogénèse jusqu'à 11 mois chez l'homme et jusqu'à 21 jours chez le rat après la naissance. Imbesi *et al.* montrent que les effets bénéfiques neuro-protecteurs de la mélatonine au niveau de ces cellules souches requiert l'expression de MT₁ (Imbesi *et al.* ; 2008). Par ailleurs, l'effet protecteur décrit pour la mélatonine vis-à-vis des dommages d'une ischémie cérébrale passerait par les voies PI3K/AKT et ERK1/2 et par l'activation de Gq/11 probablement à partir de MT₁ (Kilic *et al.* ; 2005).

En conclusion. Nous venons de démontrer que notre démarche pour l'identification des partenaires de MTR nous a permis de mettre le doigt sur des mécanismes relatifs à l'implication de la mélatonine et de ses récepteurs dans la régulation de la neurotransmission. Ce travail peut donc constituer une preuve qui conforte la localisation de MT_1 au niveau présynaptique, où il médie les effets de la mélatonine dans la régulation du relageage des neurtransmetteurs.

ARTICLE 3

Agonist-independent modulation of dopamine transporter DAT activity by melatonin receptors

Abla Benleulmi-Chaachoua ^{1,2,3}, Marine Le Boulch ^{1,2,3}, Angeliki Karamitri ^{1,2,3}, Kate Sokolina ⁴, Victoria Wong ⁴, Igor Stagljar ⁴, Philippe Delagrance ⁵, and Ralf Jockers ^{1,2,3,#}

¹ Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

² CNRS UMR 8104, Paris, France

³ Univ. Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁴ Donnelly Centre, Department of Biochemistry, Department of Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Toronto, 160 College Street, University of Toronto, ON, Canada, M5S 3E1

⁵ IDR SERVIER, Croissy/Seine, France

Running title: Functional interaction of melatonin receptors and dopamine transporters

Keywords: melatonin/ dopamine/ melatonin receptor/ DAT/ synaptosome

Correspondence should be addressed to:

Dr. Ralf Jockers, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris.

Phone: +331 40 51 64 34; Fax: +331 40 51 64 30; e-mail: ralf.jockers@inserm.fr

Abstract

The dopamine (DA) transporter (DAT) is a major regulator of the DA circuit in the brain by mediating the re-uptake of DA into presynaptic nerve termini. Melatonin, a neurohormone released by the pineal gland in a circadian manner with peak levels during the night, has multiple effects in the central nervous system including the regulation of DA levels, but how melatonin accomplishes this task is not clear. Coexpression of MT₁, MT₂ or GPR50, the three melatonin receptor (MTR) family members, with DAT in HEK293 cells inhibited DA uptake in the absence of melatonin. Biochemical characterization

showed the existence of DAT/MTRs signaling complexes that resulted in decreased DAT cell surface localization in a manner that was independent of post-translational modifications in the DAT N-terminus. Consistently, mice with targeted deletion of MTRs showed markedly increased DA uptake in synaptosomal preparations of the striatum. In conclusion, the DA re-uptake capacity of synaptosomes and DAT cell surface expression are regulated by MTRs and suggest a possible regulation of extracellular DA levels by the circadian variation of MTR expression.

Introduction

The dopamine (DA) transporter DAT is a key regulator of the extrasynaptic DA availability. This transporter mediates DA re-uptake into the nerve terminals, thus preventing dopaminergic hyperactivation. DAT is located on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area, the limbic system, in the prefrontal cortex, and highly expressed in substantia nigra projections ending in the striatum formation (1). DAT is the unique transporter responsible of DA clearance from the synaptic cleft.

DAT is down-regulated by addictive compounds such as cocaine and amphetamine analogues that cause an over-activation of the dopaminergic circuit, accompanied by enhanced locomotion and reward feelings (2). Moreover, disruptions of dopamine clearance is associated with a broad spectrum of neuropsychiatric disorders such as Parkinson's disease (PD), schizophrenia and attention-deficit hyperactivity disorder (3-5).

DAT surface expression is one of the limiting factors of the rate of DA uptake. At the level of nerve terminals, DAT expression is maintained in equilibrium between the cell surface and endosomal vesicles (6). This equilibrium may be modulated by post-translational modifications as well as by protein-protein interactions (7).

DAT is known to be phosphorylated in response to the activation of several kinases such as PKC, PI3K, MEK1/2, and p38. DAT also undergoes ubiquitination prior to its down regulation via endocytosis downstream of PKC activation. The target residues of phosphorylation and ubiquitination are located in the N-terminal domain of DAT, the main regulatory domain of the transporter (8-10). Moreover, DAT activity can be reversed into DA efflux at the cell surface prior to endocytosis as a result of the phosphorylation of N-terminal serine residues either upon PKC activation (11) or amphetamine treatment (12). Furthermore, DAT was reported to interact with several membrane and cytosolic proteins (13). Some proteins such as GPR37 diminish DA uptake by decreasing the cell surface expression of DAT in mouse synaptosomes (14), others, like the Parkin protein, increases the uptake by enhancing the cell surface expression of DAT (15).

The DA availability at the synaptic cleft is a result of a release and uptake process. Several studies report the role of the neurohormone melatonin in the regulation of DA availability at different regions in the brain (16,17). Melatonin is a neuro-hormone synthesized by the pineal gland during the night phase and has been shown to regulate various neuronal, retinal, immunological and metabolic functions (18,19). Most of these effects are mediated by two melatonin receptors MT₁ and MT₂ belonging to the G

protein-coupled receptor super-family (20). A third member, the orphan GPR50 protein shows 40% sequence homology with MT₁ and MT₂ receptors. This receptor does not bind to melatonin but regulates MT₁ function rather by heterodimerization (21). Melatonin deregulations either at the level of hormone secretion, receptor polymorphisms or expression are associated with a large spectrum of diseases and disorders such as circadian rhythm abnormalities, Parkinson's and Alzheimer's diseases (22,23), attention-deficit hyperactivity disorder (24), schizophrenia (25), and type 2 diabetes (19).

In this study, we report the identification of DAT as binding partner of MT₁ receptors in a membrane yeast two-hybrid screen. We then show that all three members of melatonin receptors family (MTR) interact with DAT and inhibit DA uptake in HEK293 cells. Consistently, DAT activity is increased in knockout mice for MTR showing that MTRs are novel regulators of DAT.

RESULTS

Identification of DAT/ melatonin MT₁ receptor complexes with MYTH - In order to identify proteins interacting with the human melatonin MT₁ receptor, we applied the recently developed modified split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid (MYTH) technique (26). Full-length receptors were N-terminally tagged with the yeast mating factor α to encourage plasma membrane localization and C-terminally tagged with half of ubiquitin (Cub) fused to an artificial transcription factor comprising LexA and VP16. Successful cell surface expression of melatonin receptors in yeast was monitored by immunofluorescence microscopy (data not shown). Screens were performed in duplicate against recombinant NubG-prey of a human fetal brain cDNA library, a tissue known to express MT₁ receptors (27). Forty-seven high-quality interactions were retained after deleting false positive candidates interacting with an artificial bait, the transmembrane segment of the human T-cell surface glycoprotein CD4 linked to Cub-TF (28). Among these proteins was the DAT that interacted with MT₁ receptors (2 clones with 330/620 amino acids).

Melatonin receptor family members interact with DAT - We sought to

validate the interaction between MT₁ and DAT in mammalian cells by performing co-immunoprecipitation (co-IP) experiments in transiently transfected HEK293T cells. Epitope-tagged DAT was coexpressed with the different members of the melatonin receptors family, MT₁, MT₂ and GPR50, as well as GPR37, previously shown to interact with DAT (14). We show that DAT precipitated with the MT₁ receptor and GPR37 confirming our MYTH result and previous reports, respectively. In addition, MT₂ receptors and to a lesser extent GPR50 co-immunoprecipitated also with DAT (Figure 1A,B). Incubation with melatonin (1 μ M) for 30 minutes had no effect on the interaction between DAT and MT₁ (Supplementary Figure 1A).

To further confirm these interactions, we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) donor saturation experiments with the *Renilla* luciferase (Rluc) energy donor fused to the C-terminus of MT₁, MT₂ and GPR50 and the yellow fluorescent protein (YFP) energy acceptor fused to the N-terminus of DAT. The chemokine receptor CCR5-Rluc fusion protein was included as a negative control. The co-transfection of a fixed amount of Rluc fusion proteins and increasing amounts of YFP-DAT resulted in the expected hyperbolic curve reaching an asymptote indicating specific interactions between DAT and MT₁ and GPR50 (Figure 1C,E). In contrast, BRET signals in cells coexpressing DAT and MT₂ or CCR5 increased linearly suggesting rather a non-specific interaction, due to random collision or an unfavorable orientation of the energy donor and acceptor in these configurations (Figure 1D) (29,30). Taken together, co-IP and BRET experiments provide evidence that DAT interacts not only with MT₁ receptors but possibly also with MT₂ receptors and GPR50.

Melatonin receptors decrease dopamine uptake through DAT - In order to explore potential consequences of MTRs on DAT function, we measured DA uptake in HEK293T cells expressing DAT in the absence or presence of MTRs. Expression of MT₁, MT₂ and GPR50 decreased DA uptake by 76 \pm 0.2, 27 \pm 0.5 and 52 \pm 0.2 %, respectively (Figure 2A). In agreement with previous reports, co-expression of GPR37 decreased DA uptake by 18 \pm 0.4 % (14), while the presence of the CCR5 and the

4-transmembrane-spanning endospinin-1 protein, known to regulate the cell surface expression of other membrane receptors (31), did not affect the DAT-promoted DA uptake (Figure 2A). Expression of comparable quantities of DAT and successful expression of the various GPCRs and endospinin-1 was confirmed in total cell lysates by western blot (Figure 2B). Pre-incubation with melatonin (1 μ M) for 30 minutes had no effect on MT₁ and MT₂ receptor-mediated inhibition of DA uptake further strengthening the constitutive nature of the interaction between DAT and MTRs (Figure 2C). Shorter or longer pre-incubation times with melatonin were also without effect (not shown). Furthermore, pre-incubation of cells expressing MT₁ or MT₂ receptors with the melatonin receptor inverse agonist S77834 (32) was unable to elevate the inhibition of DA uptake, thus excluding the potential involvement of the constitutive activity of MT₁ and MT₂ receptors in this effect (Figure 2C). Successful inhibition of constitutive MT₂ receptor activity by S77834 was shown by in cAMP accumulation and the β -arrestin 2 recruitment assays (Supplementary Figure 2). Whereas melatonin decreased forskolin-stimulate cAMP production and induced β -arrestin 2 recruitment, S77834 had opposite effects as predicted.

MTRs decrease DAT cell surface expression - Regulation of DAT-promoted DA uptake may be due to either a modulation of the affinity of DA for DAT or to a modification of DAT cell surface expression (15). We therefore analyzed the kinetics of DAT-mediated DA uptake. Kinetic analysis showed that K_m values were similar in HEK293T cells expressing DAT alone (1.57 \pm 0.15 μ M) compared to cells coexpressing DAT and MT₁ (1.07 \pm 0.49 μ M), MT₂ (1.49 \pm 0.31 μ M) or GPR50 (1.39 \pm 0.16 μ M) (Figure 3). K_m values were comparable to those measured in previous studies (33). Maximal DA uptake rates (V_{max}) were significantly decreased in cells coexpressing DAT with MT₁ (78.39 \pm 14.17 fmol/mg/min), MT₂ (138.20 \pm 12.43 fmol/mg/min), or GPR50 (114.50 \pm 6.01 fmol/mg/min) as compared to cells expressing DAT alone as expected (222.20 \pm 9.38 fmol/mg/min) (p-value < 0.001). Altogether, these results exclude an effect of MTRs on the affinity of DA for DAT (Figure 3).

To assess the impact of MTRs on DAT cell surface expression, we determined

the number of DAT binding sites at the cell surface with the radiolabeled cocaine analogue β -CFT [N-methyl-³H]WIN-35428 (Figure 4A). A drop of 50-70% in binding sites was observed for all three receptors consistent with the results observed in the DA uptake assay (Figure 2A). Similar effects were observed in cells coexpressing DAT and GPR37 recapitulating previously reported results (14). Expression of the negative control receptor CCR5 had no influence on the number of DAT binding sites (Figure 4A). For all conditions, the total amount of expressed DAT did not change (see Figure 2 B).

We then, wanted to confirm these results with a second, independent assay, the recently described β -lactamase (β lac) enzyme assay (34). This assay determines the amount of DAT expressed at the cell surface by measuring the enzyme activity of the β lac-DAT fusion protein in intact cells, where β lac is inserted into the extracellular loop of DAT allowing the measurement of extracellular β lac enzyme activity of surface exposed β lac-DAT fusion proteins. We first confirmed that the β lac-DAT fusion protein was able to interact with MT₁, MT₂, GPR50 and GPR37 as indeed demonstrated in coIP experiments (Supplementary Figure 3 A,B). Coexpression of DAT with MTRs reduced cell surface expression of DAT according to the following rank order of magnitude: MT₁ > GPR37 > GPR50. MT₂ and CCR5, the negative control receptor, had no significant effect on β lac-DAT surface expression (Figure 4B). These results further confirm the negative effect of MTR on DAT cell surface expression.

Several reports show that accumulation of immature, non-glycosylated DAT limit DAT surface delivery (15). To address this question, we analyzed the migration profile of DAT in HEK293T cells expressing DAT alone or in the presence of MT₁ receptors. No major changes were observed in the 50 and 100 kDa bands corresponding to the non-glycosylated and mature forms of DAT, respectively, excluding an effect of MT₁ receptors on the amount of immature and unglycosylated DAT (Supplementary Figure 3C).

Decreased DAT cell surface expression might result from higher internalization or lower export of DAT in the presence of MTRs. DAT internalization is known to be dependent on protein kinase C

(PKC) activation, directly by phosphorylating DAT or indirectly by mediating its ubiquitination (7). Treatment of HEK293 cells for 30 minutes with the potent PKC activator, phorbol myristate ester (PMA) (35), caused the expected decrease of DAT cell surface expression of 65% and this effect was not significantly modified by the coexpression of MTRs (Figure 4 B). Total DAT expression remained unchanged between the different conditions (Supplementary Figure 3D). Taken together, co-expression of MTRs decreases DAT surface expression without modifying the well-established PKC-dependent DAT internalization but most likely by retaining DAT in the biosynthesis pathway.

The N-terminus of DAT is not required for DAT inhibition by MTR - The N-terminus of DAT (amino acids 1-62) plays a key role in DAT function because it undergoes various post-translational modifications leading to DAT down-regulation (8,10) and because it serves as a protein-protein interaction platform for syntaxin 1A (36), synaptogrin-3 (37) and possibly also for dopamine D2 receptors (38,39). The MYTH screen identified 2 clones corresponding to the N-terminal half of DAT raising the possibility that the N-terminus of DAT (amino acids 1-62) participates in the physical and functional interaction. To study the involvement of the N-terminus of DAT in MTR-promoted regulation of DAT function, we used the previously described Δ N-Flag-DAT mutant devoid of the amino acids 1-55 (38).

We first performed pull-down experiments with the Δ N-Flag-DAT mutant and could show that the interaction between DAT and MT₁ and DAT and MT₂ receptors persist even in the absence of the N-terminally DAT domain (Figure 5A). Consistently, the coexpression of MTRs also diminishes the cell surface expression of Δ N-Flag-DAT as observed with WT DAT (Figure 5B and Supplementary Figure 4). Finally, we could show that MTRs did also inhibit DA uptake of the Δ N-Flag-DAT mutant with a very similar pattern as compared with the WT DAT (Figure 5C). Altogether, this results show that the interaction and the functional effects of MTRs on DAT do not involve the N-terminal domain of the transporter. These observations are consistent with the constitutive nature of this interaction.

Mice lacking melatonin receptors exhibit enhanced DAT activity - To confirm our *in vitro* findings we reasoned that mice with targeted deletions of MTRs would be expected to show increased DAT-dependent DA uptake. DA uptake can be measured in synaptosomes that are isolated from different brain regions upon subcellular fractionation. Synaptosomes contain all the necessary elements for the transport of neurotransmitter thus reliably reflecting *in vivo* conditions (40). In agreement with previous reports, our pilot experiments in C57BL/6 mice showed highest expression levels of DAT in the synaptosomal fraction of the striatum followed by the cortex and to a much lesser extend in the hypothalamus (Supplementary Figure 5A) (41). The presence of MT₁ and MT₂ receptors in synaptosomal membranes was evaluated in 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (¹²⁵I-MLT) binding experiments (Supplementary Figure 5B). Finally, ³H-DA uptake experiments with synaptosomes showed that highest DAT activity is measured in the striatum (Supplementary Figure 5C).

Based on these pilot experiments, we decided to assess DA uptake in striatal synaptosomal preparations from WT mice, as well as knockout mice for MT₁, MT₂ or GPR50. DA uptake was significantly increased in all mice lacking MTRs compared to the WT strain (Figure 6A). This enhanced DA transport capacity is not accompanied by increased total DAT expression levels as monitored by western blot in synaptosomal lysates (Figure 6B). Taken together, results obtained in MTR knockout mice are consistent with our *in vitro* observations and support the idea that MTRs are negative regulators of DAT-promoted DA uptake.

DISCUSSION

In this study, we report that MTRs inhibit DA uptake by diminishing the cell surface expression of DAT in a common heterodimeric MTR/DAT complex. This conclusion is supported by *in vitro* studies in HEK293 cells and *in vivo* studies in knockout mice.

Initially, DAT was identified as a potential binding partner of the MT₁ receptor in a MYTH screen suggesting the binary character of the interaction and arguing towards the heterodimer formed between MT₁

and DAT. The high sequence homology of MT₁ receptors with MT₂ receptors and GPR50 prompted us to extend our study towards these family members for which we observed indeed an similar tendency as for MT₁ receptors: formation of heterodimeric complexes and a decrease in DA uptake. K_m values for DA were similar for these complexes suggesting unmodified DA transport capacity of DAT within these complexes. In contrast, maximal transport levels were significantly reduced. Stimulation of MT₁ and MT₂ receptors with melatonin did not modify this effect suggesting that receptor-induced activation of intracellular kinase pathways, known to modify the regulatory N-terminal domain of DAT and involved in its down-regulation, can be excluded. Stimulation of MT₁ and MT₂ receptors with melatonin not only induces intracellular signaling but also receptor internalization. The fact that the number of DAT at the surface was not modified by melatonin treatment excludes also a potential co-internalization of MT₁ or MT₂ receptors with DAT. The inability of the MT₂ receptor inverse agonist S77834 to prevent the inhibitory effect of MT₂ on DA uptake excludes also the involvement of the constitutive activity of MT₂ in this effect. Similarly, the absence of effect of melatonin and S77834 argue against a direct allosteric effect of MTR in the MTR/DAT complex. Taken together, MTRs inhibit the maximal DA uptake capacity of the DAT independently of the activation state of the receptors, most likely by regulating the cell surface expression of DAT.

Regulation of DAT surface expression has been previously identified as a limiting parameter that regulates DA uptake. Our results suggest that the decreased DA uptake capacity in the presence of MTRs is caused by the retention of DAT in intracellular compartments. The dopamine D2 receptor has been shown to increase DA uptake as a consequence of enhanced DAT cell surface expression possibly involving reduced membrane endocytosis and increased in membrane exocytosis (38,39). In the case of the ubiquitin ligase E3 Parkin increased DAT cell surface localization is achieved but by an alternative mechanism. Actually, correctly folded DAT is stabilized by oligomerization during biosynthesis in the endoplasmic reticulum, a process that is also necessary for

efficient translocation of DAT to the cell surface (42). Importantly, incorrectly folded DAT protomers have dominant negative effects on the WT in these oligomers and inhibit the cell surface delivery of DAT. Parkin is shown to enhance the selective ubiquitination (and thus degradation) of the miss-folded and/or unglycosylated DAT and cause the increase in the cell surface expression of mature forms of DAT. Our preliminary data on the role of MTRs on miss-folded and/or unglycosylated DAT show that the expression profile of unglycosylated forms of DAT is not changed at equilibrium by the expression of MT₁.

The striatum expresses abundant amounts of DAT. The expression and function of MTRs is much less established in this brain region. Uz *et al.* demonstrated in single-cell PCR experiments that the mRNA coding for the MT₁ receptor localizes all over the central dopaminergic system including the ventral tegumental area, the substantia nigra and the striatum. Localization of mRNA in the substantia nigra strongly suggests that the protein is expressed in the neuron terminals projecting in the striatum confirming our result (43). Our finding of ¹²⁵I-MLT binding sites in the striatum confirms this results on the protein level. Concerning GPR50, expression in the striatum has not been reported yet. However, the expression profile of this protein is still subject of ongoing investigation. Moreover, GPR50 is highly expressed in the *median eminence*, a region known to express DAT suggesting the potential formation of DAT/GPR50 complexes in this region (44,45).

DAT is localized in presynaptic membranes to clear extracellular DA from the synaptic cleft. This localization is fully compatible with the recently observed presynaptic localization of the MT₁ receptor (*Benleulmi-Chaachoua et al. in preparation*). This contrasts with the localization of the MT₂ receptor, which was found to localize preferentially in dendrites and not in axons according to this same study. It is interesting to note that DAT is also localized in dendrites and spines where it mediates DA clearance from the extra-synaptic environment of the neuron (46,47). Taken together, the formation of MTR/DAT complexes appears likely and has to be investigated on more detail in future studies.

Our study shows that MTRs have a negative role on the capacity of DAT for DA reuptake. The presence of MTR could thus protect the neurons from intensive dopamine uptake. DA is known to form reactive oxygen species through enzymatic degradation. Elevated rate of intra-neuronal DA would thus increase the degeneration of the dopaminergic neurons characterized in several neurodegenerative illnesses as in Parkinson's disease where MTR are concomitantly down-regulated (22,48). Intriguingly, the effect of MTRs on DA uptake appears to be completely independent on stimulation of these receptors by melatonin or any constitutive receptor activity. It is interesting to note that MT_1 and MT_2 receptor levels are typically submitted to a circadian regulation (49). This regulatory mechanism might be just one component of a complex network of circadian regulation of the dopaminergic system that involves circadian variation of DA levels itself, dopamine D2 and D4 receptors and diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors (50-52). In turn, DA has also been shown to regulate major components of the central circadian clock mechanism like Per2 expression in the dorsal striatum (53).

Taken together, our findings establish a new relationship between MTRs and the control of extracellular DA levels by regulating the DA transport capacity of DAT particularly in the striatum as indicated by the enhanced DA uptake in striatal synaptosomes of MTR knockout mice. Given the fact that DAT activity is considered to reflect the general state of dopaminergic circuit, and DAT alterations go together with dopaminergic deregulations in many diseases such as Parkinson's disease (3) and depression (54) our findings warrant further investigation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Compounds

Dihydroxyphenylethylamine-[2,5,6,7,8-3H]-dopamine (NET116000), [N-methyl-3H]WIN-35428 (NET10330) and 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (NEX2360) were purchased from Perkin Elmer, S77834 was a generous gift from Servier, Nitrocefin (484400) and melatonin (CAS 73-31-4) from Calbiochem, dopamine (H8502) and Nomifensine (N1530) from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection - HEK293 cells were grown in complete

medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 4.5g/L glucose, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin and 1mM glutamine) (Invitrogen, CA). Transient transfections were performed using JetPEI (Polyplus Transfection, France), according to manufacturer's instructions.

DNA constructs - Myc- and Flag-hDAT were kindly donated from Dr M.E.A. Reith laboratory from New York University School of Medicine - USA (55); $\Delta N1$ -55-Flag-hDAT and YFP-hDAT from Dr T.S. Shippenberg laboratory from the National Institute on Drug Abuse; Baltimore -USA (38); and β -Lac-hDAT plasmid was from Dr A. Salahpour (University of Toronto) (34).

Membrane Yeast two-hybrid (MYTH) screen - The MYTH screens were done as outlined previously (26). In short, baits were transformed into a *Saccharomyces cerevisiae* strain by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method as described by (56). Subsequently, a prey cDNA library in the NubG-X orientation was transformed into these yeast strains containing MT_1 receptors by the same method. Putative interactors were selected by growth on synthetic dropout media lacking the amino acids tryptophan, leucine, adenine and histidine (SD-WLAH). Prey plasmids were isolated using a commercial DNA isolation kit modified for yeast, followed by transformation and additional amplification in *Escherichia coli*. Final purified plasmids were subjected to sequencing and BLAST analysis, to identify specific interactors. To eliminate spurious interactors, the prey plasmids were once again transformed into yeast harboring MT_1 or an artificial bait (the transmembrane segment of the human T-cell surface glycoprotein CD4 linked to Cub-TF) and interaction was assessed. Any preys that also interacted with the artificial bait were deemed promiscuous and discarded.

Immunoprecipitation and SBD pull-down - For co-immunoprecipitation assays, HEK293 cells were seeded in 10 cm dishes and co-transfected with 4 μ g of each indicated plasmids. Cells were solubilized with modified RIPA buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 % glycerol) supplemented with protease inhibitors: leupeptine (1 mg/ml), pepstatin (1 mg/ml), benzamidine (2 mg/ml),

AEBSF (1 mg/ml); and phosphatase inhibitor: 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF for at least 3 hours at 4°C. The soluble fraction was recovered by 1 hour of centrifugation at 13,000g and subjected to immunoprecipitation using G protein sepharose beads (Sigma) for 2 hours with antibodies (2 µg/ml) recognizing Flag (Sigma-Aldrich, F7425) or Myc (Santa Cruz Biotech, 9E10). Pull-down experiments were performed with streptavidin beads (GE Healthcare Life Sciences) in streptavidin buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % glycerol, 10 mM CHAPS) for 8 hours. Samples were denatured overnight at room temperature in SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5% SDS, 10% glycerol, 0.5% bromphenol blue) and the protein separated by SDS-PAGE. Immunoblot analysis were performed with the indicated antibodies (rabbit anti-DAT antibody (1:800) (AB5802) Millipore) and immunoreactivity was revealed using secondary antibodies coupled to 680 or 800 nm fluorophores using the Odyssey LI-COR infrared fluorescent scanner (ScienceTec, France).

BRET measurement - For BRET donor saturation curves, HEK293 cells seeded in 6-well plates were transiently transfected with 2 ng of MT₁-Rluc, 50 ng of MT₂-Rluc, 10 ng of GPR50-Rluc or 1-3 ng of CCR5-Rluc and 0 to 3000-4000 ng of DAT-YFP plasmids. Twenty-four hours after transfection, cells were transferred into a 96-well white Optiplate (Perkin Elmer Life Sciences) pre-coated with 10µg/ml poly-L-lysine (Sigma) and incubated for another 24h before BRET measurements. Luminescence and fluorescence were measured simultaneously using the lumino/fluorometer Mithras™ (Berthold) using optimized filter settings (Rluc filter, 480±10 nm; YFP filter, 540±20 nm).

Synaptosomal preparation - Synaptosomes from mice striatum, hypothalamus and cortex were prepared as described in (40). Briefly, tissues were homogenized in a buffer containing 320 mM sucrose, 5 mM HEPES, and protease inhibitors. After centrifugation at 2,000xg for 8 minutes, the supernatant was centrifuged at 30,000 g for 30 minutes. The resulting synaptosomal pellet was kept at 4°C and used for subsequent analysis within 4 hours.

DA uptake and β-CFT binding - HEK293 cells were transfected in 10 cm dishes then transferred in poly-L-Lysine coated 24

well plates. 48 h post-transfection, cells were washed with uptake buffer (5 mM Tris-HCl, 7.5 mM HEPES, 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM D-glucose, and 1 mM ascorbic acid; pH 7.2) and incubated in 0.5 ml of uptake buffer 5 min with 20 nM of [³H]-Dopamine. The uptake was terminated by two washes with ice-cold uptake buffer, and lysed in 0.5 ml of 1% SDS. Measurement was performed using scintillation counter. For synaptosomal DA uptake, 100 µg of proteins were subjected to DA uptake test for 5 min, Uptake was stopped by addition of 3 ml of ice-cold uptake buffer, followed by rapid filtration through Whatman filters and two additional rinses. The DA uptake kinetic test was performed in the presence of a fixed concentration of [³H]-dopamine (20 nM) and increasing DA concentrations as indicated. β-CFT binding was performed in the presence of 4 nM of [³H]WIN-35428 for 30 min at room temperature. Nonspecific binding was assessed with 25 nM of nomifensine.

B-lactamase assay - The β-lactamase assay was performed as previously described in (33) with minor modifications. Briefly, cells were plated into individual wells of a poly-D-lysine-coated 96-well plate. The assay was performed 24h after plating. Cells were treated or not with PMA (1µM) for 30min at 37°C, washed once with PBS and then incubated in 200µl of PBS/ well containing the β-lactamase substrate nitrocefin (100µM final concentration). Absorbance at 492 nm was measured immediately and then every 5 minutes for 30 min in a microplate spectrophotometer. The reaction rate (slope of the curve in the linear range) was taken as the readout for this assay.

¹²⁵I-MLT binding - The assay was performed as previously described (57).

Statistical analysis - Results were analyzed by PRISM (GraphPad Software). Data are expressed as mean ± SEM of at least 3 experiments. Student *t* test was applied for statistical analysis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fondation Recherche Médicale (Equipe FRM FRM DEQ20130326503 to R.J.), Inserm, CNRS and the Who am I? laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 funded by the French Gouvernement through its “Investments for the Future” program operated by The French National Research Agency (ANR) under grant No.ANR-11-IDEX-0005-01. We thank Anne-Sophie Journé (Institut Cochin) for her implication in mice breeding and expert advice in BRET and Dr. S. Doly (Institut Cochin) for critical comments on the manuscript.

Author Contributions

A.B., M.L.B., A.K., K.S., V.W. and R.J. performed research and/or analyzed data, R.J. and A.B. wrote the manuscript; I.S. and P.D. reviewed and/or edited the manuscript and contributed to discussion; P.D. and R.J. managed the project.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bjorklund, A., and Dunnett, S. B. (2007) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* **30**, 185-187
2. O'Neill, B., Tilley, M. R., Han, D. D., Thirtamara-Rajamani, K., Hill, E. R., Bishop, G. A., Zhou, F. M., During, M. J., and Gu, H. H. (2014) Behavior of knock-in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter after virogenetic restoration of cocaine sensitivity in the striatum. *Neuropharmacology* **79**, 626-633
3. Ishibashi, K., Oda, K., Ishiwata, K., and Ishii, K. (2014) Comparison of dopamine transporter decline in a patient with Parkinson's disease and normal aging effect. *J Neurol Sci* **339**, 207-209
4. Laakso, A., Bergman, J., Haaparanta, M., Vilkmann, H., Solin, O., Syvalahti, E., and Hietala, J. (2001) Decreased striatal dopamine transporter binding in vivo in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* **52**, 115-120
5. Dougherty, D. D., Bonab, A. A., Spencer, T. J., Rauch, S. L., Madras, B. K., and Fischman, A. J. (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* **354**, 2132-2133
6. German, C. L., Hanson, G. R., and Fleckenstein, A. E. (2012) Amphetamine and methamphetamine reduce striatal dopamine transporter function without concurrent dopamine transporter relocalization. *J Neurochem* **123**, 288-297
7. Eriksen, J., Jorgensen, T. N., and Gether, U. (2010) Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J Neurochem* **113**, 27-41
8. Lin, Z., Zhang, P. W., Zhu, X., Melgari, J. M., Huff, R., Spieldoch, R. L., and Uhl, G. R. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and MEK1/2 kinase regulation of dopamine transporters (DAT) require N-terminal DAT phosphoacceptor sites. *J Biol Chem* **278**, 20162-20170
9. Miranda, M., Wu, C. C., Sorkina, T., Korstjens, D. R., and Sorkin, A. (2005) Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C. *J Biol Chem* **280**, 35617-35624

10. Miranda, M., Dionne, K. R., Sorkina, T., and Sorkin, A. (2007) Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol Biol Cell* **18**, 313-323
11. Cowell, R. M., Kantor, L., Hewlett, G. H., Frey, K. A., and Gnegy, M. E. (2000) Dopamine transporter antagonists block phorbol ester-induced dopamine release and dopamine transporter phosphorylation in striatal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* **389**, 59-65
12. Khoshbouei, H., Sen, N., Guptaroy, B., Johnson, L., Lund, D., Gnegy, M. E., Galli, A., and Javitch, J. A. (2004) N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. *PLoS Biol* **2**, E78
13. Torres, G. E. (2006) The dopamine transporter proteome. *J Neurochem* **97 Suppl 1**, 3-10
14. Marazziti, D., Mandillo, S., Di Pietro, C., Golini, E., Matteoni, R., and Tocchini-Valentini, G. P. (2007) GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9846-9851
15. Jiang, H., Jiang, Q., and Feng, J. (2004) Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J Biol Chem* **279**, 54380-54386
16. Zisapel, N., Egozi, Y., and Laudon, M. (1982) Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res* **246**, 161-163
17. Escames, G., Acuna Castroviejo, D., and Vives, F. (1996) Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. *Neuroreport* **7**, 597-600
18. Dubocovich, M. L., Delagrange, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., and Olcese, J. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* **62**, 343-380
19. Karamitri, A., Renault, N., Clement, N., Guillaume, J. L., and Jockers, R. (2013) Minireview: Toward the Establishment of a Link between Melatonin and Glucose Homeostasis: Association of Melatonin MT2 Receptor Variants with Type 2 Diabetes. *Mol Endocrinol* **27**, 1217-1233
20. Zlotos, D. P., Jockers, R., Cecon, E., Rivara, S., and Witt-Enderby, P. A. (2013) MT and MT Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*
21. Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., and Delagrange, P. (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* **154**, 1182-1195
22. Adi, N., Mash, D. C., Ali, Y., Singer, C., Shehadeh, L., and Papapetropoulos, S. (2010) Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Med Sci Monit* **16**, BR61-67
23. Brunner, P., Sozer-Topcular, N., Jockers, R., Ravid, R., Angeloni, D., Fraschini, F., Eckert, A., Muller-Spahn, F., and Savaskan, E. (2006) Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* **50**, 311-316
24. Bendz, L. M., and Scates, A. C. (2010) Melatonin treatment for insomnia in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Ann Pharmacother* **44**, 185-191
25. Monteleone, P., Natale, M., La Rocca, A., and Maj, M. (1997) Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. *Neuropsychobiology* **36**, 159-163

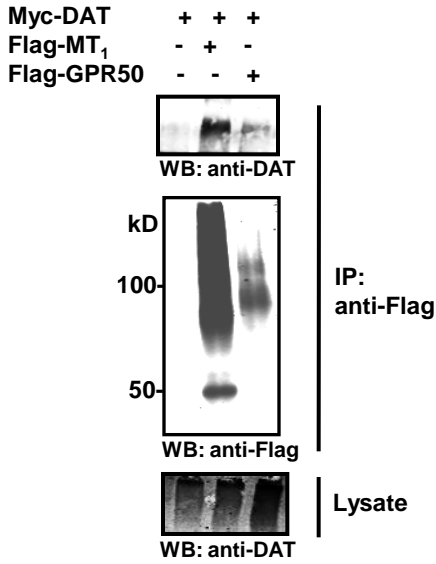
26. Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., and Stagljar, I. (2010) Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat Protoc* **5**, 1281-1293
27. Thomas, L., Purvis, C. C., Drew, J. E., Abramovich, D. R., and Williams, L. M. (2002) Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[I-125] iodomelatonin binding and MT1 gene expression. *Journal Of Pineal Research* **33**, 218-224
28. Huang, X., Dai, F. F., Gaisano, G., Giglou, K., Han, J., Zhang, M., Kittanakom, S., Wong, V., Wei, L., Showalter, A. D., Sloop, K. W., Stagljar, I., and Wheeler, M. B. (2013) The identification of novel proteins that interact with the GLP-1 receptor and restrain its activity. *Mol Endocrinol* **27**, 1550-1563
29. 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 hetero-dimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**, 44925-44931
30. Couturier, C., and Jockers, R. (2003) Activation of leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J. Biol. Chem.* **278**, 26604-26611
31. Couturier, C., Sarkis, C., Seron, K., Belouzard, S., Chen, P., Lenain, A., Corset, L., Dam, J., Vauthier, V., Dubart, A., Mallet, J., Froguel, P., Rouille, Y., and Jockers, R. (2007) Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19476-19481
32. Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Delagrangé, P., Spadoni, G., Cohen, W., Malpoux, B., Boutin, J. A., and Nosjean, O. (2012) Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res* **53**, 29-37
33. Giros, B., el Mestikawy, S., Godinot, N., Zheng, K., Han, H., Yang-Feng, T., and Caron, M. G. (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* **42**, 383-390
34. Lam, V. M., Beerepoot, P., Angers, S., and Salahpour, A. (2013) A novel assay for measurement of membrane-protein surface expression using a beta-lactamase. *Traffic* **14**, 778-784
35. Huff, R. A., Vaughan, R. A., Kuhar, M. J., and Uhl, G. R. (1997) Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport Vmax. *J Neurochem* **68**, 225-232
36. Binda, F., Dipace, C., Bowton, E., Robertson, S. D., Lute, B. J., Fog, J. U., Zhang, M., Sen, N., Colbran, R. J., Gnegy, M. E., Gether, U., Javitch, J. A., Erreger, K., and Galli, A. (2008) Syntaxin 1A interaction with the dopamine transporter promotes amphetamine-induced dopamine efflux. *Mol Pharmacol* **74**, 1101-1108
37. Egana, L. A., Cuevas, R. A., Baust, T. B., Parra, L. A., Leak, R. K., Hochendoner, S., Pena, K., Quiroz, M., Hong, W. C., Dorostkar, M. M., Janz, R., Sitte, H. H., and Torres, G. E. (2009) Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci* **29**, 4592-4604
38. Bolan, E. A., Kivell, B., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L. D., Han, Y., Sen, N., Urizar, E., Gomes, I., Devi, L. A., Ramamoorthy, S., Javitch, J. A., Zapata, A., and Shippenberg, T. S. (2007) D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Mol Pharmacol* **71**, 1222-1232

39. Lee, F. J., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P. J., and Liu, F. (2007) Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J* **26**, 2127-2136
40. Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Wang, Y. M., Jones, S. R., Levey, A. I., Miller, G. W., and Caron, M. G. (1998) Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* **70**, 1973-1978
41. Meister, B., and Elde, R. (1993) Dopamine transporter mRNA in neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **58**, 388-395
42. Sorkina, T., Doolen, S., Galperin, E., Zahniser, N. R., and Sorkin, A. (2003) Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biol Chem* **278**, 28274-28283
43. Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., Akhisaroglu, M., Dwivedi, Y., Pandey, G. N., and Manev, H. (2005) The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* **136**, 45-53
44. Sidibe, A., Mullier, A., Chen, P., Baroncini, M., Boutin, J. A., Delagrangue, P., Prevot, V., and Jockers, R. (2010) Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J Pineal Res* **48**, 263-269
45. Revay, R., Vaughan, R., Grant, S., and Kuhar, M. J. (1996) Dopamine transporter immunohistochemistry in median eminence, amygdala, and other areas of the rat brain. *Synapse* **22**, 93-99
46. Nirenberg, M. J., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., and Pickel, V. M. (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* **16**, 436-447
47. Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H., and Levey, A. I. (1997) Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J Comp Neurol* **388**, 211-227
48. Haavik, J., Almas, B., and Flatmark, T. (1997) Generation of reactive oxygen species by tyrosine hydroxylase: a possible contribution to the degeneration of dopaminergic neurons? *J Neurochem* **68**, 328-332
49. Poirel, V. J., Masson-Pevet, M., Pevet, P., and Gauer, F. (2002) MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* **946**, 64-71
50. Akhisaroglu, M., Kurtuncu, M., Manev, H., and Uz, T. (2005) Diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors and striatal D2/D3 receptor levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **80**, 371-377
51. Ikeda, E., Matsunaga, N., Kakimoto, K., Hamamura, K., Hayashi, A., Koyanagi, S., and Ohdo, S. (2013) Molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of dopamine D3 receptor expression in mouse ventral striatum. *Mol Pharmacol* **83**, 959-967
52. Gonzalez, S., Moreno-Delgado, D., Moreno, E., Perez-Capote, K., Franco, R., Mallol, J., Cortes, A., Casado, V., Lluís, C., Ortiz, J., Ferre, S., Canela, E., and McCormick, P. J. (2012) Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D(4) receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol* **10**, e1001347
53. Hood, S., Cassidy, P., Cossette, M. P., Weigl, Y., Verwey, M., Robinson, B., Stewart, J., and Amir, S. (2010) Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J Neurosci* **30**, 14046-14058

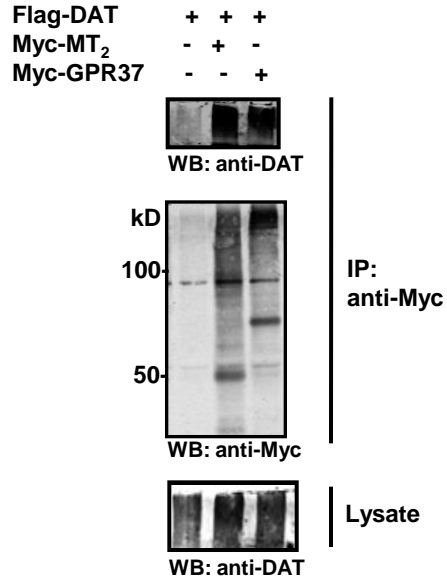
54. Hsiao, M. C., Lin, K. J., Liu, C. Y., and Schatz, D. B. (2013) The interaction between dopamine transporter function, gender differences, and possible laterality in depression. *Psychiatry Res* **211**, 72-77
55. Chen, N., and Reith, M. E. (2008) Substrates dissociate dopamine transporter oligomers. *J Neurochem* **105**, 910-920
56. Gietz, R. D., and Woods, R. A. (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* **313**, 107-120
57. Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpoux, B., Borg-Capra, C., and Jockers, R. (2008) The PDZ protein muppl1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *J Biol Chem* **283**, 16762-16771

Figure 1

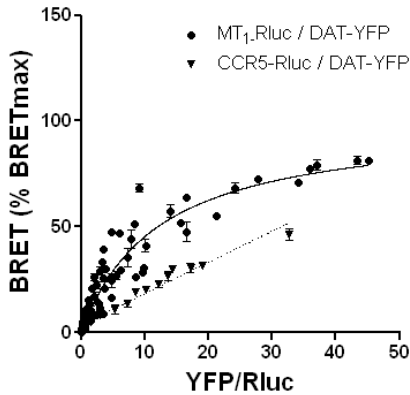
A



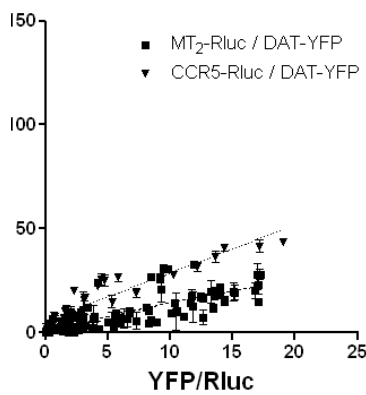
B



C



D



E

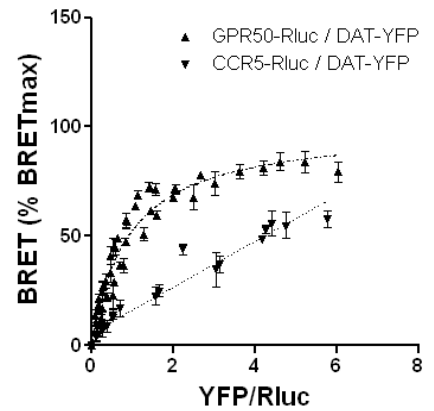


FIGURE 1. DAT interacts with MTRs in HEK293T cells. (A,B) Co-immunoprecipitation of DAT and MTRs. Lysates from HEK293T cells expressing (A) Myc-DAT alone or with either Flag-MT₁ or Flag-GPR50 or (B) Flag-DAT alone or with either Myc-MT₂ or Myc-GPR37 were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag (A) or anti-Myc (B) antibodies and the presence of co-immunoprecipitated DAT was detected with anti-DAT antibodies [upper Western blot (WB)]. Expression of DAT in lysates was assessed by immunoblotting with indicated antibodies (lower Western blot). Data are representative of three experiments. (D to E) BRET donor saturation experiments with HEK293T cells coexpressing a fixed amount of MT₁-Rluc (C), MT₂-Rluc (D), GPR50-Rluc (E) or CCR5-Rluc (C-E) (negative control) and increasing quantities of YFP-DAT. The saturation curves were obtained from five independent experiments. The curves represent 3 to 5 independent experiments.

Figure 2

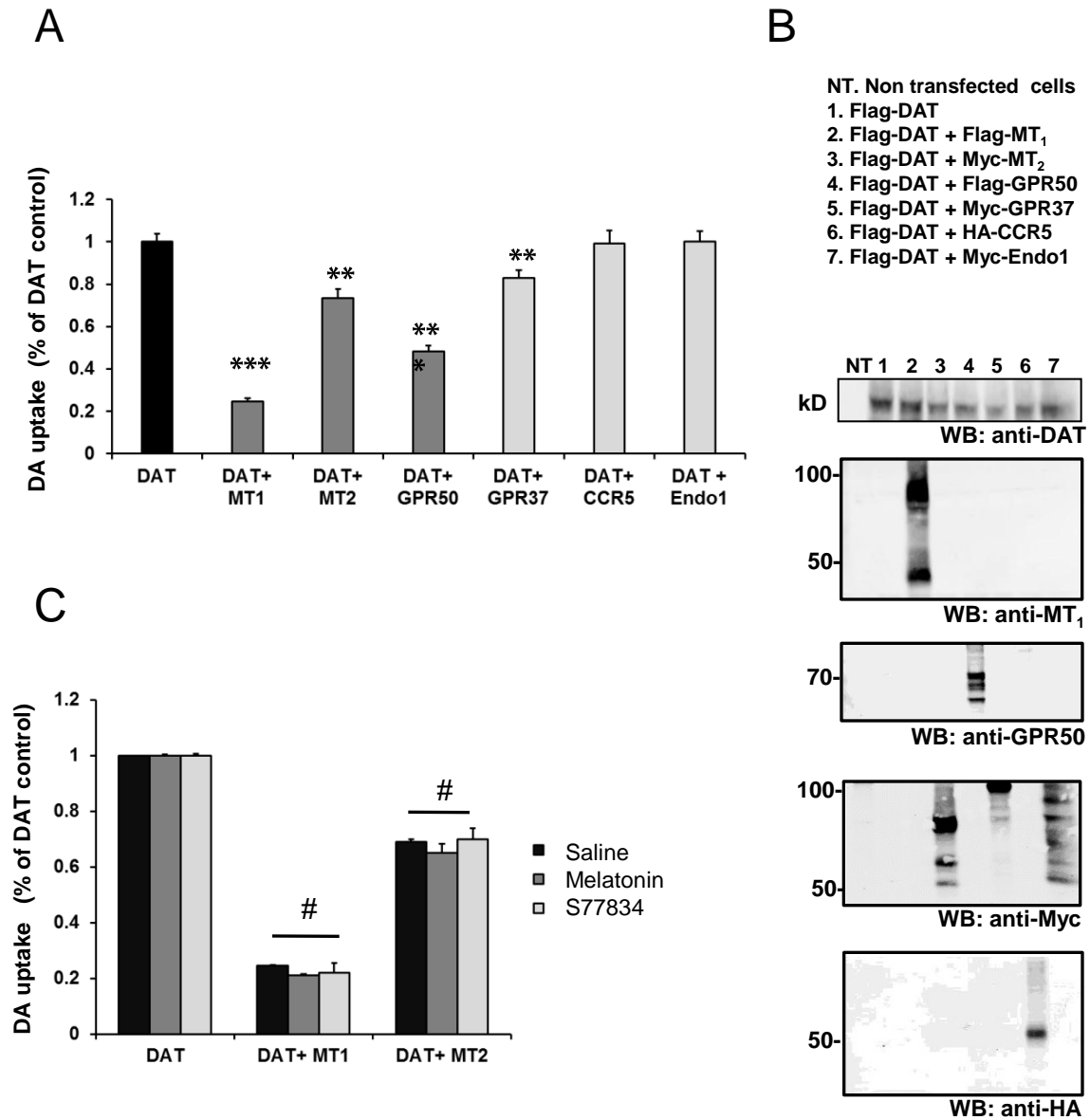


FIGURE 2. MTRs decrease DA uptake. (A) DA uptake in HEK293T cells expressing Flag-DAT alone or with Flag-MT₁, Myc-MT₂, Flag-GPR50, Myc-GPR37, HA-CCR5 or Myc-Endospanin1 (Endo1). 48 H post-transfection, cells are assessed for DA uptake by incubating cells for 5 minutes with 20 nM ³H-DA with or without nomifensine (25 μM) to define the non-specific binding. Data are expressed as relative specific uptake compared to the DAT alone. (B) Western-blot analyses showing the expression of proteins from panel A. (C) Dopamine uptake in HEK293T cells stimulated or not with 1 μM of melatonin for 30 min or with 1 μM of the inverse agonist during 30 min as indicated. # not statistically different. **P < 0.01 and ***P < 0.005, with respect to vehicle (t tests).

Figure 3

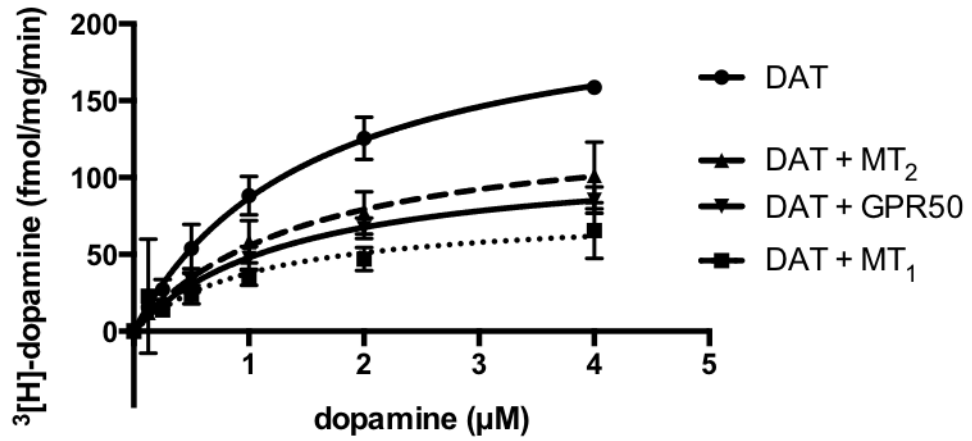
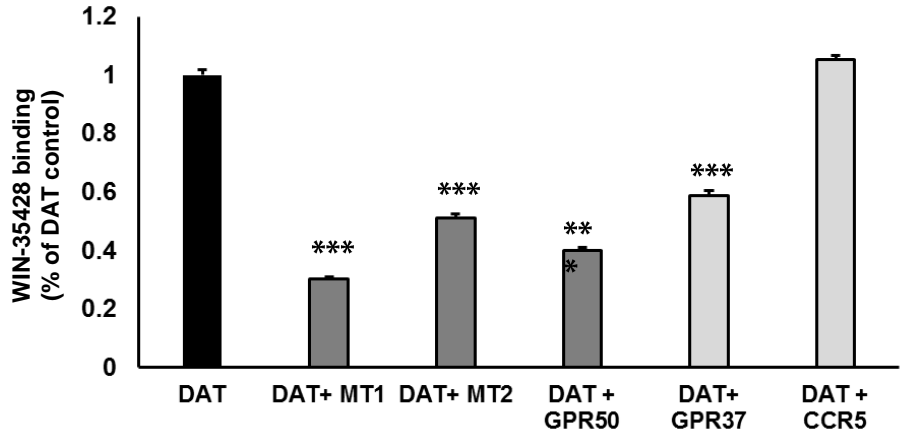


FIGURE 3. MTR do not affect the affinity of DAT for DA. Kinetic of DA uptake in HEK293T cells: Cells expressing DAT with the indicated receptors were incubated with 20 nM of ³H-DA and increasing concentrations of unlabeled DA as mentioned in the scale. For each point, the non-specific uptake was assessed in the presence of 25 µM of nomifensine.

Figure 4

A



B

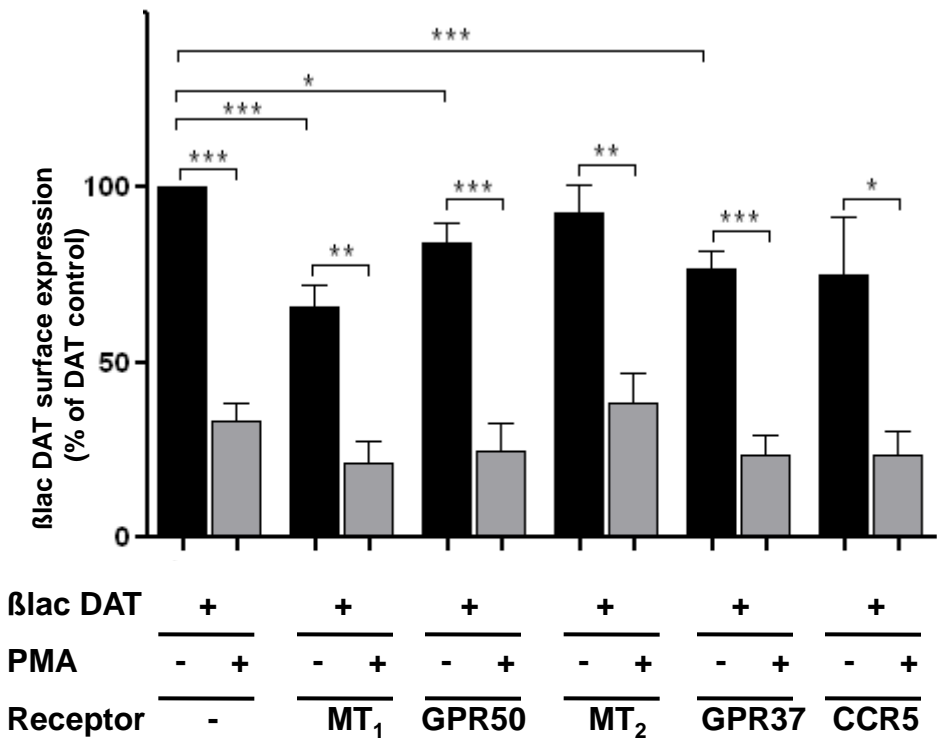


FIGURE 4. MTRs decrease DAT cell surface expression. (A) total DAT binding sites at the cell surface measured by the cocaine analogue ³H-WIN-35428. Cells where transfected with DAT alone or with the indicated proteins. 500000 cells / well were incubated 30 min at room temperature with 4 nM of [N-methyl-³H]WIN-35428]. Non-specific binding was evaluated in the presence of 25 μM of nomifensine and deduced from the values presented in the graph. Data are presented as mean ± SEM; n=3. (B) β-lactamate assay. The β-lac-DAT fusion protein was expressed alone or with the indicated proteins and treated or not with 1 μM PMA for 30 min prior to the experiment.

Figure 5

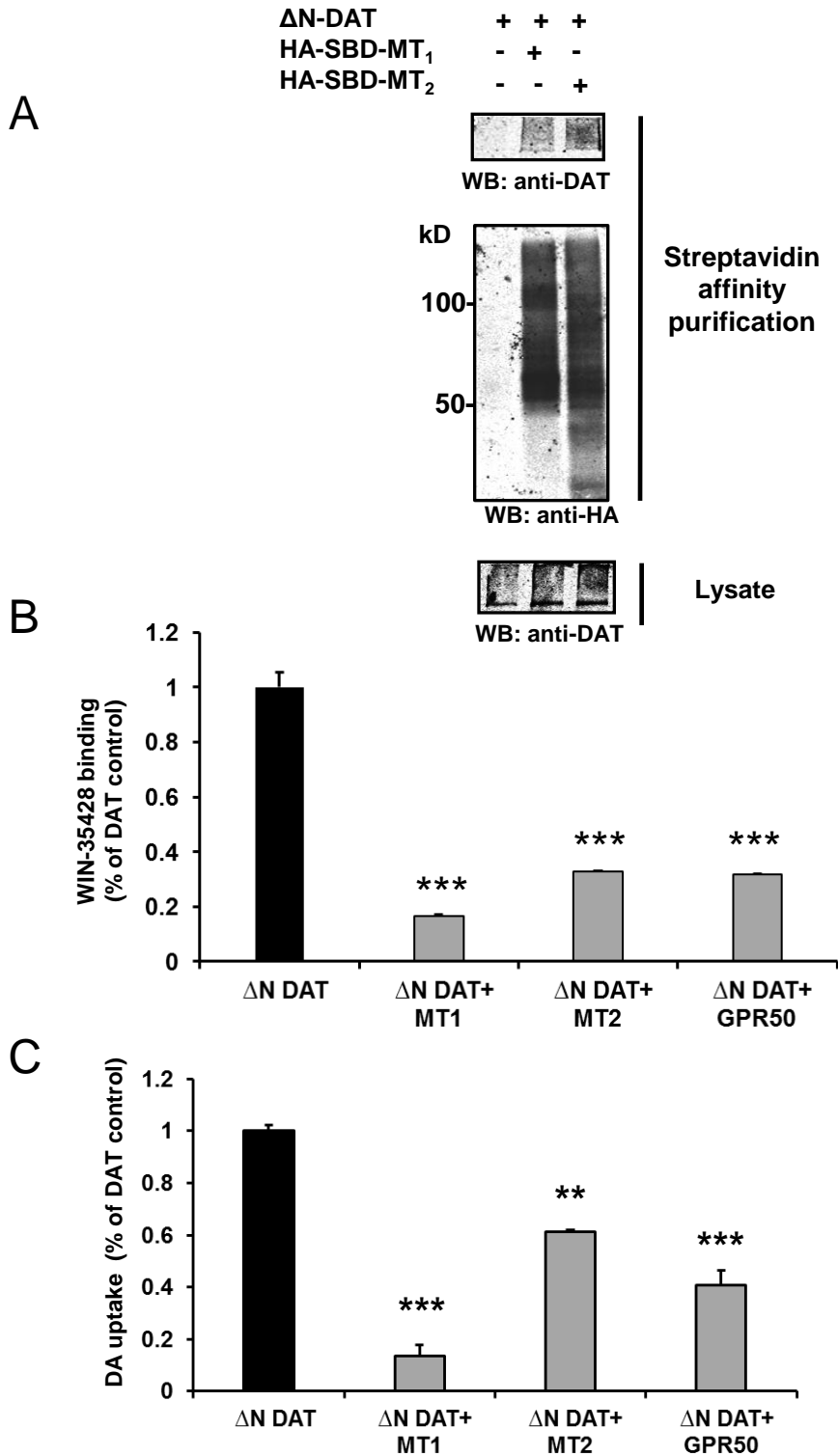
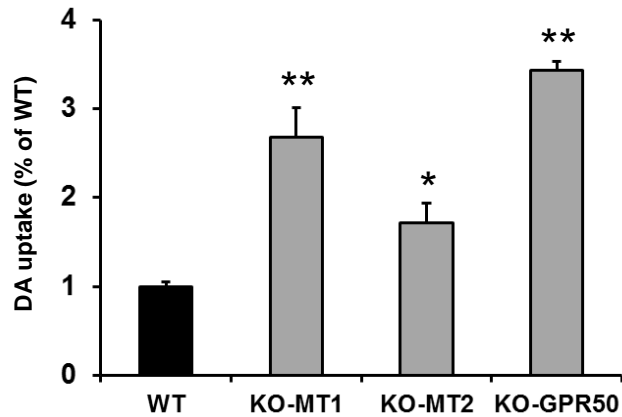


FIGURE 5. Influence of MTRs on the N-terminally truncated DAT. (A) Δ N-Flag-DAT is pulled-down with HA-SBD-MT₁ and HA-SBD-MT₂ (SBD = streptavidin binding domain) on streptavidin coated beads. Data are representative of three experiments. (B) [N-methyl-³H]WIN-35428 binding in HEK293T cells expressing Δ N-Flag-DAT alone or with the indicated proteins. (C) DA uptake in HEK293T cells transiently co-expressing Δ N-Flag-DAT with the indicated proteins. MTRs decreased DA uptake even with the N-terminally truncated DAT. Non specific binding was assessed in the presence of 25 μ M nomifensine. **P < 0.01 and ***P < 0.005, (t tests). Data in panels B and C are presented as mean \pm SEM; n=3.

Figure 6

A



B

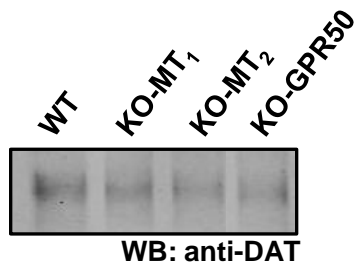
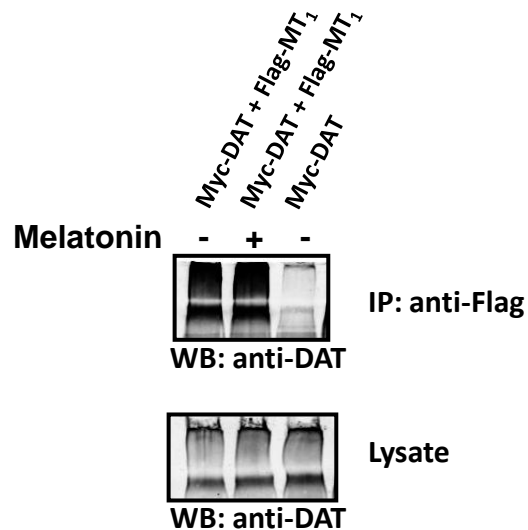


FIGURE 6. The lack of MTRs enhances DAT activity in mice synaptosomes: (A) Mice lacking MT_1 , MT_2 or GPR50 receptors exhibit an enhanced DA uptake: specific 3H -DA (20 nM) uptake on 100 μ g of striatal synaptosomes of the indicated mice strains. The rate of DA uptake in the absence of MTRs was 317 ± 22 fmol/mg/min. Data are presented as mean \pm SEM; n=5. (B) Western-blot analysis for the expression on DAT in 24 μ g of striatal synaptosomes. Data are representative of three experiments. *P < 0.05 and **P < 0.01 (t tests).

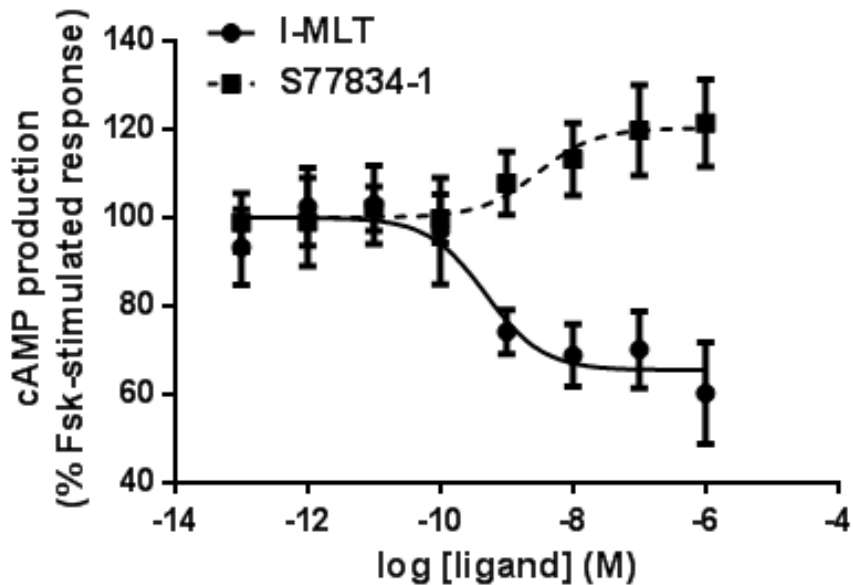
Supplementary Figure 1



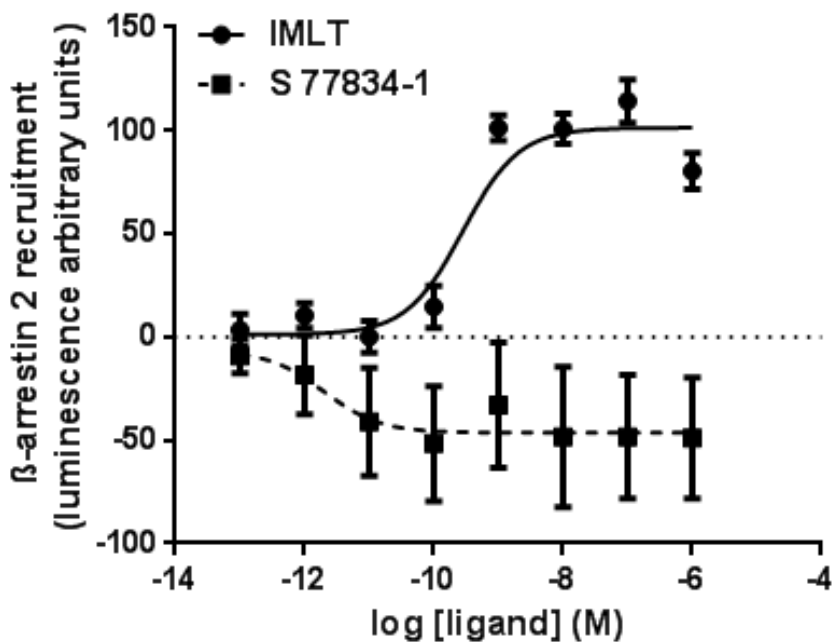
Supp. Figure 1. Co-IP between Flag-MT₁ and Myc-DAT after melatonin treatment (1 μ M, 30 min) with anti-Flag antibodies for the immunoprecipitation. The presence of DAT in lysates and precipitates was revealed by western blot with anti-DAT antibodies in the presence or in the absence of melatonin. Similar results were obtained in two additional experiments.

Supplementary Figure 2

A

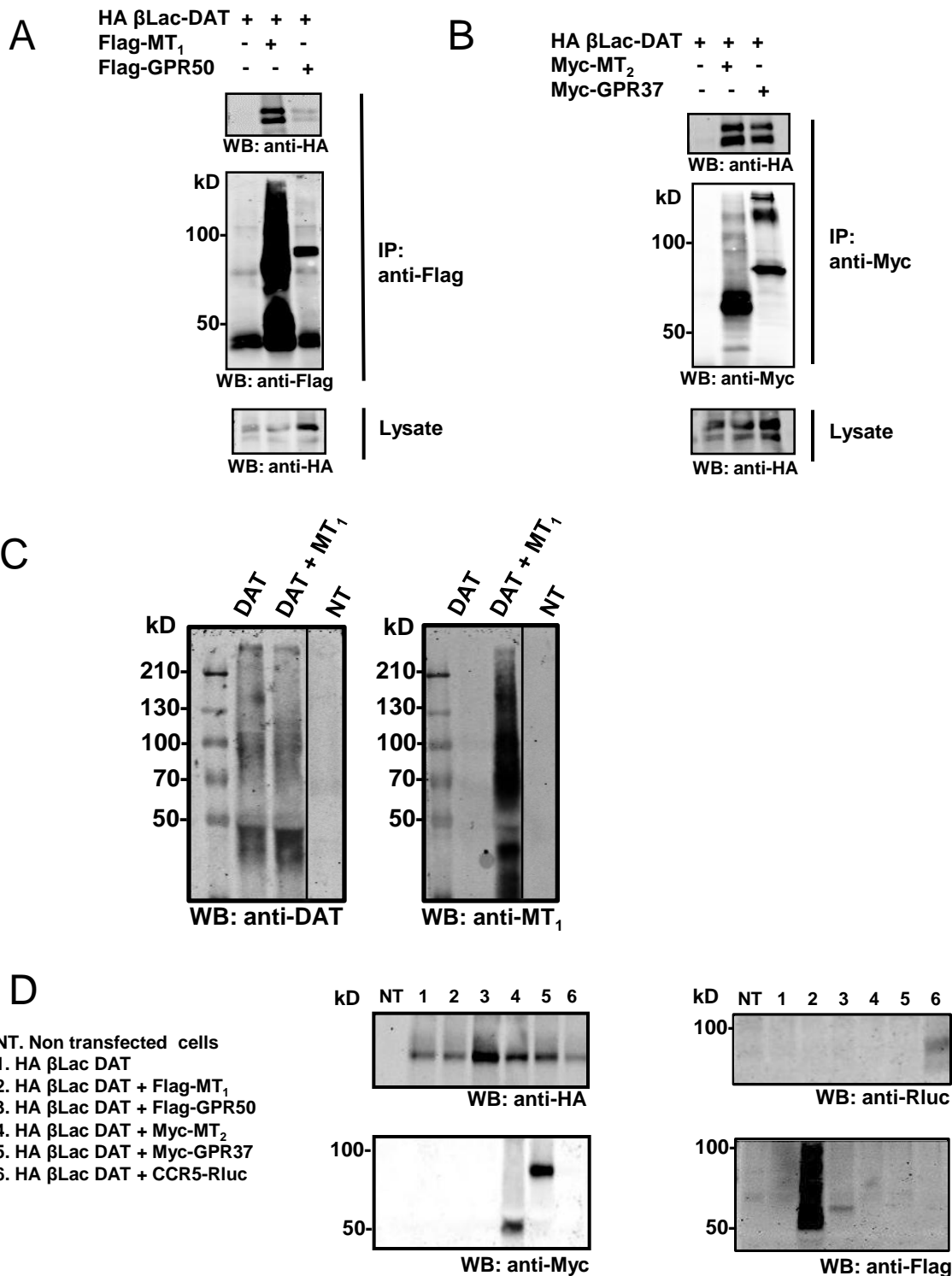


B



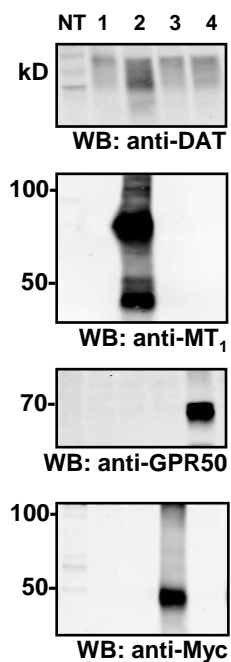
Supp. Figure 2. Effect of iodomelatonin (I-MLT) (●) and S77834-1 (■) on (A) forskolin (Fsk)-stimulated cAMP production or (B) β -arrestin 2 recruitment measured with the DiscovRx pathHunter β -ARR assay in HEK293 cells expressing MT_2 receptors. Data represent the mean SEM of at least three independent experiments performed in triplicates.

Supplementary Figure 3



Supp. Figure 3. β lac-DAT interacts with MTRs. HEK293T cells expressing the indicated proteins were immunoprecipitated with anti-Flag (A) or anti-Myc (B) antibodies and then analyzed by western blot for the presence of co-immunoprecipitated DAT. (C) Western-blot analysis of the expression profile of Myc-DAT expressed alone or with Flag-MT₁ in HEK293T cells. (D) Western blot analysis of the expression of β lac-DAT with the indicated antibodies in cell lysates. Similar results were obtained in two additional experiments. Vertical lines have been inserted to indicate repositioned gel lanes.

Supplementary Figure 4

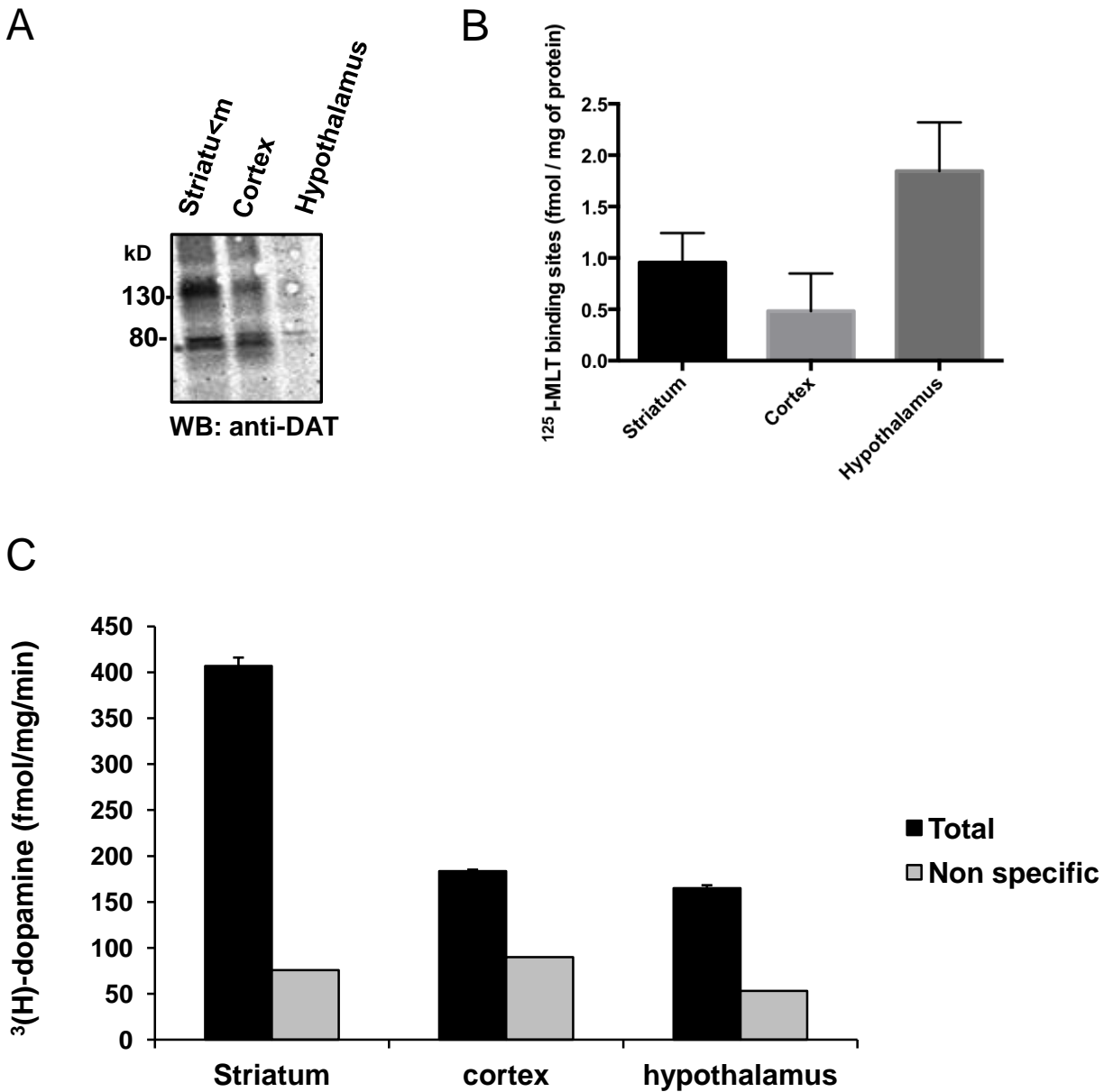


NT. Non transfected cells

1. Flag- Δ N DAT
2. Flag- Δ N DAT + Flag-MT₁
3. Flag- Δ N DAT + Myc-MT₂
4. Flag- Δ N DAT + GPR50

Supp. Figure 4. Western blot analysis of the expression of Δ N DAT the other indicated proteins in cell lysates. Similar results were obtained in two additional experiments.

Supplementary Figure 5



Supp. Figure 5. DAT is expressed in the striatum, in the hypothalamus and in the cortex. (A) Western blot analysis on 100 μg of synaptosomal fraction of mice striatum, cortex and hypothalamus using anti-DAT antibodies. The blot shows that DAT is expressed at various levels in all three brain regions. (B) Number of specific 2- ^{125}I -iodomelatonin binding sites in presynaptic membranes from rat striatum, hypothalamus and cortex. (C) ^3H -DA uptake assay on 100 μg of synaptosomes from different brain regions as indicated, in the absence or in the presence of 25 nM of nomifensine to define the non-specific uptake.

Discussion de l'article 3:

1) Généralités sur la physiologie du transporteur de la dopamine

Le transporteur de la dopamine DAT (SLC6A3)

DAT appartient à la famille des transporteurs SLC. Cette famille compte approximativement 350 protéines classées en 55 groupes. SLC est la deuxième plus grande classe des protéines membranaires après les RCPG (800 protéines) et avant les canaux ioniques dépendant du voltage (143 protéines) et les récepteurs enzymatiques (105 récepteurs). Le sous-groupe SLC6 comprend plusieurs transporteurs très similaires d'un point de vue structural : le transporteur de la dopamine DAT, de la sérotonine SERT, de la noradrénaline NET, 4 transporteurs du GABA (GAT1-3 et BGT1) et deux transporteurs de la glycine (GLYT1 et GLYT2). Ces protéines sont notamment les principaux régulateurs de l'homéostasie des neurotransmetteurs au niveau du système nerveux (Fredriksson et al ; 2008) (Kristensen et al ; 2011).

DAT a été cloné en 1992 puis cristallisé en 2013. Il possède 620 acides aminés organisés en 12 domaines transmembranaires avec des extrémités Nter et Cter cytoplasmiques (Giros et al ; 1992) (Penmatsa et al ; 2013) (Figure 25). DAT transporte la dopamine de manière active en se servant du gradient de sodium. La recapture d'une molécule de dopamine est alors accompagnée par une entrée de deux ions Na^+ et un ion Cl^- , le tout contrebalancé par la sortie d'un ion de K^+ (Gu et al ; 1994).

La plupart des données relatives aux fonctions physiologiques de DAT proviennent de l'étude des souris KO-DAT. Au niveau du striatum, les mesures par micro-dialyse indiquent que les taux de la dopamine extracellulaire chez les souris KO sont 5 fois plus élevés que chez les souris *WT* (Giros et al ; 1996). Les mesures en « temps réel » de la clairance et de la libération de la dopamine par voltamétrie cyclique indiquent que la dopamine persiste dans le milieu extraneuronal 300 fois plus longtemps que chez les souris *WT*. A cet égard, il faut savoir que la clairance de la dopamine au niveau du striatum chez les souris KO-DAT est uniquement due aux phénomènes de diffusion du fait qu'aucun transporteur ne compense la délétion de la protéine DAT dans le striatum (Giros et al ; 1996) (Jones et al ; 1998).

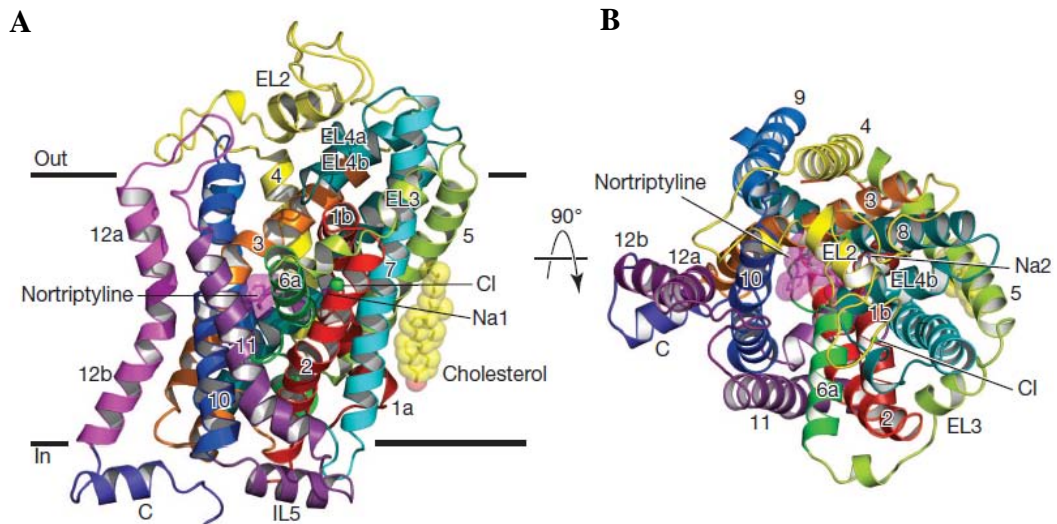


Figure 25 : Structure du transporteur de la dopamine cristallisé en présence de la molécule antidépresseur la Nortriptyline (résolution : 3Å). Architecture du transporteur de la dopamine DAT de la drosophile. A) vue face à la membrane plasmique. B) vue face à la surface cellulaires. DAT s'organise en 12 domaines transmembranaires avec deux extrémités cytoplasmiques. La Nortriptyline, les ions Na, Cl et le cholestérol sont représentés respectivement en rose, en gris, en vert et en jaune (Penmatsa et al ; 2013).

Une fois recapturée par DAT, la dopamine est prise en charge par le transporteur vésiculaire VMAT₂ pour être directement réintroduite dans les vésicules synaptiques. En effet DAT se localise à proximité des vésicules synaptiques VS. De plus, il interagit directement avec la protéine vésiculaire Synaptogrine-3 et avec la protéine tSNARE syntaxine1 (Egaña et al ; 2009) (Lee et al ; 2004). En conséquence de cette fonction, les souris KO-DAT présentent une réduction de 95 % de la dopamine totale du cerveau. En outre, la quantité de la dopamine libérée par les neurones est de 75 % inférieure par rapport aux souris *WT*. Ce paradoxe s'explique par le fait que la recapture de la dopamine par DAT est importante pour le stockage vésiculaire de la dopamine (Jones et al ; 1998).

2) La discussion des résultats expérimentaux

Le transporteur de la dopamine DAT a été identifié comme partenaire d'interaction du récepteur de la mélatonine MT₁ par la technique MYTH. Les résultats de ce crible indiquent que deux clones de 330 et 342 acides aminés appartenant à la partie N-terminale de DAT, interagissent avec MT₁. Par ailleurs, de par le principe du Y2H et de sa variante MYTH, l'interaction de MT₁ avec DAT est très probablement binaire. A cet égard, le transporteur de la dopamine a été montré interagir avec plusieurs partenaires protéiques et notamment avec le récepteur de la dopamine D2. L'interaction de DAT avec D2 se fait de manière directe et implique le domaine Nter du transporteur (Lee et al ; 2007).

Dans notre étude, nous avons validé le résultat du MYTH par co-immunoprécipitation et par la technique du BRET dans les cellules HEK293. Nous montrons que DAT interagit non seulement avec MT₁ mais probablement aussi avec les deux autres membres de la famille des récepteurs de la mélatonine MT₂ et GPR50. En effet, ces trois récepteurs partagent environ 45 % d'homologie de séquence au niveau de la protéine entière et plus de 60 % au niveau des domaines transmembranaires. Ceci laisse penser que l'interaction entre DAT/MTR fasse intervenir des motifs de reconnaissances qui sont conservés au sein de la famille des récepteurs de la mélatonine. De plus, MT₁, MT₂ et GPR50 inhibent l'activité de DAT dans les cellules HEK293, ce qui fait de cette étude la première de son genre à montrer une interaction fonctionnelle entre un transporteur SLC6 et tous les membres d'une famille de récepteurs couplés aux protéines G (Kristensen et al ; 2011).

Nous avons inclus dans notre étude le récepteur GPR37, un RCPG qui interagit avec DAT et qui inhibe son expression à la surface cellulaire. Ceci diminue l'activité de DAT d'environ 10% dans des préparations synaptosomales (Marazziti et al ; 2007). Dans notre système cellulaire, nous avons pu valider l'effet inhibiteur de GPR37 sur l'activité de DAT (une diminution d'environ 20 %) mais les récepteurs de la mélatonine semblent tous induire une inhibition plus forte : MT₁ induit une

diminution de 75 %, GPR50 de 50%, et MT₂ de 30 %. A noter que les contrôles négatifs CCR5 et endospinin-1 n'induisent aucun changement, ce qui démontre la spécificité de l'effet observé.

Parmi tous ces récepteurs, MT₁ et MT₂ sont les deux isomères les plus proches avec 60% d'homologie de séquence, bien que l'amplitude de l'inhibition de DAT soit différente par ces deux protéines. Pour savoir si les différences au niveau de l'expression de MT₁ et de MT₂ dans les cellules sont à l'origine de cette disparité, nous avons co-exprimé DAT avec deux récepteurs MT₁ et MT₂ fusionnés à la même étiquette, puis nous avons quantifié l'expression relative des deux protéines avec le même anticorps (Résultats non montrés). Le résultat obtenu montre qu'à des niveaux d'expression similaires, MT₁ préserve un plus grand effet inhibiteur sur DAT par rapport à MT₂. On peut donc conclure que les différences des effets des RCPG testés dans notre étude soient inhérentes à chaque récepteur. Nous avons par ailleurs, comparé les séquences des MTR avec GPR37 et avec CCR5 dans le but d'identifier un motif commun aux MTR et à GPR37 (responsables de l'effet sur DAT) mais hélas, ce fut sans succès et nous n'avons pas pu mettre en évidence des motifs communs entre MTR et GPR37, absents chez CCR5. Pour pouvoir identifier le motif d'interaction des MTR, on pourrait par exemple envisager la construction de récepteurs chimériques entre MT₁ et CCR5 puis tester leurs effets sur le transporteur.

L'analyse des données du MYTH, de la co-immunoprécipitation et du BRET est compatible avec une interaction directe par hétérodimérisation. L'exemple de MT₁ et de MT₂ suggère que les deux protéines pourraient s'engager de manière différente structurellement parlant dans le complexe (DAT/MT₁) par rapport à (DAT/MT₂). Les interfaces d'interactions peuvent notamment être différentes entre les deux complexes et ceci paraît d'autant plus probable que les analyses du BRET suggèrent une orientation des étiquettes du donneur et d'accepteur d'énergie qui sont différentes entre (DAT/MT₂) et (DAT/MT₁). L'absence de courbe saturable de BRET entre le donneur et l'accepteur d'énergie du couple (DAT/MT₂) peut également s'expliquer par une interaction indirecte entre les deux protéines. DAT n'a d'ailleurs pas été identifié dans le crible MYTH de MT₂. Cependant, la conservation de l'effet fonctionnel entre les membres de la famille des récepteurs de la mélatonine y compris GPR50 plaide en faveur d'un certain niveau de similitude concernant le mode d'interaction et favorise la conclusion d'une interaction directe entre MT₂ et DAT.

Les données bibliographiques indiquent que la relation fonctionnelle de DAT avec les RCPG peut ne pas dépendre uniquement d'une interaction physique. A cet égard, la stimulation du récepteur D2 peut moduler l'activité de DAT via une interaction protéine-protéine directe (Lee et al ; 2007) ou par l'activation de la voie MAPK dépendante du récepteur (Bolan et al ; 2007). Aussi, le récepteur D3 module le trafic de DAT par l'activation des voies MAPK et PI3K, sans que D3 interagisse avec DAT (Zapata et al ; 2007).

Un grand nombre d'études montre que la régulation de DAT se fait essentiellement au niveau de son trafic. En effet, la disponibilité du transporteur à la surface de la cellule constitue le paramètre déterminant de l'activité « d'uptake ». DAT subit une internalisation constitutive dans les neurones et dans les lignées cellulaires transfectées; sa localisation est en équilibre entre la surface cellulaire et entre les compartiments internes des endosomes et du ER/Golgi (Eriksen et al ; 2009) (Sorkina et al ; 2005) (German et al ; 2012). Ce trafic est régulé par l'activation des cascades de signalisation intracellulaires (principalement la PKC, mais aussi la PKA, MAPK et JNK entre autres) qui se traduisent par des modifications post-traductionnelles ciblant le domaine Nter du transporteur (Eriksen et al ; 2010). De ce fait, le DAT humain peut être phosphorylé sur huit résidus sérines entre les acides aminés 1 et 53 (Foster et al ; 2002) (Gorentla et al ; 2009) (Miranda et al ; 2007) et peut subir une ubiquitination sur les résidus lysines 19, 27 et 35 suite à l'activation de la PKC (Miranda et al ; 2007). Ces modifications post-traductionnelles provoquent l'internalisation du récepteur et/ou à sa dégradation (Cervinski et al ; 2005) (Sorkina et al ; 2005) (Miranda et al ; 2005). Plus intéressant encore, ces motifs post-traductionnels peuvent également être responsables d'une réversion du transport de la dopamine. En effet, DAT est capable de générer un efflux sortant de la dopamine suite à des modifications post-traductionnelles au niveau de son domaine Nter. Par exemple, la phosphorylation des serines 7 et 12 suite au traitement par l'amphétamine reverse le flux de DAT (Khoshbouei et al ; 2004) (Leviel ; 2011). Ce rétro-transport a également été décrit suite à l'activation de la PKC par certains RCPG comme le récepteur TAAR1 (trace amine-associated receptor 1), mGluR de type I, le récepteur muscarinique M3 et NK-1 (human substance P receptor) (Xe & Miller ; 2007) (Opazo et al ; 2010) (Grånäs et al ; 2003). Opazo *et al.* montrent que l'activation des RCPG couplés aux protéines Gq comme mGluR1 et mGluR5 induit un rétro-transport de la dopamine suite à l'activation de la PKC. Ce rétro-transport peut être observé dans les cellules transfectées et sur des coupes de cerveau de rat. Aussi, le blocage de DAT par des antagonistes abrogerait cet efflux.

Pour toutes ces raisons, il nous a paru essentiel d'évaluer la stimulation de MT₁ et MT₂ par la mélatonine sur l'activité de DAT. Nous avons alors montré que l'incubation des cellules avec la mélatonine n'a pas d'effet sur l'activité de DAT. De plus l'agoniste inverse S77834 de MT₂ est également sans effet, ce qui exclut une régulation faisant intervenir l'activité constitutive de MT₂ ou l'activation de la voie Gq/PKC par MT₁. L'ensemble de ces résultats indique que l'inhibition de DAT par les MTR se fait de manière indépendante de la présence du ligand et de l'activation des cascades de signalisation intracellulaire, mais de manière dépendante de la formation de complexes hétéromériques.

A ce sujet, les interactions DAT-partenaires constituent un moyen alternatif pour réguler la disponibilité du transporteur à la surface de la cellule (Eriksen et al ; 2010) (Marazziti et al ; 2007). DAT est montré interagir avec une dizaine de partenaires régulateurs (Eriksen et al ; 2010). De manière intéressante, ces partenaires modulent l'activation de DAT et la régulation de son trafic, sans

pour autant affecter l'affinité de la dopamine pour DAT. Ceci rejoint en effet nos résultats obtenus dans les cellules HEK293.

La régulation de l'expression de surface de DAT par les partenaires régulateurs peut se faire de différentes manières : En ce qui concerne les partenaires qui potentialisent l'expression de surface de DAT, l'exemple de D2 montre une inhibition de l'endocytose et l'exemple de la protéine Parkin indique qu'elle entraîne une dégradation spécifique des transporteurs mal repliés (Lee et al ; 2007) (Jiang et al ; 2004), ces deux exemples sont décrits dans le corps de l'article 3.

Pour ce qui est des protéines qui diminuent l'activité de DAT comme les cas des MTR, la protéine α -synucléine caractéristique de la maladie de Parkinson induit une diminution de l'expression à la surface de DAT suite à une rétention au niveau du compartiment RE. L' α -synucléine interfèrerait avec le transport des protéines du RE vers le Golgi. Cet effet touche cependant tout le système de trafic cellulaire entre le RE et Golgi sans spécifié pour DAT (Oaks et al ; 2013) (Thayanidhi et al ; 2010). Par ailleurs, la syntaxine1 entraîne une diminution de DAT à la surface des cellules transfectées et au niveau du striatum, mais les auteurs n'expliquent pas le mécanisme de la rétention cellulaire (Cervinski et al ; 2010).

Enfin, l'exemple de synaptogrine-3 est d'autant plus intéressant que cette protéine interagit avec DAT dans les cellules HEK293 et au niveau des synaptosomes. Cependant, elle ne diminue l'expression de surface de DAT que dans les tissus nerveux mais pas dans les systèmes d'expression hétérologue dépourvus de vésicules synaptiques. Aussi, l'effet de la synaptogrine-3 est dépendant de la présence du transporteur vésiculaire VMAT₂ et des vésicules de neurotransmetteurs (Egaña et al ; 2009).

A la lumière de ces différents exemples et au vu de nos propres résultats obtenus avec le β -CFT et avec le mutant de délétion ΔN -(1-55)-DAT, l'effet inhibiteur des MTR sur DAT repose très probablement sur l'interaction entre les MTR et le transporteur. Cette interaction n'affecte pas l'affinité de DAT à la dopamine, mais se traduit très probablement par la rétention intracellulaire du transporteur qui est à l'origine de la baisse de la recapture de la dopamine au niveau membranaire. L'effet des MTR est constitutif et indépendant de la régulation de l'endocytose de DAT par l'activation des voies de signalisation des MTR ou par des modifications post-traductionnelles qui touchent le domaine Nter du transporteur.

Nos observations dans les cellules HEK293 transfectées semblent être compatibles avec nos résultats obtenus sur l'animal. L'inactivation des gènes *MTNR1A*, *MTNR1B* et *GPR50* chez la souris C75BL/6 lève l'inhibition sur le transporteur DAT. Les souris KO pour les trois récepteurs affichent une recapture de dopamine potentialisée, sans que les niveaux d'expression de DAT ne soient augmentés dans le striatum de ces animaux. L'augmentation de l'activité de DAT chez les souris KO pour les MTR a également été validée dans l'hypothalamus, mais pas dans le cortex (résultats non

publiés). Ceci est probablement dû à une expression faible des MTR au niveau de cette structure, comme indiqué dans notre étude. Le choix du striatum, repose sur le fait que c'est une structure principalement composée de neurones dopaminergiques qui affichent les niveaux d'expression de DAT les plus importants au niveau du cerveau. De plus, le striatum constitue la structure où DAT est l'unique transporteur responsable de la recapture de la dopamine. En effet, pour d'autres régions, DAT est responsable de la recapture de 50 % seulement de la dopamine extraneuronale dans le cortex et le reste se fait par d'autres transporteurs SLC6 (Wayment et al ; 2001). Dans l'hippocampe, c'est le transporteur de la noradrénaline NET qui est responsable de la déplétion de la dopamine à ce niveau (Borgkvist et al ; 2012).

La relevance fonctionnelle de nos observations nécessite de valider la coexpression et l'interaction de MTR et DAT au niveau du cerveau. A cet égard, la présence des MTR dans le striatum n'a cependant pas été clairement établie dans la littérature, seule quelques études au niveau messagers sont rapportées: des expériences de PCR sur cellule unique ont montré que l'ARNm codant pour le récepteur MT₁ est exprimé dans tout le système dopaminergique central, y compris la zone ventrale tégumentaire, la substance noire et le striatum (Uz et al ; 2005). La localisation de l'ARNm dans la substantia nigra suggère que la protéine est exprimée dans les terminaux des neurones se projetant dans le striatum, ce qui confirme notre étude de liaison avec la ¹²⁵I-iodomélatonine au niveau de cette structure. L'absence d'anticorps dirigés contre les récepteurs MT₁ et MT₂ chez les rongeurs ne permet malheureusement pas de conclure quant à l'isoforme du récepteur exprimé dans le striatum. Par contre, l'utilisation des souris KO et de ligands sélectifs pour le récepteur MT₂ comme le IIK-7 décrit dans l'article 1, ou encore celle de nouveaux radioligands sélectifs récemment décrits (Legros et al ; 2013) nous permettra de répondre à cette question lors de prochaines expériences.

En définitive, il est intéressant de noter que l'équipe de N. Zisapel avait en 1988 testé la liaison de la ¹²⁵I-mélatonine au niveau de plusieurs structures du cerveau. Elle rapporte alors dans sa publication que : *“The data demonstrate the presence of ¹²⁵I-melatonin-binding sites in the hypothalamus and striatum of the male as previously found in the female rat, thus qualitatively confirming the results obtained with [3H]melatonin. The presence of melatonin-binding sites in the hypothalamus may have a physiological relevance, since a number of studies have implicated the hypothalamus as the main site of melatonin's neuroendocrine activities. The role of the striatal I-melatonin-binding sites is still an enigma”* (Zisapel et al; 1988). A la lumière de ce qui précède, peut-être serions-nous en passe de découvrir le rôle des MTR au niveau du striatum. Quoi qu'il en soit, nous décrivons dans cet article 3 un nouveau rôle physiologique de la famille des récepteurs de la mélatonine. Cette fonction peut être impliquée dans la régulation du circuit dopaminergique nigrostriatal et mésolimbique (addiction, mémoire, motivation, locomotion etc).

Discussion générale et perspectives

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude des partenaires protéiques associés aux récepteurs couplés aux protéines G. Les changements de fonction, de signalisation et de profil pharmacologique induits par l'hétérodimérisation des RCPG entre eux, ou avec des protéines régulatrices, constituent les principaux aspects présentés dans ce mémoire. Les travaux ont essentiellement porté sur les récepteurs de la mélatonine MT_1 , MT_2 et GPR50 qui sont notamment des protéines bien caractérisées dans mon laboratoire d'accueil, du point de vue de leur empreinte pharmacologique et signalétique entre autre.

Les récepteurs de la mélatonine font partie de la classe A des RCPG. MT_1 et MT_2 présentent une taille de séquence peptidique moyenne par rapport à l'ensemble des RCPG (environ 350 acides aminés). Le récepteur GPR50 possède quant à lui, un long domaine Cter qu'il aurait acquis au cours de l'évolution au détriment de sa capacité à lier la mélatonine.

D'un point de vue phylogénétique, les récepteurs de la mélatonine forment l'embranchement le plus proche de la rhodopsine inactive (Navajas et al ; 1996) (Fredriksson et al ; 2003). Ils présentent notamment les caractéristiques générales de la classe A des RCPG à savoir : (i) la présence du motif DRY que la mutation en résidus NRY semble conférer la forte affinité des récepteurs pour la mélatonine (Nelson et al ; 2001), (ii) la présence du pont disulfure qui maintient la structure des récepteurs (Mseeh et al ; 2002) et (iii) les sites de glycosylation et de palmitoylation indispensables pour la signalisation et le trafic de ces protéines (Sethi et al ; 2008) (Ebisawa et al ; 1994).

La signalisation de MT_1 et de MT_2 présente à la fois des similitudes et des différences intéressantes d'un point de vue physiologique (Brydon et al ; 1999) (Liu et al ; 1997) (Dubocovich et al ; 1998). Aussi, à l'instar de la plupart des RCPG, tous les membres de la famille des récepteurs de la mélatonine sont capables de s'homodimériser et de s'hétérodimériser (Ayoub et al ; 2002) (Levoye et al ; 2006). De manière intéressante, des effets allostériques se produisent au sein des hétérodimères. A titre d'exemple, les hétérodimères MT_1/MT_2 présentent une affinité 100 fois plus grande pour le luzindole par rapport aux homomères MT_2/MT_2 (Ayoub et al ; 2004). Aussi, GPR50 ne lie pas la mélatonine, mais n'est pas sans effets vis-à-vis de la régulation de la signalisation cellulaire. En effet, GPR50 inhibe les fonctions de MT_1 au sein du dimère et ce de manière indépendante de l'activation par un ligand (Levoye et al ; 2006).

Tous les points sus- cités font de la famille des récepteurs de la mélatonine un des modèles de choix pour l'étude des RCPG. Dans le cadre de cette thèse, deux aspects généraux intervenant dans la régulation de ces récepteurs ont été traités:

- Les interactions RCPG-RCPG et RCPG-GIP.
- Les conséquences signalétiques et fonctionnelles spécifiques à de telles interactions.

Ces deux aspects sont développés dans les trois articles présentés dans cette étude.

L'article 1 présente la mise en évidence de la formation des hétérodimères MT_1/MT_2 dans la rétine, avec l'occurrence de signalisation et de fonction spécifique à cet hétéromère dans le tissu étudié.

L'article 2 a pour objet la recherche à grande échelle de partenaires d'interaction des récepteurs de la mélatonine, dans le but de découvrir de nouvelles fonctions pour ces récepteurs.

L'article 3 montre l'exemple de la validation d'un couplage fonctionnel entre les RCPG et les partenaires d'interaction, avec une relevance physiologique.

Ces trois thèmes soulignent l'importance de la caractérisation du réceptosome des RCPG. Ils démontrent que l'identification des partenaires d'interaction des RCPG constitue une stratégie efficace pour découvrir de nouvelles fonctions physiologiques associées aux récepteurs d'intérêt. Plusieurs aspects découlant de mon présent travail ont déjà fait l'objet de discussions et ne seront pas repris dans la « Discussion Générale ». De ce fait, les paragraphes suivant rapportent les différentes perspectives ouvertes par ce travail, concernant les fonctions physiologiques des récepteurs de la mélatonine en général et celles du récepteur MT_1 en particulier.

Les modulations allostériques au sein de l'hétérodimère des récepteurs murins MT_1/MT_2 :

Les différences observées entre les profils pharmacologiques des dimères MT_1/MT_1 et MT_2/MT_2 par rapport à MT_1/MT_2 (Ayoub et al ; 2004) et les résultats présentés au niveau de l'article 1, apportent de nouveaux éléments en faveur d'une interaction allostérique entre les deux protomères de l'hétérodimère MT_1/MT_2 . En effet, nous avons mis en évidence une augmentation de l'amplitude et de l'efficacité de la mélatonine sur les voies PLC/PKC. Cet effet est spécifiquement observé dans les cellules qui co-expriment MT_1 et MT_2 par rapport à celles n'exprimant que l'un des récepteurs. De plus, le recours à l'utilisation du mutant non-fonctionnel MT_2 -P95L et à l'activation sélective des protomères du dimère MT_1/MT_2 par différentes concentrations de l'agoniste I1K7, suggère un comportement allostérique positif de MT_2 sur MT_1 au sein du dimère. Par ailleurs, l'absence d'une allostérie négative, généralement observée pour les dimères de RCPG, fait des récepteurs de la

mélatonine un modèle intéressant pour la compréhension moléculaire et structurale des allostéries positives.

Les fonctions neuronales de la mélatonine et de ses récepteurs (exemple de la rétine)

Nous avons montré dans l'article 1 que les récepteurs de la mélatonine sont exprimés par différentes cellules de la rétine telles que les photorécepteurs, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires entre autres. Dans la mesure où ces cellules sont des neurones spécialisés, l'expression des récepteurs de la mélatonine à ce niveau conforte l'hypothèse d'une localisation neuronale de MT₁ et MT₂.

Toutes les cellules de type neuronal présentent une activité sécrétoire. Aussi, le relargage des neurotransmetteurs (NT) par le neurone se fait dans les quelques millisecondes suivant l'élévation du calcium intracellulaire qui peut atteindre 100 μ M au niveau de la zone active. Par ailleurs, les événements de fusion membranaire en vue de la libération des NT requièrent quant à elles, des conditions particulières de concentration calcique, conditions qui dépendent en fait de chaque NT (Sihra et al ; 1992). On comprend alors que la modulation des taux intracellulaires de calcium constitue un moyen supplémentaire pour réguler la neurotransmission. A titre d'exemple, la libération du GABA et du glutamate nécessite des concentrations calciques intracellulaires très élevées par rapport à la dopamine et à la noradrénaline qui sont libérées à des concentrations intermédiaires (Verhage et al ; 1991). Ces phénomènes sont d'autant plus importants pour les synapses doubles qui libèrent plus d'un NT. En effet, ce type de synapse peut contenir des vésicules de NT qui diffèrent au niveau de leur contenu, de leur forme et au niveau des protéines qui composent leur membrane.

Plusieurs études ont démontré l'expression des récepteurs de la mélatonine par les cellules amacrines (Wiechmann & Summers ; 2008). Ces neurones co-libèrent la dopamine et le GABA à partir des mêmes compartiments synaptiques. Aussi, le GABA est connu pour être le principal NT inhibiteur au niveau du système nerveux (Hirasawa et al ; 2012). Il est alors établi que la mélatonine inhibe au cours de la nuit le relargage de la dopamine à partir des cellules amacrines ; tandis que la dopamine inhibe la sécrétion de la mélatonine pendant le jour. A la différence de la mélatonine, la dopamine est contenue dans des vésicules de sécrétion et son relargage dépend de la concentration intracellulaire de calcium. A cet égard, le Dr Dubocovich a montré que la mélatonine inhiberait la sécrétion de la dopamine, soit directement en agissant sur la libération des vésicules dopaminergiques, soit indirectement par l'activation des récepteurs ioniques GABAergique au sein d'un circuit inhibiteur de la libération de la dopamine (Dubocovich ; 1983).

Le récepteur MT₁ est un régulateur présynaptique

L'analyse de l'ensemble de mon travail apporte plusieurs arguments en faveur du rôle de MT₁ en tant que modulateur présynaptique. La proximité spatiale entre MT₁ et les composants de la machinerie de l'exocytose (SNAP25, synapsine, Munc-18, Ca_v2.2) est un des éléments qui ont laissé penser que MT₁ peut être localisé au niveau de la zone active. De manière intéressante, MT₂ ne recrute ni la synapsine ni SNAP25 et ce en dépit d'une forte homologie de séquence avec l'isoforme MT₁. L'effet fonctionnel de MT₁ sur Ca_v2.2 vient étayer notre hypothèse, si l'on considère notre étude parallèlement aux travaux des Dr Zisapel et Dubocovich. Ces derniers démontrent le rôle de la mélatonine dans l'inhibition du relargage de la dopamine, et ce de manière dépendante des flux calciques au niveau de la rétine et au niveau de différentes structures du cerveau. Au vu de nos résultats, on peut alors fortement suggérer l'implication des récepteurs MT₁ présynaptiques qui inhiberaient les canaux Ca_v2.2 résultant en l'inhibition de la libération de dopamine. Toutefois, nous ne pouvons affirmer dans l'immédiat, que l'effet inhibiteur de MT₁ sur les canaux calciques puisse concerner uniquement la libération de la dopamine. A cet égard, nos résultats sont tout à fait compatibles avec un effet inhibiteur de la mélatonine sur la libération d'autres NT, dans des neurones co-exprimant MT₁ et Ca_v2.2. Cette question sera prochainement abordée en utilisant des neurones en culture ou des synaptosomes préparés à partir de différentes régions du cerveau, avec ou sans traitement par la mélatonine.

L'adressage vers l'axone des récepteurs de la mélatonine

Les neurones sont des cellules polarisées et l'adressage des protéines vers l'axone est sujet à une régulation très fine. Dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe, nous avons montré que MT₁ présente clairement une localisation axonale tandis que MT₂ est localisé au niveau des dendrites. L'adressage axonal est un processus encore mal connu, mais qui peut dépendre du réseau de transport transgolgien acheminant les protéines axonales directement à ce compartiment. De plus, les protéines nouvellement synthétisées peuvent être adressées vers les dendrites par défaut, puis être reconduites vers l'axone par la suite, si elles présentent des motifs d'adressage particuliers (Lasiecka et al ; 2008). En ce qui concerne nos récepteurs d'intérêt, l'adressage de MT₁ dans l'axone peut être lié à son activité constitutive qui est connue pour être plus marquée que celle de MT₂ (Roka et al ; 1999) (Devavry et al ; 2012). Nous émettons cette hypothèse par homologie avec les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}, qui sont deux isomères responsables de fonctions neuronales différentes : les récepteurs 5-HT_{1A} contrôlent l'excitabilité des neurones et les 5-HT_{1B} régulent la libération de la sérotonine au niveau de l'axone. Cette différence au niveau des fonctions respectives de ces deux récepteurs est déterminée par leur localisation sub-neuronale dans la mesure où les deux récepteurs

engagent des voies de signalisation similaires. En effet, le récepteur 5-HT_{1A} présente une localisation somato-dendritique comme MT₂, tandis que le récepteur 5-HT_{1B} est adressé vers l'axone. A ce sujet, Carrel *et al.* montrent que l'adressage des récepteurs 5-HT_{1B} dépend de son activité constitutive, une caractéristique absente chez 5-HT_{1A} (Carrel et al ; 2011). Un autre exemple qui peut être cité est celui du récepteur mGluR5 dont la localisation dépend en partie des protéines Homer. Ces récepteurs co-transfectés avec Homer1b et Homer1c dans des cultures primaires de neurones granulaires de cervelet présentent une localisation dendritique, tandis qu'une co-transfection avec Homer1a facilite le trafic vers l'axone (Ango et al ; 2000). Enfin de la même manière, le récepteur GABA_{B2} interagit avec le canal KCTD12 pour l'adressage axonal (Bartoi et al ; 2010).

En résumé, les différences entre la localisation neuronale de MT₁ et de MT₂ peuvent donc s'expliquer soit par une activité constitutive différente entre les récepteurs, soit par un partenaire axonal qui interagirait spécifiquement avec MT₁. De plus, dans l'article 2, nous avons identifié la protéine kinésine parmi les partenaires de MT₁. Cette protéine est un moteur moléculaire du transport axonal (Cyr & Brady ; 1992) et interagit avec MT₁ mais pas avec MT₂.

Les perspectives concernant cet aspect se focaliseront sur l'étude de l'activité constitutive de MT₁ sur sa localisation axonale. Pour ce faire, un traitement de ces cultures neuronales avec des agonistes inverses s'impose. Par ailleurs, il est connu que les neurones de l'hippocampe chez l'homme expriment MT₁ et MT₂. Cette co-expression soulève ainsi des questions quant à la formation des hétéromères MT₁/MT₂ et quant au rôle de la dimérisation dans l'adressage subcellulaire (Savaskan et al ; 2002) (Lee et al ; 2010). La méthodologie pour une telle étude pourrait en fait suivre la logique adoptée dans l'article 1, à savoir : la mise en évidence de la formation des hétérodimères et le suivi du transport des récepteurs dans des neurones. De plus, il serait intéressant de préparer des cultures de neurones d'hippocampe à partir des souris double KO-MT₁^{-/-}/MT₂^{-/-} afin d'y faire exprimer les récepteurs d'intérêt et de pouvoir contrôler les niveaux d'expressions relatives des récepteurs et par là même la formation des hétéromères.

Les effets « discrets » de la mélatonine sur les complexes MT₁/Ca_v2.2 et MTR/DAT

Dans la littérature, l'effet inhibiteur sur le relargage de la dopamine est largement attribué à la mélatonine. Cependant, nos travaux sur Ca_v2.2 exprimé dans des cellules CHO, montrent que la mélatonine exerce un effet potentialisateur d'une inhibition constitutive et forte de MT₁ sur le canal calcique. Toutefois, il est possible que le niveau d'expression élevé de MT₁ dans les cellules CHO (environ 1pmol/mg de protéines) puisse potentialiser cette activité tonique.

Donc, bien que la mélatonine n'ait pas produit d'effet notoire dans nos systèmes cellulaires, ceci n'exclut pas que l'hormone puisse avoir des effets *in vivo*. Il est donc indispensable de reproduire nos observations faites sur le complexe Ca_v2.2/MT₁ dans un contexte proche des conditions

physiologiques, notamment par le recours à l'utilisation de cellules de type neuronal et par l'application de différents ligands mélatoninergiques.

De plus, compte tenu de la littérature sur d'autres RCPG tel que le récepteur de la nociceptine (Beedle et al ; 2004) ou de la dopamine D1 et D2 qui interagissent avec le canal calcique (Kisilevsky et al ; 2008), il paraît envisageable que l'effet constitutif de MT₁ avec Ca_v2.2 soit la conséquence d'une interaction directe entre les deux partenaires.

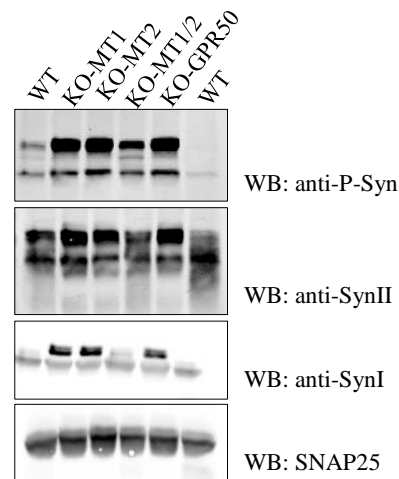
Les récepteurs de la mélatonine présentent une expression circadienne de la protéine et de l'ARNm (Poirel et al ; 2002) (Masana et al ; 2000). De ce fait, les phases d'expression des récepteurs correspondraient aux périodes de modulation de Ca_v2.2 et de DAT. Dans l'article 2, une régulation circadienne de l'interaction entre la synapsine II et MT₁ a été mise en évidence. L'interaction de MT₁ avec ce partenaire présynaptique semble en effet augmenter le jour et diminuer la nuit. Par conséquent, approfondir cette notion d'interaction fonctionnelle et circadienne constitue un aspect particulièrement intéressant pour de futurs travaux de recherche.

En ce qui concerne GPR50, aucune donnée dans la littérature ne lui attribue une implication dans la régulation de l'homéostasie de la dopamine. Aussi, le profil d'expression de GPR50 est en cours de validation, notamment par l'utilisation de nouveaux anticorps affins pour la protéine exprimée chez le rongeur. Grâce aux différents outils développés, nous espérons pouvoir répondre à plusieurs questions concernant la régulation des protéines membranaires par des RCPG orphelins tels que GPR50.

Le rôle des récepteurs de la mélatonine dans la régulation de l'homéostasie dopaminergique

Contrairement à l'interaction entre MT₁ et Ca_v2.2 qui peut concerner plusieurs types neuronaux, le couplage fonctionnel de MTR avec DAT donne un indice sur le neurotransmetteur concerné. Nous avons montré que DAT est négativement régulé par les récepteurs de la mélatonine au niveau du striatum dans l'absence de la mélatonine. Cependant, nous venons de discuter de la possibilité d'une régulation circadienne de ces partenaires de la part des récepteurs de la mélatonine. Par ailleurs, l'activité de DAT est augmentée chez les souris KO pour MT₁, MT₂ et GPR50, ce qui confirme le rôle des MTR dans la régulation de la recapture de la dopamine *in vivo*. Les perspectives de l'article 3 vont d'avantage se concentrer sur l'étude des souris KO-MTR qui pourrait aussi être complétée par une étude de sur-expression de MT₁ dans le striatum de souris KO-MT₁ à l'aide de virus AAV qui encodent pour ce récepteur. De plus, la mesure en temps réel par voltamétrie cyclique des phénomènes de sécrétion et de recapture de la dopamine chez ces souris, peut donner plus de

renseignements par rapport aux fonctions des récepteurs de la mélatonine dans les deux processus (regroupant ainsi les notions abordées dans l'article 2 & 3). Ces études pourront être complétées par des mesures de clairance de la dopamine et de dosage de celle-ci par HPLC. Aussi, des études comportementales des souris permettront de faire le lien entre l'effet fonctionnel et les circuits neuronaux concernés par ces régulations. A cet égard, nos résultats préliminaires concernant la caractérisation biochimique des protéines exprimées dans les tissus de souris KO, montrent une augmentation de l'expression de la synapsine I phosphorylée chez les souris KO-MT₁, KO-MT₂ et KO-GPR50. L'expression des autres partenaires (SNAP25, Synapsine II, Munc-18, DAT, etc) n'est cependant pas affectée.



Analyse par WB de 24 µg de fraction présynaptique LP1 de striatum de souris

Il est alors intéressant de noter que les souris KO-MTR présentent une augmentation de la recapture de la dopamine comme démontré dans l'article 3. Bogen *et al.* Montrent que les souris KO pour la synapsine I et II ont tendance à présenter une augmentation de la recapture de la dopamine de près de 20 % bien que les calculs statistiques ne soient pas significatifs (Bogen et al ; 2006). Aussi, les souris KO pour les synapsine I, II et III présente une augmentation de près de 100 % de la libération de la dopamine et pas de la sérotonine (Kile et al ; 2010) ; et nous avons discuté du rôle inhibiteur de la synapsine vis-à-vis l'activation du canal calcique Ca_v2.2 (Medrihan et al ; 2013). Ces observations font donc penser à interconnexion des voies de la synapsine et de MT₁ dans la régulation de la recapture de la dopamine et dans la régulation de la libération des NT.

Par ailleurs, nous allons nous intéresser à l'étude de la signalisation et du trafic des récepteurs de la mélatonine dans les cellules co-exprimant DAT et Ca_v2.2. En effet, la rétention intracellulaire de DAT (jusqu'à 80 %) peut causer une altération du trafic des récepteurs de la mélatonine par

phénomène d'hétérodimérisation. Aussi, il paraît intéressant d'étudier la signalisation des récepteurs de la mélatonine en présence de leurs partenaires caractérisés dans ce mémoire afin de se rendre compte des effets que peuvent exercer les GIP sur nos récepteurs.

La conclusion :

La force de ce travail réside dans l'efficacité de l'étude des partenaires d'interaction des RCPG dans la compréhension de leurs mécanismes d'action et de leurs régulations. Les partenaires d'interaction est une notion large qui comprend aussi bien les phénomènes de dimérisation entre RCPG ainsi que les interactions de ces derniers avec d'autres protéines cellulaires, membranaires ou solubles.

Nous avons pu montrer au cours de cette thèse que la dimérisation des récepteurs de la mélatonine dans les photorécepteurs donne lieu à un profil de signalisation spécifique de ces hétérodimères dans la rétine. De plus, l'étude de l'interactome de MT₁ suggère fortement que ce récepteur est localisé au niveau présynaptique, en étroite liaison avec la machinerie de la libération des neurotransmetteurs. A ce niveau, nous avons apporté les preuves que MT₁ régule la fonction des canaux Ca_v2.2 et du transporteur DAT ; et nous avons souligné un rôle de ce récepteur dans la régulation de la neurotransmission. Par ailleurs, sachant que la machinerie de l'exocytose comprenant SNAP25, synapsine, snapin, Munc-18 et Ca_v2.2 est parfaitement exprimée dans les cellules β-pancréatiques (tout comme les récepteurs de la mélatonine d'ailleurs) où elle est responsable de la libération de l'insuline entre autres; on peut penser que MTR puissent avoir un rôle à jouer dans la régulation de la libération de l'insuline et dans la régulation de l'homéostasie glucidique en général, ce rôle est d'autant plus probable que la mélatonine est démontré réguler les fonctions pancréatiques (Westenbroek et al ; 1992) (Fu et al ; 2013) (Bazwinsky-Wutschke et al ; 2014) (Karamitri et al ; 2013).

ANNEXES

Systematic identification of protein interactions of 50 clinically relevant human GPCRs

Kate Sokolina*, Saranya Kittanakom*, Max Kotlyar, Pascal Maurice, Jorge Gandía, Abla Benleulmi-Chaachoua, Hiroyuki Kobayashi, Kenjiro Tadagaki, Victoria Wong, Diana Tacelosky, Elizabeth van Bockstaele, Beverly Reyes, Kevin R. Brown, Javier Menendez, Vuk Janjic, Lukas Buerkle, Martin Dinkler, Daniel Auerbach, Klaus Seuwen, Jason Moffat, Stephan Angers, Natasa Przulj, Robert Levenson, Michel Bouvier, Francisco Ciruela, Ralf Jockers, Igor Jurisica[#], and Igor Stagljar[#]

* these authors contributed equally

[#] co-corresponding authors

ABSTRACT

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are the largest family of transmembrane receptors with key roles in signaling pathways targeted by therapeutics. To obtain a global view of GPCR-mediated signaling and to identify novel components of their pathways, we used modified membrane yeast two-hybrid (MYTH) approach to generate an interactome of 50 full-length human ligand-unoccupied GPCRs without disrupting their structure, function, or localization. The resulting 50 GPCR-interactome connects 997 unique interactions between 699 proteins including 368 membrane proteins. We also analyzed the pathway enrichment and structural complexity, focusing on cancer and neuronal diseases. To demonstrate the biological relevance for the GPCR-interactome, we focused on an orphan GPCR, GPR37, and its novel interactors, including serotonin 5-HT_{4d} and adenosine ADORA2A receptors expressed in neurons. Our data represents the first comprehensive interactome mapping for human GPCRs and provides a valuable resource for analysis of signaling pathways involving this most druggable family of transmembrane proteins.

Human GPCR bait construct generation and functional validation

MYTH “baits” were generated from 50 full-length human GPCRs. GPCR “baits” were N-terminally tagged with the yeast mating factor α to encourage plasma membrane localization and stable expression in yeast, and C-terminally tagged with half of ubiquitin (C_{ub}) fused to an artificial transcription factor comprising LexA and VP16. Bait fusion proteins were tested for proper expression at the yeast plasma membrane by immunofluorescence, and for lack of self-activation using known interacting and non-interacting preys. GPCR- C_{ub} -LexA-VP16 bait functionality for a number of baits was confirmed by measuring changes in growth rate of bait-expressing yeast in the presence and absence of an agonist. Validated functional GPCR baits were used in MYTH screens to identify membrane and non-membrane GPCR-interactors as illustrated in **Figure 1a**.

GPCR MYTH screening and interaction specificity

MYTH screens were carried out in duplicate using yeast reporter strain expressing validated GPCR “baits” as well as a human fetal brain cDNA library. Using an N-terminally tagged cDNA library built with a restriction digest-based cloning strategy, we were able to screen a mixture of full-length and truncated human “prey” proteins. As a result, some prey vectors contained partial GPCRs still capable of heterodimerizing with the bait GPCRs, increasing the likelihood of identifying novel GPCR-GPCR interactions.

Interactome refinement and annotation

Sequences of surviving yeast colonies were analyzed using in-house software with stringent selection parameters for quality of sequence and accurate identification of the putative interacting proteins. To further refine the GPCR-interactome, biologically insignificant interactors (ie: signal peptide processing proteins, ribosomal contaminants), false positives (biologically inaccessible mitochondrial membrane proteins, bait non-specific interactors, and proteins occurring in all screens across a number of protein families) were eliminated from further characterization.

This systematic and stringent approach resulted in 997 unique interactions between 699 proteins in the 50 GPCR interactome, including 368 membrane proteins (approximately 37% of the interactome). The nodes and edges of the refined interactome of novel putative interactors identified by 50 GPCR screens (**Figure 1b**) were annotated to describe protein function and the interaction data available.

MYTH identified new GPCR interactions between HTR4, GPRIN2 and GPR37

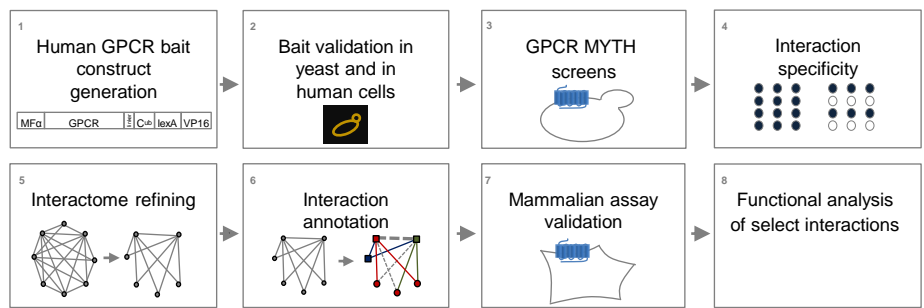
To demonstrate the utility of the interactome in revealing novel interactions of biological significance, we selected several interactions of clinically important GPCRs: HTR4 (hydroxytryptamine) serotonin ($5-HT_{4d}$) receptor, a promising target for Alzheimer disease (Lezoualc’h, 2007), GPRIN2, a G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2 that interacts with G proteins (Chen *et al.*, 1999) and the orphan GPR37 (Parkin-associated endothelin receptor-like receptor, Pael-R) (Dusonchet *et al.*, 2009). To confirm the interaction of $5-HT_{4d}$ with GPRIN2 and GPR37 in a mammalian system, we carried out co-immunoprecipitation

experiments (**Figure 2a**) and BRET saturation assays (**Figure 2b**) in HEK293 cells. Though the interaction with GPRIN2 is not observed by BRET, it can be observed by co-IP (lanes 2 and 3), likely because the distance between Rluc and YFP is greater than the BRET detection threshold of 100 angstroms. The interaction between 5-HT_{4d} and GPR37 was confirmed in both assays. Co-localization of 5-HT_{4d} with GPR37 and GPRIN2 was observed at the plasma membrane (**c**). Stimulation of 5-HT_{4d} readily induced ERK1/2 phosphorylation (**d**) and promoted cAMP production (**e**). Co-expression of GPR37 or GPRIN2 had opposing effects on these two responses, whereas ERK1/2 phosphorylation was largely abolished (**d**), maximal cAMP production was potentiated (**e**) without modifying 5-HT_{4d} expression levels (**f**). In contrast, co-expression of the chemokine CCR5 receptor or a C-terminally truncated form of GPRIN2 unable to interact with G proteins did not modify the 5-HT_{4d} response (**d-f**). In addition, GPRIN2 and GPR37 did not modify the ERK and cAMP response elicited by the β₂-adrenergic receptor upon isoproterenol stimulation (**d-e**). Collectively, these data demonstrate the specificity of the effect of GPRIN2 and GPR37 on 5-HT_{4d} function.

References:

- Chen, L. T., Gilman, a G. & Kozasa, T. A candidate target for G protein action in brain. *The Journal of biological chemistry* **274**, 26931–8 (1999).
- Dusonchet, J., Bensadoun, J.-C., Schneider, B. L. & Aebischer, P. Targeted overexpression of the parkin substrate Pael-R in the nigrostriatal system of adult rats to model Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* **35**, 32–41 (2009).
- Lezoualc'h, F. 5-HT₄ receptor and Alzheimer's disease: the amyloid connection. *Experimental neurology* **205**, 325–9 (2007).

Figure 1 a



b

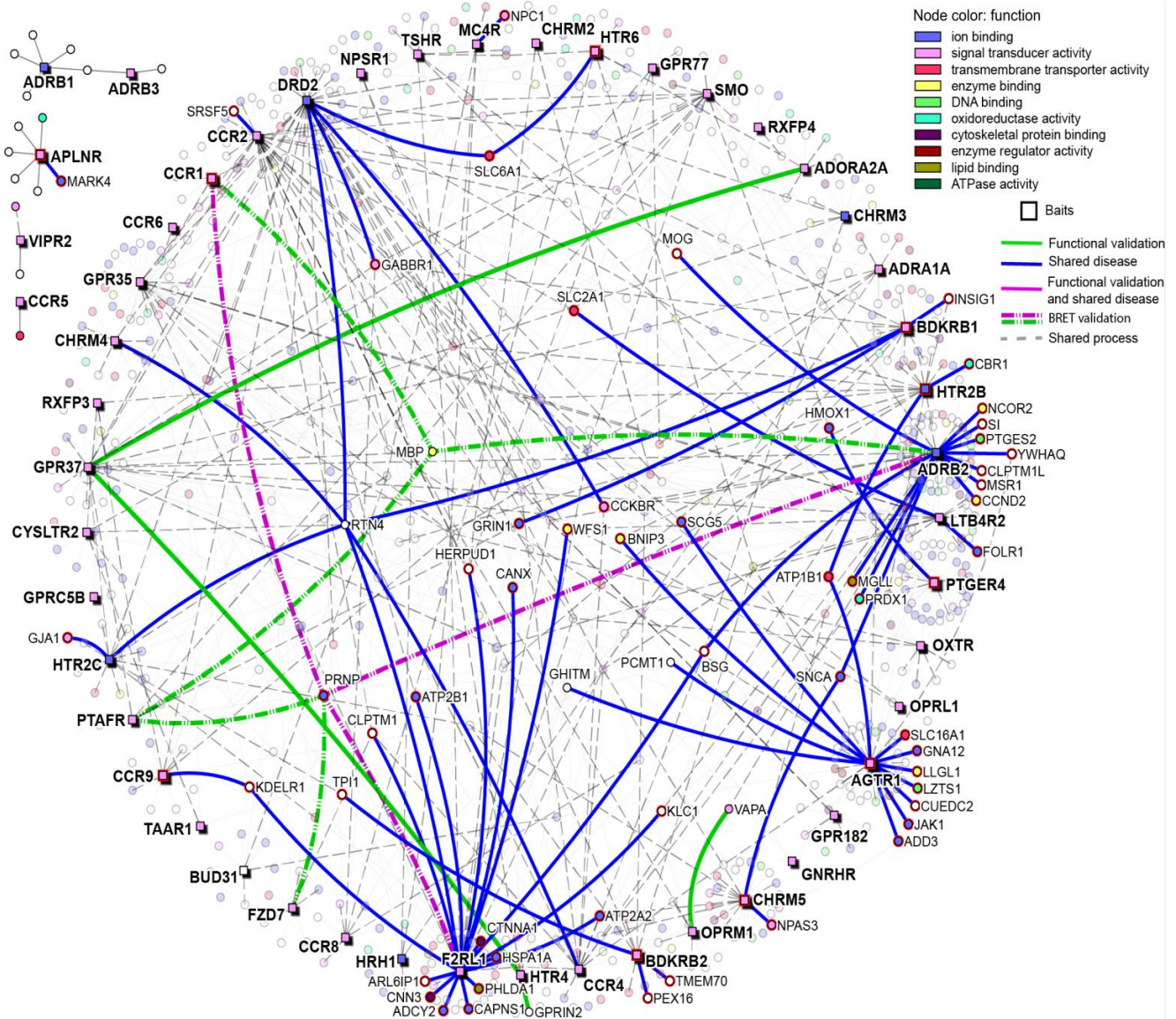
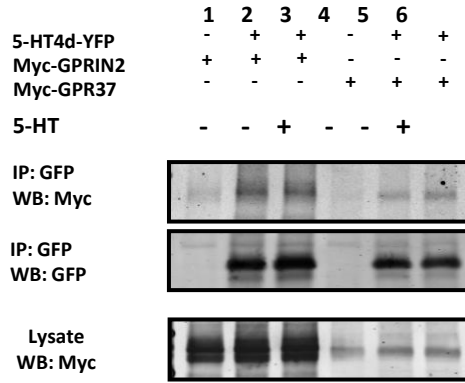


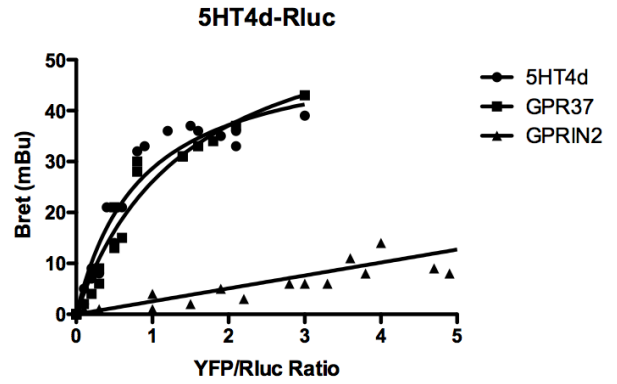
Figure 1: Generating the human full-length GPCR interactome. (a) Outline of the workflow for generating the interactome. **(b)** Interactome of 50 GPCR baits and their interacting partners based on MYTH screens. The nodes denote the baits (square) and preys (circle), colored based on GO Biological function. The edges denote the interactions and are colored based on the available evidence supporting the interactions: putative interactions based on MYTH data only (thin grey lines), shared GO biological processes (grey dashed), functional validation (green), shared disease (blue), both functional validation and shared disease (purple), BRET validation of interaction in mammalian cells (dashed colored).

Figure 2

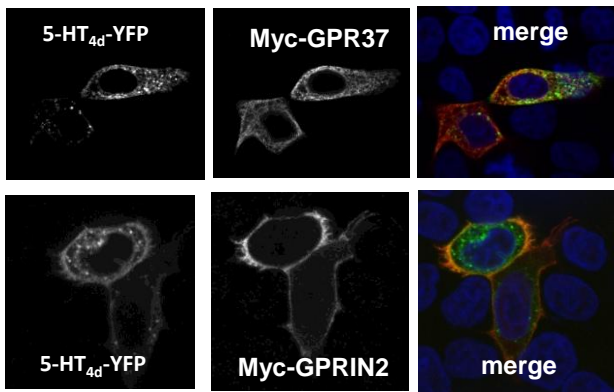
a



b



c



d

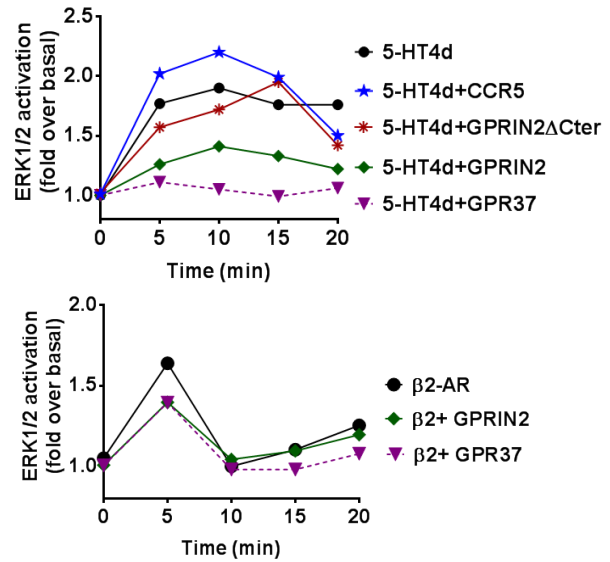


Figure 2 (suite)

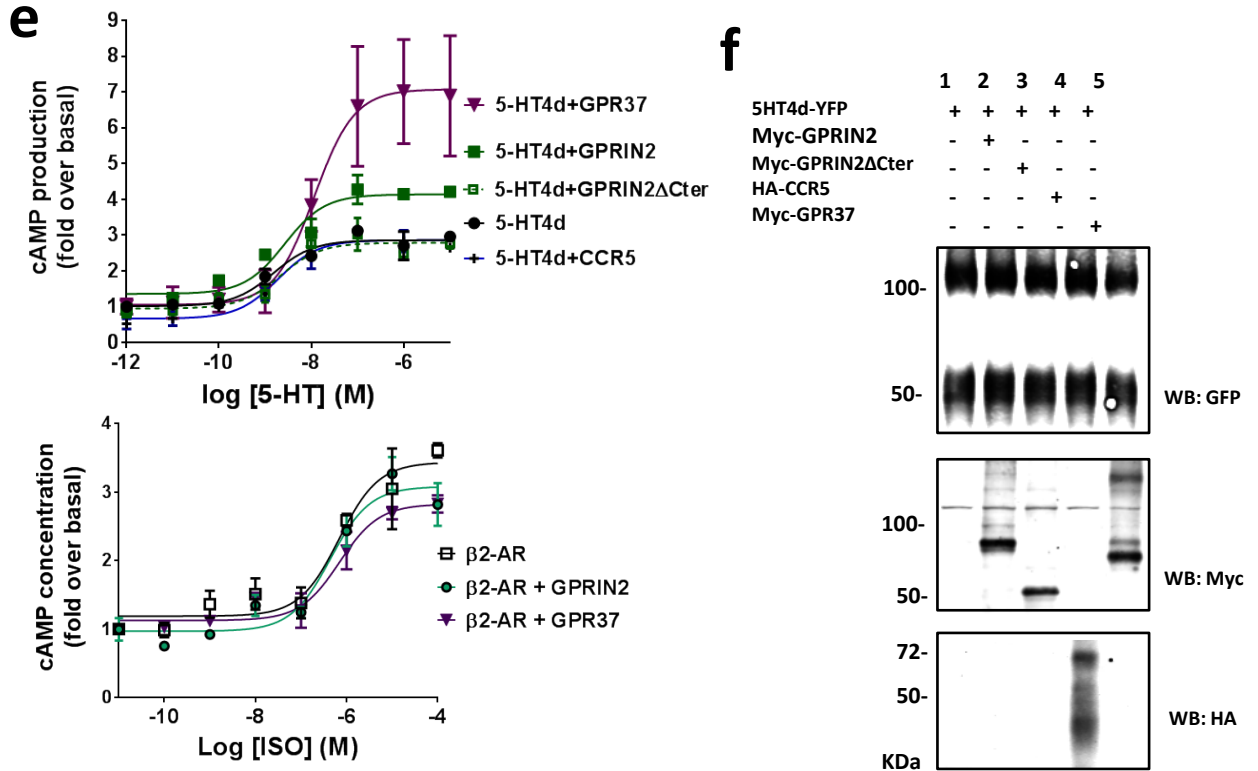


Figure 2: Functional interactions of GPR37 and GPRIN2 with 5-HT4 in HEK-293 cells. (a) Co-immunoprecipitation in the presence and absence of $1\mu\text{M}$ 5-HT agonist for 15 minutes. Cells were transiently transfected with 5-HT4-YFP (lanes 2, 3, 5, 6) and myc-GPRIN2 (lanes 1-3) or GPR37 (lane 4-6) and processed for immunoprecipitation using an anti-GFP. The crude extracts (lysate) and immunoprecipitates (IP) were analysed by SDS-PAGE and immunoblotted using a rabbit anti-GFP or anti-myc antibody. The immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence. **(b)** BRET donor saturation curves are performed by co-transfecting a fixed amount of 5-HT4d-Rluc and increasing amounts of 5-HT4-YFP, GPR37-YFP and GPRIN2-YFP. **(c)** Co-expression of HEK293T cells transfected with 5-HT4-YFP (green) and myc-GPR37 or myc-GPRIN2 (red) and analysed by confocal microscopy. Superimposition of images (merge) reveals co-distribution in orange and DAPI-stained nuclei in blue. There was no change of co-expression with stimulation of 5-HT agonist. **(d,e)** Phospho-ERK signalling (d) or cAMP production (e) in cells stimulated with 5-HT or isoproterenol and expressing 5-HT4d or β2AR , respectively, in the presence of the indicated proteins. **(f)** Western blots of cell lysates expressing 5-HT4d and the other indicated proteins used in panels d and e.

REVUES ET CHAPITRES DE LIVRES

Les récepteurs couplés aux protéines G sous les feux de la rampe

Abla Benleulmi-Chaachoua^{1,2,3}, Stefanie Wojciech^{1,2,3} et Ralf Jockers^{1,2,3}

¹ Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

² CNRS UMR 8104, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

³ Université Paris Descartes, 12 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

Auteur correspondant : Ralf Jockers, ralf.jockers@inserm.fr

Reçu le 14 juin 2013

Résumé – Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aussi appelés protéines à sept domaines transmembranaires (7TM), jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la communication intercellulaire et hormonale. De ce fait, l'activité des RCPG est régulée par divers ligands tels que photons, ions, métabolites, lipides ou protéines ainsi que par un nombre important de médicaments actuellement présents sur le marché. Les travaux de recherche réalisés sur ces récepteurs ont été récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2012. Cet article résume brièvement les connaissances actuelles sur ces protéines et discute des défis futurs tant sur le plan fondamental que thérapeutique.

Mots clés : Récepteurs couplés aux protéines G / prix Nobel / médicaments / ligands biaisés / oligomérisation

Abstract – G protein-coupled receptors in the spot light.

G protein-coupled receptors (GPCRs), also known as seven transmembrane domain-spanning proteins (7TM), play an important role in tissue homeostasis and cellular and hormonal communication. GPCRs are targeted by a large panel of natural ligands such as photons, ions, metabolites, lipids and proteins but also by numerous drugs. Research efforts in the GPCR field have been rewarded in 2012 by the Nobel Prize in Chemistry. The present article briefly summarizes our current knowledge on GPCRs and discusses future challenges in terms of fundamental aspects and therapeutic applications.

Key words: G protein-coupled receptors / Nobel price / drugs / biased ligands / oligomerisation

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment l'une des plus grandes familles de récepteurs membranaires. Chez l'Homme, 3 % du génome encode près de 800 membres. Cette diversité s'explique par la grande variété de stimuli auxquels répondent ces récepteurs, qui va des photons, ions, nucléotides et molécules odorantes jusqu'aux peptides et protéines. Ainsi, la réponse à ces divers signaux permet de réguler de nombreuses fonctions biologiques telles que la neurotransmission, l'immunité, la vue, l'olfaction, le goût, et des fonctions artérielles, métaboliques et

osmotiques. Considérant leurs rôles importants dans l'organisme, les RCPG représentent des cibles privilégiées de traitement, et sont visés par 30 à 40 % des médicaments actuellement sur le marché.

La quête des RCPG a commencé dans les années 1970 avec des études de purification et de marquage par photoaffinité des récepteurs β -adrénergiques (pour un bref historique, voir Lefkowitz, 2004). Ces travaux ont permis d'identifier quelques acides aminés de ces récepteurs, ce qui est une étape indispensable pour synthétiser les amorces d'ADN pour le gène correspondant. Ainsi, le premier gène de RCPG cloné est celui du récepteur β 2-adrénergique (R β 2A)

du hamster publié en 1986 (Dixon *et al.*, 1986). Ce travail a permis de découvrir que ce récepteur présentait une homologie de séquence avec la rhodopsine, une protéine exprimée dans la rétine et composée de sept domaines transmembranaires (7TM). Cette observation fondamentale constitue la première occurrence, mais non la dernière, où la rhodopsine a servi de modèle d'inspiration pour l'étude des RCPG. Le clonage de gènes d'autres RCPG a rapidement suivi, comme le gène du R β 2A humain en 1987 et le gène du R β 3A humain en 1989 par un laboratoire français dirigé par Donny Strosberg. Aujourd'hui, cette famille compte plus de 800 gènes identifiés chez l'Homme, tous codant pour des protéines à sept domaines transmembranaires (7TM). Très tôt, une seconde caractéristique commune de ces récepteurs avait été pressentie : leur couplage aux protéines G hétérotrimériques. En effet, Martin Rodbell avait postulé, bien avant le clonage des RCPG, que la transmission des stimuli hormonaux faisait intervenir des transducteurs de signaux liant le GTP et permettant de réguler l'adénylate cyclase qui produit l'AMP cyclique (figure 1A). Ce concept a été ensuite validé par Alfred Gilman qui a purifié et caractérisé les protéines G. Ce travail a été couronné par le prix Nobel de Médecine et de Physiologie décerné à ces deux chercheurs américains en 1994 (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1994/).

La fin des années 80 et le début des années 90 ont été marqués par une autre découverte importante : les RCPG peuvent avoir une activité constitutive spontanée en l'absence de tout ligand (Costa & Herz, 1989; Allen *et al.*, 1991). Les effets délétères d'une activation continue de RCPG ont permis de définir, quelques années plus tard, une nouvelle classe de ligands capables d'annuler cette activité spontanée. Ils ont été nommés agonistes inverses, par opposition aux agonistes qui activent le récepteur. On sait aujourd'hui que les RCPG fluctuent spontanément entre différents états conformationnels, cet équilibre pouvant être différent selon le récepteur, et que la liaison d'un agoniste ou d'un agoniste inverse déplace cet équilibre vers des états plutôt actifs ou plutôt inactifs du récepteur.

Durant la même période, et parallèlement aux efforts de clonage des RCPG, deux familles de protéines jouant des rôles clés dans la régulation de l'activité de ces récepteurs ont été identifiées : les GRK (RCPG kinases) et les β -arrestines. Par analogie avec le modèle de la rhodopsine, un rôle a pu être attribué à ces protéines dans l'inactivation du signal engendré par les protéines G, effet appelé désensibilisation (Reiter *et al.*, 2012). Brièvement, une fois activé, le RCPG est rapidement phosphorylé par les GRK, ce qui permet le recrutement des β -arrestines. Ce dernier induit plusieurs effets : l'arrêt de la signalisation de la protéine G

par suite de l'encombrement stérique, l'internalisation des récepteurs, et le déclenchement d'une deuxième vague de signalisation dépendante des β -arrestines. Cette complexité de signaux a conduit, plus tard, au concept de signalisation biaisée qui est basée sur le fait que certains ligands sont capables d'activer des voies de signalisation préférentiellement à d'autres.

L'avancée suivante dans le domaine des RCPG a consisté en la résolution de leur structure. Après avoir surmonté plusieurs obstacles techniques, l'équipe de Brian Kobilka a réussi à cristalliser et identifier la structure du récepteur R β 2A en 2007 (Rasmussen *et al.*, 2007). Cinq ans plus tard, près de 40 structures d'une vingtaine de RCPG sous différentes formes (liées à des agonistes inverses, à des antagonistes ou à des agonistes) ont été comprises (Audet & Bouvier, 2012). Les résultats de ces travaux confirment une architecture en 7TM largement conservée par les récepteurs, mais montrent une grande diversité quant à la position et la taille de la poche de liaison du ligand. En 2011, un succès remarquable a été la résolution de la structure du R β 2A en présence d'un agoniste et de la protéine Gs composée de ses trois sous-unités α , β et γ (Rasmussen *et al.*, 2011). Ce coup de maître a permis de visualiser la surface d'interaction entre le R β 2A et la protéine Gs et de proposer un mécanisme d'activation de la protéine G qui repose sur un basculement d'une hélice alpha au sein de la sous-unité G α . En comparant les structures du R β 2A lié à un agoniste inverse, à un agoniste et à un agoniste en présence de la protéine G, on constate que l'agoniste seul ne suffit pas à stabiliser l'état actif du récepteur, mais que la présence de l'agoniste et de la protéine G est indispensable. Ceci démontre de façon claire l'action allostérique de la protéine G sur le récepteur et valide le concept de complexe ternaire ligand-récepteur-protéine G requis pour la liaison de l'agoniste à haute affinité.

Les défis futurs dans le domaine des RCPG

L'attribution du Prix Nobel de Chimie en 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka, deux chercheurs américains à l'origine de nombre des découvertes détaillées plus haut, a clairement marqué une étape importante dans le domaine des RCPG (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/). C'est à se demander si tout ce que nous devons savoir sur ces récepteurs a été déjà compris. Une analyse du passé laisse penser le contraire. Les chapitres suivants tentent de se projeter dans le futur et d'identifier les défis à venir à la fois sur le plan fondamental et thérapeutique.

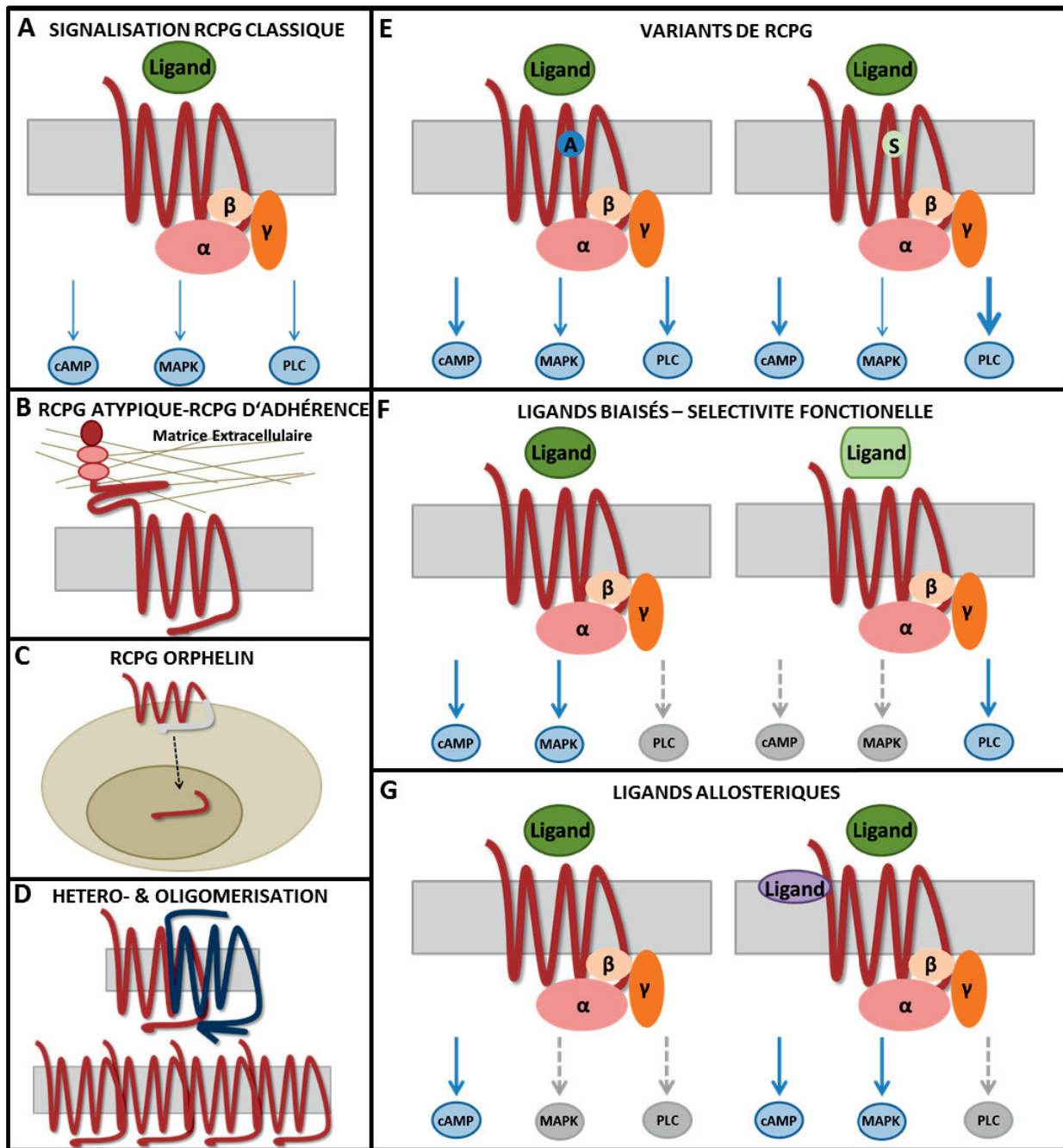


Fig. 1. Variation autour d'un motif – les facettes des RCPG. La stimulation des RCPG par leurs ligands peut conduire à l'activation des voies de signalisation classiques comme la formation de l'AMP cyclique par l'adénylate cyclase, l'activation des MAP Kinases ou de la phospholipase C (A). On peut aussi attribuer aux RCPG des fonctions indépendantes de la stimulation par le ligand illustrées par (1) les RCPG atypiques comme les RCPG d'adhérence jouant un rôle dans l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire (B); (2) les RCPG orphelins dont le ligand est inconnu, qui désormais peuvent avoir des fonctions inattendues liées par exemple à leur translocation nucléaire à la suite du clivage protéolytique de la partie C-terminale (C); (3) le phénomène d'oligomérisation des RCPG (homo- ou hétéro-oligomérisation) (D). De plus, il existe des variants de RCPG qui peuvent avoir des effets différentiels sur le profil de signalisation des récepteurs (E). La découverte des ligands biaisés est la base de la sélectivité fonctionnelle des RCPG. Ces ligands peuvent induire une signalisation différentielle (F). Les ligands allostériques (violet) se lient aux récepteurs en dehors du site orthostérique et peuvent moduler l'état actif du récepteur induit par le ligand naturel (vert) (G).

La co-cristallisation de complexes de RCPG

Les RCPG sont répartis en cinq familles sur la base d'études phylogénétiques. Les récepteurs semblables à la rhodopsine dits *rhodopsin-like* constituent le plus grand groupe avec environ 700 membres chez l'Homme. Les récepteurs de la sécrétine, les récepteurs d'adhérence, les récepteurs du glutamate et les récepteurs *frizzled/taste2* constituent les autres familles (Lagerstrom & Schioth, 2008). Les récepteurs *rhodopsin-like* ont été les premiers cristallisés, et la structure d'une douzaine d'entre eux est à ce jour résolue. Parmi les autres familles, le domaine transmembranaire du récepteur *Smoothened* (famille *frizzled*) (Wang *et al.*, 2013), quelques domaines extracellulaires de récepteurs de type glutamate (Muto *et al.*, 2007) et des récepteurs de la famille des sécrétines (Archbold *et al.*, 2011) ont été cristallisés. Ces succès, bien que remarquables, ne concernent cependant qu'une petite partie des 800 RCPG humains. Dans la perspective de conception de nouveaux médicaments par « *drug design* », le besoin de données structurales des récepteurs ciblés devrait amplifier les efforts dans ce domaine.

Cependant, la cristallisation du récepteur, seul ou avec son ligand, devrait céder la place à la co-cristallisation du RCPG avec ses partenaires d'interaction tels que les protéines G, les β -arrestines ou d'autres protéines régulatrices, ce qui relève de la prouesse technique ; déjà, quelques co-cristaux ont pu être obtenus : ces travaux ont notamment débuté par la cristallisation de la rhodopsine avec un peptide C-terminal de la sous-unité $G\alpha$ (Standfuss *et al.*, 2011), la cristallisation du $R\beta2A$ avec la protéine Gs hétérotrimérique entière (Rasmussen *et al.*, 2011) et la cristallisation de la β -arrestine-1 en présence d'un peptide phosphorylé correspondant aux 29 acides aminés carboxy-terminaux du récepteur de la vasopressine V2 (Shukla *et al.*, 2013) et d'un variant tronqué de la β -arrestine-1 mimant l'état actif (Kim *et al.*, 2013). Ces données, conjointement à l'étude de l'oligomérisation des RCPG, permettront de mieux appréhender les interfaces d'interaction et la sélectivité d'un RCPG pour une isoforme donnée de la protéine associée, de comprendre la régulation de la signalisation de ces récepteurs, et de lever le voile sur des notions encore mal illustrées comme l'asymétrie de l'interaction des partenaires au sein d'un dimère (oligomère) de RCPG (voir plus bas).

Les bases structurales de la signalisation biaisée des RCPG

La difficulté à purifier les RCPG rend compte d'une notion structurale importante qui est leur instabilité conformationnelle. Ces fluctuations sont limitées

en présence de ligands qui stabilisent le récepteur dans un état conformationnel spécifique (Rosenbaum *et al.*, 2009). Contrairement aux ligands naturels qui activent typiquement plusieurs voies de signalisation, certains ligands synthétiques sont des ligands biaisés (figure 1F) qui n'activent qu'une partie des voies de signalisation et peuvent même se comporter comme des antagonistes pour les autres voies. Selon le modèle actuel, ces ligands stabiliseraient des conformations du récepteur favorisant l'interaction avec certains partenaires et pas avec d'autres, induisant ainsi une signalisation biaisée. Des travaux très récents semblent étayer ce modèle. Rahmeh *et al.* (2012) montrent, par exemple, que le récepteur de la vasopressine V2R lié au composé MCF14, qui active la protéine Gs mais ne recrute pas la β -arrestine, stabilise une conformation impliquant le mouvement du TM6 et de la boucle intracellulaire i3. En revanche, le composé SR121463, qui se comporte comme un agoniste inverse pour Gs et un agoniste partiel pour la β -arrestine, provoque un changement de conformation partielle du TM7 et de l'hélice alpha intracytoplasmique H8. L'agoniste naturel, la vasopressine, active les deux voies par une combinaison de ces mouvements (Rahmeh *et al.*, 2012). De la même manière, une étude par RMN a montré que l'activation de la protéine Gs par $R\beta2A$ implique un mouvement de TM5/6, tandis que l'engagement de la β -arrestine s'accompagne d'un mouvement de TM3/7 (Liu *et al.*, 2012). Ces études confortent l'idée selon laquelle l'activation d'une voie de signalisation dépend d'un réarrangement conformationnel spécifique des domaines du récepteur. C'est ce qu'a confirmé une étude comparative de structures cristallographiques des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} liés à l'ergotamine, ligand biaisé pour la β -arrestine pour le récepteur 5-HT_{2B} mais non biaisé pour le 5-HT_{1B} (Wacker *et al.*, 2013).

La disponibilité de structures des RCPG dans différents états d'activation permet d'envisager maintenant des « campagnes » de criblage virtuel pour identifier de nouveaux ligands. Une première étude par criblage virtuel prospectif basée sur la structure cristallographique du $R\beta2A$ à l'état actif a permis l'identification de nouveaux ligands agonistes dont deux composés biaisés pour le recrutement de la β -arrestine (Weiss *et al.*, 2013). Ce type d'étude devrait s'amplifier dans le futur et permettre le développement de ligands biaisés.

Vers l'application clinique des ligands biaisés

Pourquoi vouloir développer des ligands biaisés ? Cette volonté repose sur une idée simple : l'activation sélective de voies de signalisation d'un récepteur

doit permettre de favoriser les voies de signalisation « bénéfiques » au détriment des voies de signalisation « non souhaitées » responsables des effets secondaires. La mise en œuvre de cette stratégie est basée sur deux pré-requis : l'identification de ligands biaisés et un lien clair entre l'activation d'une voie de signalisation et un effet thérapeutique souhaité ou un effet secondaire. Par exemple, l'activation de GPR109A par l'acide nicotinique induit la diminution des taux de triglycérides et l'augmentation de l'HDL en activant les protéines Gi. À côté de ces effets bénéfiques, on observe une rougeur cutanée (« *flushing* ») indésirable qui implique l'activation de ERK1/2 par la β -arrestine-1 (Walters *et al.*, 2009). Des ligands biaisés comme l'agoniste partiel MK-0354 sont tout à fait intéressants parce qu'ils provoquent uniquement l'effet anti-lipolytique désirable, mais pas la rougeur cutanée (Semple *et al.*, 2008).

Les ligands allostériques

La quasi-totalité des médicaments mis sur le marché pour les RCPG a pour cible le site orthostérique (occupé par le ligand naturel). La découverte de nouveaux ligands allostériques, qui se lient à un site autre que celui du ligand naturel, offre des perspectives de traitements pharmacologiques plus spécifiques (figure 1G). Ces sites sont moins conservés que les sites orthostériques entre les différents sous-types du même récepteur. De ce fait, le ligand allostérique peut cibler une isoforme particulière, ce qui est souvent plus difficile pour les ligands orthostériques (Gloriam *et al.*, 2011). Un autre avantage des ligands allostériques est le fait qu'ils sont généralement individuellement inactifs : la présence du ligand orthostérique est nécessaire pour que ceux-ci exercent leur effet modulateur négatif ou positif (Koth *et al.*, 2012; Sheffler *et al.*, 2011). Beaucoup de ligands allostériques sont en cours de développement clinique et devraient être mis sur le marché dans un avenir très proche.

Oligomérisation des RCPG

Il est de plus en plus admis que les RCPG ont la capacité de former des dimères, voire des oligomères (figure 1D). L'existence de ces dimères a été démontrée par une batterie d'approches : co-immunoprécipitation, complémentation intermoléculaire et techniques basées sur un transfert d'énergie comme le BRET ou le FRET. Les données de cristallographie corroborent cette vision, et certaines structures montrent des complexes de RCPG comme celle du R β 1R (Warne *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013), du CXCR4 (Wu *et al.*, 2010),

des récepteurs opioïdes μ -OR (Manglik *et al.*, 2012) et κ -OR (Wu *et al.*, 2012) ainsi que de la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000). À ces évidences s'ajoutent d'autres données récentes, montrant que les protéines G et la β -arrestine se lient de façon asymétrique aux dimères de RCPG, ce qui apporte des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de structures di(oligo)mériques (Maurice *et al.*, 2010, 2011; Sommer *et al.*, 2011; Jastrzebska *et al.*, 2013).

Le degré d'oligomérisation n'a été déterminé avec précision que dans un nombre limité de cas. Il a été clairement montré que mGluR2 existe sous forme de dimères (El Moustaine *et al.*, 2012) et le récepteur GABA_B sous forme de tétramère composé de deux homodimères des sous-types B1 et B2 (Kniazeff & Pin, 2012). Pour les autres RCPG, les évidences quant au degré d'oligomérisation sont beaucoup moins claires et parfois contradictoires (Milligan, 2013). Peut-être les avancées technologiques récentes de mesure en temps réel sur des cellules vivantes à l'échelle moléculaire permettront de résoudre ces questions. Les premiers résultats sur le récepteur du *N*-formyl peptide (FPR) et les R β 1A et R β 2R suggèrent l'existence d'un équilibre dynamique entre des formes monomérique, dimérique et oligomérique à des densités de récepteur très faibles (Kasai *et al.*, 2011; Calebiro *et al.*, 2013). En plus de cette dimension dynamique, les résultats suggèrent que le degré d'oligomérisation augmente en fonction de la densité des récepteurs. Dans tous les cas, l'état de stimulation des récepteurs ne semble pas intervenir dans cet équilibre (figure 1D).

L'état d'oligomérisation des RCPG prend toute son importance dans plusieurs contextes : premièrement, l'oligomère offre la possibilité du recrutement simultané de plusieurs protéines régulatrices et effectrices au sein d'un même complexe comme cela a été montré pour le récepteur de la mélatonine MT1 : celui-ci forme un complexe avec un effecteur, la protéine Gi, et un modulateur, la protéine RGS20 qui régule la vitesse d'activation et de désactivation des protéines G (Maurice *et al.*, 2010). Deuxièmement, des oligomères n'ont pas uniquement été observés pour un même RCPG (homomères), mais également entre des RCPG différents (hétéromères). Ceci revêt une importance particulière car ces hétéromères ont souvent des propriétés pharmacologiques et de signalisation bien distinctes de celles des monomères qui les constituent. Cela augmente le nombre de cibles pharmacologiques de façon considérable avec l'espoir de trouver des ligands spécifiques de ces hétéromères pour éviter, comme avec les ligands biaisés, les effets secondaires des futurs médicaments. Des tests de criblage pour identifier les ligands spécifiques d'hétéromères commencent à être mis en œuvre (van Rijn *et al.*, 2013). Finalement, l'existence d'un équilibre entre les formes mono- et dimériques des

RCPG ouvre la possibilité d'intervention pharmacologique pour empêcher la formation de ces complexes par le développement d'une nouvelle génération d'antagonistes.

Les variants de RCPG

Des mutations au niveau du gène peuvent se traduire au niveau de la protéine. L'existence de variants dans les gènes codant pour les RCPG a été reconnue très tôt, dès le clonage des premiers gènes (figure 1E). L'identification de ces variants, qui peuvent être localisés dans les différentes régions du gène, aussi bien codantes que non codantes, a été largement favorisée par les progrès technologiques récents dans le domaine du séquençage de l'ADN. Cela a permis de comparer les exomes (l'ensemble des exons d'un individu) de plusieurs milliers de personnes simultanément. Ces travaux, qui sont toujours en cours, ont confirmé la grande variabilité inter-individuelle des gènes codant pour les RCPG. Par exemple, une étude a permis de repérer 172 variants, dont 46 non synonymes, dans un échantillon de 51 RCPG analysés chez 14 000 personnes (Nelson *et al.*, 2012). La prochaine étape consistera en la caractérisation fonctionnelle de ces variants pour repérer ceux qui seraient délétères. En parallèle, des associations génétiques seront nécessaires pour établir un lien fonctionnel entre ces variants délétères et des maladies. Un tel travail a déjà été initié pour le récepteur MT₂ de la mélatonine dans le contexte du diabète de type 2 (Bonnefond *et al.*, 2012; Karamitri *et al.*, 2013). Selon cette étude, l'expression des variants rares à perte de fonction du récepteur MT₂ augmente le risque de développer un diabète de type 2 d'un facteur 6. Cette association entre les variants rares et les maladies communes pourrait expliquer une part importante de l'impact génétique sur diverses pathologies.

Les récepteurs orphelins

Les RCPG orphelins sont des récepteurs dont le ligand endogène n'a pas encore été identifié. Il s'agit d'une centaine environ de récepteurs répartis dans les cinq familles de RCPG pouvant présenter une forte homologie de séquence avec d'autres récepteurs non orphelins. La recherche s'intéresse à deux aspects de ces récepteurs : d'une part leur « déorphelinisation » permettant de leur attribuer des ligands naturels ou synthétiques, et d'autre part l'identification de fonctions indépendantes du ligand.

L'identification de ligands reste un enjeu majeur car l'attribution de fonction aux RCPG passe essentiellement par l'étude de leurs propriétés pharmacologiques en appliquant différents ligands.

Plusieurs tentatives de « déorphelinisation » à haut débit ont été appliquées soit en utilisant des chimiothèques de composés synthétiques ou naturels, soit à partir d'extraits biologiques. Plusieurs méthodes de détection ont été développées comme par exemple la mesure du recrutement de différents partenaires régulateurs, tels que les protéines G, par un test de re-largage du TGF α (Inoue *et al.*, 2012), le recrutement de la β -arrestine (Oakley *et al.*, 2006; Southern *et al.*, 2013) ou l'activation de seconds messagers comme le calcium (Beets *et al.*, 2011). Grâce à ces méthodes, de nombreux neuropeptides exprimés dans le système nerveux central ont pu être identifiés comme ligands naturels de certains RCPG orphelins (Civelli, 2012, 2013).

Le deuxième axe s'intéresse à la recherche de fonctions indépendantes d'un ligand. Un premier cas de figure est basé sur la formation d'un hétéromère entre le récepteur orphelin et un récepteur non orphelin dont les fonctions sont connues. Dans ces complexes hétérodimériques, le récepteur orphelin exerce un effet régulateur sur l'activité de l'autre récepteur, comme cela a été montré pour GPR50 qui inhibe spécifiquement les fonctions du récepteur MT₁ de la mélatonine au sein de l'hétéromère (Levoye *et al.*, 2006; Levoye & Jockers, 2007). Ce même concept a été récemment étendu aux hétéromères de RCPG non orphelins : c'est le cas de l'hétéromère des récepteurs de la dopamine D2 et de la ghréline GHSR1a exprimés conjointement dans une région de l'hypothalamus où la ghréline ne peut accéder. L'étude a montré que l'association de ces récepteurs au niveau hypothalamique est indispensable pour que la dopamine exerce un effet anorexigène chez la souris (Kern *et al.*, 2012). On peut également citer l'exemple d'hétéromères entre des RCPG orphelins viraux et les récepteurs de chimiokines de la cellule hôte. La formation de ces hétéromères peut être un moyen pour le virus de détourner les fonctions de la cellule hôte à son profit, notamment la migration cellulaire dépendante des récepteurs aux chimiokines (Tadagaki *et al.*, 2012). D'autres études suggèrent que les RCPG orphelins pourraient aussi former des complexes fonctionnels avec des transporteurs, des canaux ioniques ou d'autres familles de récepteurs, ce qui élargirait considérablement le champ d'action de ces récepteurs orphelins.

De nouvelles fonctions indépendantes du ligand ont également été mises en évidence comme c'est le cas des fonctions nucléaires de la partie intracellulaire du récepteur GPR50 qui se détacherait de la partie transmembranaire à la suite d'un clivage protéolytique pour servir de co-facteur transcriptionnel dans le noyau (Li *et al.*, 2011) (figure 1C). La recherche sur les récepteurs orphelins s'emploie donc à l'identification de ligands endogènes ou de fonctions originales, soit

par association hétéromérique, soit en raison de propriétés intrinsèques du récepteur.

Les RCPG atypiques : les récepteurs d'adhérence

Les récepteurs d'adhérence constituent une des cinq familles principales de RCPG (Fredriksson *et al.*, 2003). La vingtaine de membres de cette famille comportent une imposante partie N-terminale allant de 200 à 2800 acides aminés, organisée en plusieurs domaines semblables à ceux que l'on trouve dans les protéines d'adhérence, comme le domaine de liaison à l'EGF, les domaines immunoglobulines et cadhérines (figure 1B).

La plupart de ces récepteurs sont encore orphelins, et l'identification de leurs ligands ainsi que de leurs signalisations sera un pas en avant dans la compréhension de leurs fonctions physiologiques. Plusieurs d'entre eux possèdent une activité constitutive, ce qui oriente les cribles moléculaires vers la recherche d'agonistes inverses (Gupte *et al.*, 2012).

D'autre part, comme cela a été montré pour les autres groupes de RCPG, quelques récepteurs d'adhérence sont capables de s'homodimériser et de s'hétérodimériser (Davies *et al.*, 2007). Cependant leur mode de signalisation reste largement méconnu. Quelques équipes de recherche travaillant sur ces récepteurs ont montré que GPR56, le récepteur de la latrophiline, GPR133 et GPR97 sont couplés aux protéines $G_{12/13}$, G_q , G_s , et G_o , respectivement (Gupte *et al.*, 2012). Quelques récepteurs jouent un rôle direct dans l'adhérence cellulaire comme BAI1 qui est impliqué dans des interactions cellule-cellule (Park *et al.*, 2007) et EMR2 dans des interactions cellule-matrice extracellulaire (Stacey *et al.*, 2003).

On sait par ailleurs que ces récepteurs sont spécifiquement exprimés dans certains tissus, et semblent avoir un rôle physiologique très important, notamment dans le cancer (Lin, 2012), l'immunité (Yona *et al.*, 2008) et le développement (Tissir *et al.*, 2005; Waller-Evans *et al.*, 2010). Pour ne citer qu'un exemple, la délétion du récepteur GPR56 chez l'Homme est responsable de malformations héréditaires du cortex cérébral connues sous le nom de polymicrogyrie. Cette malformation due à un trouble de la migration de progéniteurs neuro-naux (Piao *et al.*, 2004) a été reproduite dans un modèle de délétion du GPR56 chez la souris (Koirala *et al.*, 2009).

Conclusion

Si le nombre important de RCPG est à la source d'une grande diversité de la réponse cellulaire aux stimuli

extérieurs, il existe cependant une grande conservation structurale et mécanistique entre les différents membres de cette famille de protéines. Les avancées majeures en termes de résolution structurale devraient nous permettre de mieux appréhender le mécanisme d'action des RCPG et d'intervenir sur ce mécanisme à des fins thérapeutiques.

Le développement de nouvelles classes de ligands comme les ligands allostériques ou les ligands spécifiques des hétérodimères ouvre des perspectives cliniques intéressantes. L'identification de composés ciblant l'interface d'oligomérisation des récepteurs ou leur association avec les protéines effectrices offre un autre champ de recherche prometteur pour le traitement de pathologies liées aux RCPG.

Remerciements. Nous remercions chaleureusement Jean-Luc Guillaume (Institut Cochin, France) pour ses commentaires sur le manuscrit. Nous tenons à remercier l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-BSV1-012-01 « MLT2D », ANR-2011-META « MELA-BETES » et ANR-12-RPIB-0016), la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20130326503), ARC No. SFI20121205906, les Laboratoires Servier, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) pour leurs soutiens financiers.

Références

- Allen L.F., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Cotecchia S., G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 11354–11358.
- Archbold J.K., Flanagan J.U., Watkins H.A., Gingell J.J., Hay D.L., Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32, 591–600.
- Audet M., Bouvier M., Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*, 2012, 151, 14–23.
- Beets I., Lindemans M., Janssen T., Verleyen P., Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. *Methods Mol Biol*, 2011, 789, 377–391.
- Bonfond A., Clément N., Fawcett K., Yengo L., Vaillant E., Guillaume J. L., Dechaume A., Payne F., Roussel R., Czernichow S., Hercberg S., Hadjadj S., Balkau B., Marre M., Lantieri O., Langenberg C., Bouatia-Naji N., Charpentier G., Vaxillaire M., Rocheleau G., Wareham N.J., Sladek R., McCarthy M.I., Dina C., Barroso I., Jockers R., Froguel P., Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2012, 44, 297–301.

- Calebiro D., Rieken F., Wagner J., Sungkaworn T., Zabel U., Borzi A., Cocucci E., Zurn A., Lohse M.J., Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110, 743–748.
- Civelli O., Orphan GPCRs and neuromodulation. *Neuron*, 2012, 76, 12–21.
- Civelli O., Reinscheid R.K., Zhang Y., Wang Z., Fredriksson R., Schiöth H.B., G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53, 127–146.
- Costa T., Herz A., Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 7321–7325.
- Davies J.Q., Chang G.W., Yona S., Gordon S., Stacey M., Lin H.H., The role of receptor oligomerization in modulating the expression and function of leukocyte adhesion-G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 2007, 282, 27343–27353.
- Dixon R.A.F., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.E., Mumford R.A., Slater E.E., Sigal I.S., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Strader C.D., Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 1986, 321, 75–79.
- El Moustaine D., Granier S., Doumazane E., Scholler P., Rahmeh R., Bron P., Mouillac B., Banères J.L., Rondard P., Pin J.P., Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 16342–16347.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 2003, 63, 1256–1272.
- Gloriam D.E., Wellendorph P., Johansen L.D., Thomsen A.R., Phonekeo K., Pedersen D.S., Brauner-Osborne H., Chemogenomic discovery of allosteric antagonists at the GPRC6A receptor. *Chem Biol*, 2011, 18, 1489–1498.
- Gupte J., Swaminath G., Danao J., Tian H., Li Y., Wu X., Signaling property study of adhesion G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett*, 2012, 586, 1214–1219.
- Huang J., Chen S., Zhang J.J., Huang X.Y., Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20, 419–425.
- Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J., TGF alpha shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods*, 2012, 9, 1021–1029.
- Jastrzebska B., Orban T., Golczak M., Engel A., Palczewski K., Asymmetry of the rhodopsin dimer in complex with transducin. *FASEB J*, 2013, 27, 1572–1584.
- Karamitri A., Renault N., Clément N., Guillaume J.L., Jockers R., Towards the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*, 2013, in press.
- Kasai R.S., Suzuki K.G., Prossnitz E.R., Koyama-Honda I., Nakada C., Fujiwara T.K., Kusumi A., Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol*, 2011, 192, 463–480.
- Kern A., Albarran-Zeckler R., Walsh H.E., Smith R.G., Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, 2012, 73, 317–332.
- Kim Y.J., Hofmann K.P., Ernst O.P., Scheerer P., Choe H.W., Sommer M. E., Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature*, 2013, 497, 142–146.
- Kniazeff J., Pin J.P., G-protein-coupled receptors dimers and oligomers: for which purpose? The GABA(B) receptor under investigation. *Med Sci (Paris)*, 2012, 28, 858–863.
- Koirala S., Jin Z., Piao X., Corfas G., GPR56-regulated granule cell adhesion is essential for rostral cerebellar development. *J Neurosci*, 2009, 29, 7439–7449.
- Koth C.M., Murray J.M., Mukund S., Madjidi A., Minn A., Clarke H.J., Wong T., Chiang V., Luis E., Estevez A., Rondon J., Zhang Y., Hotzel I., Allan B.B., Molecular basis for negative regulation of the glucagon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 14393–14398.
- Lagerstrom M.C., Schiöth H.B., Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7, 339–357.
- Lefkowitz R.J., Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25, 413–422.
- Levoye A., Dam J., Ayoub M.A., Guillaume J.L., Couturier C., Delagrangé P., Jockers R., The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT(1) melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J*, 2006, 25, 3012–3023.
- Levoye A., Jockers R., GPCRs heterodimerization: a new way towards the discovery of function for the orphan receptors? *Med Sci (Paris)*, 2007, 23, 746–750.
- Li J., Hand L.E., Meng Q.J., Loudon A.S., Bechtold D.A., GPR50 interacts with TIP60 to modulate glucocorticoid receptor signalling. *PLoS One*, 2011, 6, e23725.
- Lin H.H., Adhesion family of G protein-coupled receptors and cancer. *Chang Gung Med J*, 2012, 35, 15–27.
- Liu J.J., Horst R., Katritch V., Stevens R.C., Wuthrich K., Biased signaling pathways in beta2-adrenergic receptor

- characterized by 19F-NMR. *Science*, 2012, 335, 1106–1110.
- Manglik A., Kruse A.C., Kobilka T.S., Thian F.S., Mathiesen J.M., Sunahara R.K., Pardo L., Weis W.I., Kobilka B.K., Granier S., Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 2012, 485, 321–326.
- Maurice P., Daulat A.M., Turecek R., Ivankova-Susankova K., Zamponi F., Kamal M., Clément N., Guillaume J.L., Bettler B., Galès C., Delagrangé P., Jockers R., Molecular organization and dynamics of the melatonin MT receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J*, 2010, 29, 3646–3659.
- Maurice P., Kamal M., Jockers R., Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32, 514–520.
- Milligan G., The Prevalence, Maintenance and Relevance of GPCR Oligomerization. *Mol Pharmacol*, 2013, 84, 158–169.
- Muto T., Tsuchiya D., Morikawa K., Jingami H., Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 3759–3764.
- Nelson M.R., Wegmann D., Ehm M.G., Kessner D., St Jean P., Verzilli C., Shen J., Tang Z., Bacanu S.A., Fraser D., Warren L., Aponte J., Zawistowski M., Liu X., Zhang H., Zhang Y., Li J., Li Y., Li L., Woollard P., Topp S., Hall M.D., Nangle K., Wang J., Abecasis G., Cardon L.R., Zollner S., Whittaker J.C., Chissole S.L., Novembre J., Mooser V., An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science*, 2012, 337, 100–104.
- Oakley R.H., Hudson C.C., Sjaastad M.D., Loomis C.R., The ligand-independent translocation assay: an enabling technology for screening orphan G protein-coupled receptors by arrestin recruitment. *Methods Enzymol*, 2006, 414, 50–63.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M., Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289, 739–745.
- Park D., Tosello-Trampont A.C., Elliott M.R., Lu M., Haney L.B., Ma Z., Klibanov A.L., Mandell J.W., Ravichandran K.S., BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 2007, 450, 430–434.
- Piao X., Hill R.S., Bodell A., Chang B.S., Basel-Vanagaite L., Straussberg R., Dobyns W.B., Qasrawi B., Winter R.M., Innes A.M., Voit T., Ross M. E., Michaud J.L., Descarie J.C., Barkovich A.J., Walsh C.A., G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*, 2004, 303, 2033–2036.
- Rahmeh R., Damian M., Cottet M., Orcel H., Mendre C., Durroux T., Sharma K. S., Durand G., Pucci B., Trinquet E., Zwier J.M., Deupi X., Bron P., Banères J.L., Mouillac B., Granier S., Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 6733–6738.
- 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., Schertler G.F., Weis W.I., Kobilka B.K., Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007, 450, 383–387.
- Rasmussen S.G., DeVree B.T., Zou Y., Kruse A.C., Chung K.Y., Kobilka T.S., Thian F.S., Chae P.S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J.M., Shah S.T., Lyons J.A., Caffrey M., Gellman S.H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W.I., Sunahara R.K., Kobilka B.K., Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011, 477, 549–555.
- Reiter E., Ahn S., Shukla A.K., Lefkowitz R.J., Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52, 179–197.
- Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G., Kobilka B.K., The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2009, 459, 356–363.
- Semple G., Skinner P.J., Gharbaoui T., Shin Y.J., Jung J.K., Cherrier M.C., Webb P.J., Tamura S.Y., Boatman P.D., Sage C.R., Schrader T.O., Chen R., Colletti S.L., Tata J.R., Waters M.G., Cheng K., Taggart A.K., Cai T.Q., Carballo-Jane E., Behan D.P., Connolly D.T., Richman J.G., 3-(1H-tetrazol-5-yl)-1,4,5,6-tetrahydro-cyclopentapyrazole (MK-0354): a partial agonist of the nicotinic acid receptor, G-protein coupled receptor 109a, with antilipolytic but no vasodilatory activity in mice. *J Med Chem*, 2008, 51, 5101–5108.
- Sheffler D.J., Gregory K.J., Rook J.M., Conn P.J., Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors. *Adv Pharmacol*, 2011, 62, 37–77.
- Shukla A.K., Manglik A., Kruse A.C., Xiao K., Reis R.I., Tseng W.C., Staus D.P., Hilger D., Uysal S., Huang L.Y., Paduch M., Tripathi-Shukla P., Koide A., Koide S., Weis W.I., Kossiakoff A.A., Kobilka B.K., Lefkowitz R.J., Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 2013, 497, 137–141.
- Sommer M.E., Hofmann K.P., Heck M., Arrestin-rhodopsin binding stoichiometry in isolated rod outer segment membranes depends on the percentage of activated receptors. *J Biol Chem*, 2011, 286, 7359–7369.
- Southern C., Cook J.M., Neetoo-Isseljee Z., Taylor D.L., Kettleborough C. A., Merritt A., Bassoni D.L., Raab W.J., Quinn E., Wehrman T.S., Davenport A.P., Brown A.J., Green A., Wigglesworth M.J., Rees S., Screening beta-Arrestin Recruitment for the Identification of Natural Ligands for Orphan

- G-Protein-Coupled Receptors. *J Biomol Screen*, 2013, 18, 599–609.
- Stacey M., Chang G.W., Davies J.Q., Kwakkenbos M.J., Sanderson R.D., Hamann J., Gordon S., Lin H.H., The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood*, 2003, 102, 2916–2924.
- Standfuss J., Edwards P.C., D'Antona A., Fransen M., Xie G., Oprian D.D., Schertler G.F., The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 2011, 471, 656–660.
- Tadagaki K., Tudor D., Gbahou F., Tschische P., Waldhoer M., Bomsel M., Jockers R., Kamal M., Human cytomegalovirus-encoded UL33 and UL78 heteromerize with host CCR5 and CXCR4 impairing their HIV coreceptor activity. *Blood*, 2012,
- Tissir F., Bar I., Jossin Y., De Backer O., Goffinet A.M., Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 451–457.
- van Rijn R.M., Harvey J.H., Brissett D.I., DeFriel J.N., Whistler J.L., Novel screening assay for the selective detection of G-protein-coupled receptor heteromer signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344, 179–188.
- Wacker D., Wang C., Katritch V., Han G.W., Huang X.P., Vardy E., McCorvy J.D., Jiang Y., Chu M., Siu F.Y., Liu W., Xu H.E., Cherezov V., Roth B.L., Stevens R.C., Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340, 615–619.
- Waller-Evans H., Promel S., Langenhan T., Dixon J., Zahn D., Colledge W.H., Doran J., Carlton M.B., Davies B., Aparicio S.A., Grosse J., Russ A.P., The orphan adhesion-GPCR GPR126 is required for embryonic development in the mouse. *PLoS One*, 2010, 5, e14047.
- Walters R.W., Shukla A.K., Kovacs J.J., Violin J.D., DeWire S.M., Lam C.M., Chen J.R., Muehlbauer M.J., Whalen E.J., Lefkowitz R.J., beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119, 1312–1321.
- Wang C., Wu H., Katritch V., Han G.W., Huang X.P., Liu W., Siu F.Y., Roth B.L., Cherezov V., Stevens R.C., Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature*, 2013, 497, 338–343.
- Warne T., Serrano-Vega M.J., Baker J.G., Moukhametzianov R., Edwards P.C., Henderson R., Leslie A.G., Tate C.G., Schertler G.F., Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2008, 454, 486–491.
- Weiss D.R., Ahn S., Sassano M.F., Kleist A., Zhu X., Strachan R., Roth B.L., Lefkowitz R.J., Shoichet B.K., Conformation Guides Molecular Efficacy in Docking Screens of Activated beta-2 Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *ACS Chem Biol*, 2013, 8, 1018–1026.
- Wu B., Chien E.Y., Mol C.D., Fenalti G., Liu W., Katritch V., Abagyan R., Brooun A., Wells P., Bi F.C., Hamel D.J., Kuhn P., Handel T.M., Cherezov V., Stevens R.C., Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010, 330, 1066–1071.
- Wu H., Wacker D., Mileni M., Katritch V., Han G.W., Vardy E., Liu W., Thompson A.A., Huang X.P., Carroll F.I., Mascarella S.W., Westkaemper R.B., Mosier P.D., Roth B.L., Cherezov V., Stevens R.C., Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*, 2012, 485, 327–332.
- Yona S., Lin H.H., Siu W.O., Gordon S., Stacey M., Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33, 491–500.

Chapter 12

Differential Assembly of GPCR Signaling Complexes Determines Signaling Specificity

Pascal Maurice, Abba Benleulmi-Chaachoua, and Ralf Jockers

Contents

12.1	Introduction.....	226
12.2	Impact of the Cellular Context.....	228
12.3	GPCR Dimerization.....	229
12.4	Complex Formation with Membrane Proteins Other Than GPCRs.....	230
12.5	Physiological Changes, Illustrated by Circadian Rhythmicity.....	232
12.6	Localization of GPCRs at Different Subcellular Compartments.....	233
12.7	Targeting GPCR-GIP Interaction In Vivo: A Promising Approach for Specific Therapeutic Intervention?.....	235
12.8	Conclusions.....	236
	References.....	236

Abstract Recent proteomic and biochemical evidence indicates that cellular signaling is organized in protein modules. G protein-coupled receptors (GPCRs) are privileged entry points for extracellular signals that are transmitted through the plasma membrane into the cell. The adequate cellular response and signaling specificity is regulated by GPCR-associated protein modules. The composition of these modules is dynamic and might depend on receptor stimulation, the proteome of a given cellular context, the subcellular localization of receptor-associated modules, the formation of GPCR oligomers and the variation of expression levels of components of these modules under physiological, for example circadian rhythm, or pathological conditions. The current article will highlight the importance of GPCR-associated protein modules as a biochemical basis for signaling specificity.

P. Maurice • A. Benleulmi-Chaachoua • R. Jockers (✉)
Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France
CNRS UMR 8104, Paris, France
University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France
e-mail: ralf.jockers@inserm.fr

Keywords Circadian rhythm • Compartmentalization • Complex assembly • Dimerization • Therapeutic

12.1 Introduction

Membrane receptors are at the interface between the extra- and intra-cellular environment and are thus crucial for cellular communication. The superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs) constitutes the largest family of membrane receptors with approximately 800 members in humans (Vassilatis et al. 2003; Fredriksson and Schiöth 2005). They are composed of seven transmembrane domains connected by short intra- and extra-cellular loops and respond to a large panel of signals: photons, ions, metabolites, amino acids, lipids, peptides and proteins. Despite this ligand diversity, the overall architecture and activation mechanism is believed to be highly conserved for these receptors. Many GPCRs are able to activate heterotrimeric G proteins composed of α , β and γ subunits. G proteins are classified according to the activation of various effectors: $G_{i/o}$ and G_s proteins are typically involved in the inhibition and stimulation of adenylyl cyclase, respectively; $G_{q/11}$ proteins in the stimulation of phospholipase C and $G_{12/13}$ proteins in the activation of small G proteins and cytoskeleton rearrangements. According to the type of G protein activated, GPCRs have been initially classified as $G_{i/o}$ -, G_s -, $G_{q/11}$ - or $G_{12/13}$ -coupled receptors. However, replication of these studies in different cell types and experimental conditions clearly show that most GPCRs do not couple to one single G protein but often to several of them. Activation of additional G protein-independent signaling events, i.e. β -arrestin-dependent pathways, are also increasingly described. The capacity of GPCRs to signal through multiple pathways together with the fact that signaling pathways are highly interconnected within networks raises the fundamental and still largely unsolved question of how signaling specificity is obtained upon stimulation of cells with a given ligand.

A simple way to generate signaling specificity is the expression of different receptor isoforms responding to the same ligand but triggering different signaling events (Fig. 12.1a). This strategy is widely used and applies to multiple neurotransmitters (serotonin, dopamine, glutamate, etc.). In other more limited circumstances, signaling specificity is generated by the expression of different natural ligands targeting the same receptor with different functional outcomes (Fig. 12.1c). Prominent examples are the β_2 -adrenergic receptors (β_2 AR) that is activated by epinephrine and norepinephrine (Reiner et al. 2010) and the parathyroid hormone receptor (PTHrP) that is activated by PTH and the PTH-related peptide (PTHrP) (Ferrandon et al. 2009). Epinephrine and norepinephrine induce different conformational changes within the receptor with different kinetics as monitored with a fluorescently tagged β_2 AR FRET sensor. These differences translate into different capacities to activate G_s - and β -arrestin-dependent signaling events. In the case of the PTHrP, both natural ligands trigger different durations of the cAMP responses in which PTHrP-promoted actions are short-lived and restricted to the cell surface and

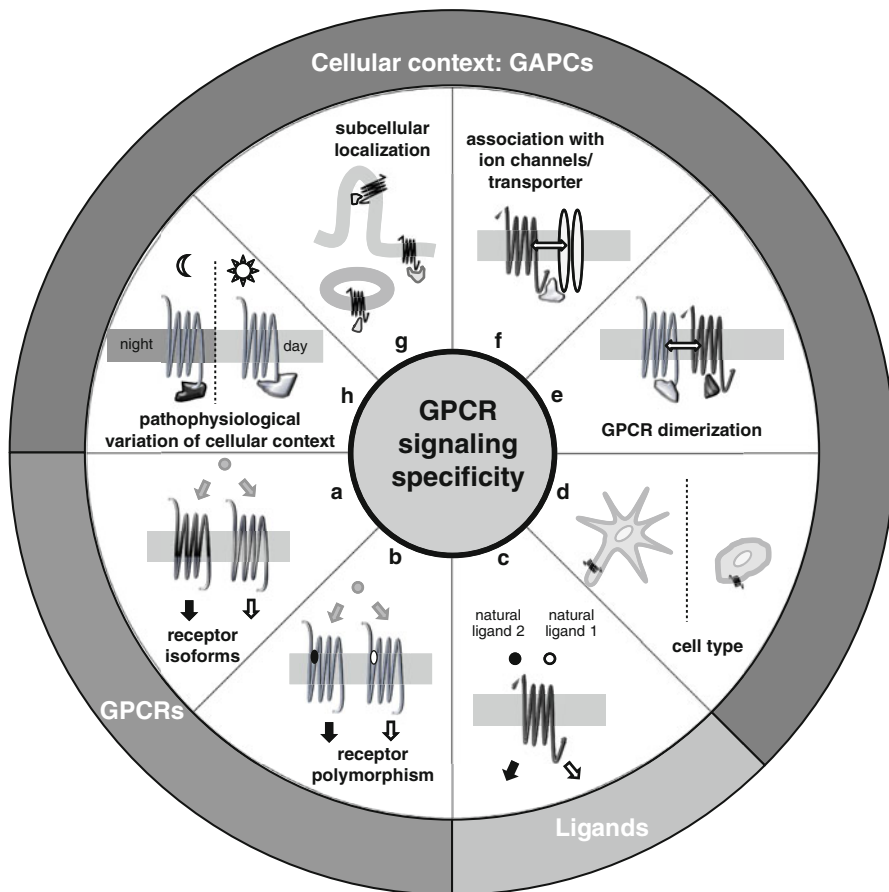


Fig. 12.1 Schematic illustration of different means to generate GPCR signaling specificity. (a) Stimulation of different receptor isoforms by the same ligand may result in the activation of different signaling pathways; (b) receptor polymorphisms may modify the functional properties of receptors; (c) different natural ligands may activate the same receptor differently; (d) receptor function may vary depending on the cellular context; (e) GPCR dimerization may modify receptor function and the recruitment of different GAPCs; (f) association of GPCRs with ion channels and neurotransmitter transporters may modify receptor function; (g) the subcellular localization of receptors may impact on receptor function; (h) the functional response of receptors may vary depending on physiological or pathological changes of receptor or GPCR expression. Changes in GPCR composition as a function of the circadian rhythm are illustrated

PTH-promoted actions are long-lived and dependent on receptor internalization. This idea can be also extended towards inverse agonists as illustrated by melanocortin MC3/MC4 receptors and their naturally occurring inverse agonists agouti and agouti-related protein (Agrp) that diminish the action of the melanocortin receptor agonist α -melanocyte-stimulating hormone (Adan and Kas 2003).

The same strategy is increasingly applied by pharmaceutical industry to design synthetic ligands with biased signaling properties. The idea behind biased ligands is to develop drugs that activate only a subset of signaling pathways (ideally only those important for the therapeutic effect) thus significantly decreasing unwanted side effects of drugs due to the activation of therapeutically irrelevant pathways. The proof-of-concept for such a strategy has been shown for the nicotinic acid receptor. Nicotinic acid is one of the most effective agents for both lowering triglycerides and raising HDL levels. However, the side effect of cutaneous flushing severely limits patient compliance. Recent evidence suggests that effects on lipid metabolism are mediated by $G_{i/o}$ proteins and flushing by β -arrestin (Walters et al. 2009). Drugs with reduced flushing profiles are currently developed (Shen et al. 2010).

Furthermore, receptor polymorphisms might modify the signaling profile of the receptor and thus redirect the functional outcome (Fig. 12.1b). This aspect has to be considered in the context of personalized drug design.

Although the abovementioned cases participate in the generation of signaling specificity, they only apply to a subset of situations and leave the majority of cases unexplained. Indeed, the signaling outcome of the stimulation of a particular receptor might largely depend on the cellular context, the precise subcellular localization of receptors, their clustering and their interaction with signaling modules, whose composition might vary depending on different physiological or pathological conditions. The present article describes how signaling specificity can be generated under these different circumstances. We will focus our attention on the importance of GPCR-associated protein complexes (GAPCs) that might be either involved in the trafficking and subcellular localization of the receptor or directly in receptor signaling. Importantly, integration of receptors into different preformed signaling complexes might be a biochemical basis for the generation of signaling specificity.

12.2 Impact of the Cellular Context

Activation of specific signaling pathways and the functional outcome of receptor activation depend on the cellular context. This may include differences in the functional response depending on the differentiation state of cells, for example preadipocytes *vs.* adipocytes, or on the cell types (immune cells, epithelial cells, neurons, etc.). Differences may occur at the level of receptor expression, receptor localization, the expression pattern of effector systems and downstream signaling pathways as well as expression of components of GAPCs (Fig. 12.1d).

This is well illustrated by the regulator of G protein signaling (RGS) proteins. RGS proteins are GTPase-activating proteins that accelerate the GTPase activity of $G\alpha$ subunits, thereby modulating G protein signaling (Sjogren 2011). In addition to their selectivity for certain $G\alpha$ subtypes, one obvious source of specificity is the tissue- or cell-specific expression pattern of RGS. A good example is the distinct localization of the two splice variants of RGS9. RGS9, a member of the R7 family of RGS proteins, is expressed as two splice variants, RGS9-1 in the retina and the

longer form RGS9-2 primarily postsynaptic in dopamine receptor-rich brain regions, such as the striatum (Gold et al. 1997; Mancuso et al. 2010). In the retina, RGS9-1 is exclusively found in the outer segment of photoreceptor cells in which it regulates signaling through transducin α subunits in rods and cones (Cowan et al. 1998; He et al. 1998). This protein seems to be essential for normal visual perception as demonstrated by the RGS9 knockout mice and humans with mutations in RGS9 (Nishiguchi et al. 2004; Michaelides et al. 2010). In contrast, RGS9-2 is highly expressed in the striatum where it regulates opioidergic and dopaminergic responses (Gold et al. 1997). RGS proteins have been also implicated in regulating cancer progression. In many cases, the link is related to changes in expression. For instance, RGS2 and RGS4 mRNA are both down-regulated in ovarian cancer cell lines, in contrast to RGS6 mRNA which is upregulated, indicating different and specific functional roles for these proteins (for review, see Hurst and Hooks 2009).

12.3 GPCR Dimerization

Organization of GPCRs into dimeric clusters has been considered for more than 10 years and is now supported by numerous studies (Milligan 2009) and the crystal structure of two GPCRs (Palczewski et al. 2000; Wu et al. 2010). GPCR heterodimerization is a topic of great interest due to the potential importance of the functional consequences of such interactions on signal transduction pathways. Depending on the two protomers constituting the dimer (the dimer being the minimal functional oligomeric unit), the composition of the GAPCs can vary and generate signaling specificity (Fig. 12.1e). In addition, GPCR heterodimerization offers a plausible solution for the simultaneous binding of many interaction partners to the receptor and would increase the diversity of the activation response of such complexes.

Accumulating evidence in the literature indicates that heterodimerization may modify the G protein coupling profile. For instance, signaling of μ - and δ -opioid receptor heterodimers is insensitive to pertussis toxin (PTX) treatment in contrast to the individually expressed receptors, suggesting a switch from PTX-sensitive to PTX-insensitive G protein coupling (George et al. 2000). Other studies on dopamine D_1 and D_2 receptor heterodimers demonstrated that the $G\alpha_s$ -coupled D_1 and the $G\alpha_i$ -coupled D_2 receptors become $G\alpha_{q/11}$ -coupled in the corresponding heterodimer (Rashid et al. 2007). These examples illustrate how heterodimerization between two different GPCRs can determine signaling specificity.

Asymmetry between the two protomers of a GPCR dimer may also contribute to signaling specificity (for review, see (Maurice et al. 2011; Kamal et al. 2011)). The recent development of a functional complementation assay allowed to explore the individual contribution of each protomer of class A GPCR dimers (Han et al. 2009). A *trans*-activation model was proposed in which the agonist-occupied protomer can *trans*-activate the second protomer that associates with the $G\alpha$ subunit to modulate the signal transduction pathway. Another example in which asymmetry downstream of the G protein determines signaling specificity was recently reported for the

melatonin MT_1/MT_2 heterodimer and RGS20 (Maurice et al. 2010). In contrast to the MT_2 receptor, which only couples to G_i proteins, the MT_1 receptor forms a constitutive ternary complex with both G_i and RGS20. By using a ligand binding-deficient MT_1^* mutant and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) studies with energy transfer probes at different sites of the $MT_1/Gi/RGS20$ complex, Maurice et al. showed that activation of the MT_2 protomer, within the MT_1^*/MT_2 heteromer, can *cis*-activate G_i , which then interacts functionally with RGS20 bound to the MT_1^* protomer. This shows that receptors, such as MT_2 , that are insensitive to a specific GPCR-interacting protein (GIP) can become sensitive to the action of this GIP in the appropriate heterodimer complex.

Agonist binding to GPCRs and G protein activation are followed by the recruitment of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) that phosphorylate the receptor, and of arrestins triggering receptor endocytosis and arrestin-dependent signal transduction (Reiter and Lefkowitz 2006). The receptor/GRK stoichiometry remains unknown but several studies have reported that binding of only one GRK molecule to the receptor dimer might be sufficient for full receptor phosphorylation of both protomers by cross-phosphorylation. This phenomenon has been shown for rhodopsin for which recruitment of the rhodopsin kinase to an activated rhodopsin can cross-phosphorylate multiple nearby non-activated rhodopsin molecules (Shi et al. 2005) and for several other class A GPCR heteromers (Pfeiffer et al. 2002, 2003). In these studies, GRK cross-phosphorylation of the unligated GPCR within the heterodimer was accompanied by co-internalization of this unligated protomer together with the ligand-bound protomer of the dimer (Pfeiffer et al. 2002, 2003). Cross-internalization of receptors within GPCR heterodimers may have important functional consequences, as shown in the case of the μ/δ -opioid receptor heterodimer. Activation of the δ -opioid receptor cross-internalizes μ -opioid receptors, thereby severely limiting μ -opioid receptor-associated morphine analgesia (He et al. 2011).

Taken together, these examples indicate how GPCR heterodimerization, by acting as scaffolds and by assembling distinct GAPCs, can generate signaling properties that differ from those observed in the corresponding homodimers thus illustrating the diversification of the functional properties of receptors by heterodimerization.

12.4 Complex Formation with Membrane Proteins Other Than GPCRs

GPCRs have not only been reported to cluster into homo- and heterodimeric complexes but also with other major transmembrane proteins as diverse as neurotransmitter transporters and ion channels, which are privileged pharmacological targets by themselves (Fig. 12.1f). A physical and functional interaction was reported between the γ -aminobutyric-acid A ($GABA_A$) -ligand gated channel and the dopamine D_5 receptor (Liu et al. 2000). Interestingly, this association was shown to enable mutually inhibitory effects resulting in D_5 receptor-attenuated $GABA_A$ -mediated inhibitory postsynaptic currents and $GABA_A$ -stimulated reductions of D_5

receptor cAMP accumulation. These findings are of primary importance since GABA_A receptors mediate fast inhibitory synaptic transmission at the vast majority of inhibitory synapses in the brain, thereby playing a fundamental role in brain physiology and pathology.

The ionotropic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor was also reported to physically interact with the D₁ receptor (Lee et al. 2002) and more recently with the mGlu5a receptor (Perroy et al. 2008). NMDA receptors play an important role in the regulation of activity-dependent neuroplasticity and excitotoxicity and the interaction with D₁ was reported to modulate NMDA receptor-mediated functions in hippocampal culture neurons (Lee et al. 2002). Interaction with mGlu5a allows reciprocal modulation of both receptors; the mGlu5a receptor decreases NMDA receptor currents and the NMDA receptor strongly reduces the ability of the mGlu5a receptor to release intracellular calcium (Perroy et al. 2008). These studies illustrate the richness in the functional interactions between a GPCR and other unrelated transmembrane receptors, leading to a much higher degree of effector specificity and subcellular signaling pathways.

The nociceptin (ORL1) receptor has been shown to physically and specifically interact with another type of ion channel, the voltage-gated N-type Ca_v2.2 calcium channel (Beedle et al. 2004). Calcium influx through N-type calcium channels in dorsal root ganglion (DRG) neurons is an essential step in the transmission of nociceptive signals at the spinal level. Specific interaction between ORL1 and Ca_v2.2 has been shown to result in an agonist-independent, receptor concentration-dependent inhibition of the channel *in vitro* and in DRG neurons (Beedle et al. 2004). These findings raised the possibility that the activity of N-type calcium channels, and consequently transmission of pain signals, may be regulated by difference in GPCR (ORL1) receptor density. Further characterization of the ORL1/Ca_v2.2 interaction showed that prolonged exposure of ORL1 to its cognate agonist nociceptin triggers co-internalization of ORL1 and the ion channel thus down-regulating calcium entry in DRG neurons (Altier et al. 2006).

Preferential interactions have also been reported between GPCRs and neurotransmitter transporters. The dopamine D₂ and orphan GPR37 receptor have been shown to interact with the dopamine transporter (DAT), one of the key presynaptic components involved in regulating dopaminergic tone. The physical coupling between DAT and D₂ facilitates the recruitment of intracellular DAT to the plasma membrane, thus enhancing dopamine reuptake in primary cultures of rat midbrain neurons. Disruption of the D₂/DAT interaction in mice decreases synaptosomal dopamine uptake and increases locomotor activity (Lee et al. 2007). Interestingly, opposite effects have been reported following interaction of DAT with GPR37 (Marazziti et al. 2007). *Gpr37*-null mutant mice show enhanced DAT-mediated dopamine uptake in striatal membrane samples, with a significant increase in the number of membrane DAT molecules. Taken together, these two studies demonstrate how, according to the nature of the GPCR engaged in a complex with a neurotransmitter transporter, opposite functional effects can be observed.

Formation of stable GPCR-effector complexes within the plasma membrane is also exemplified by GPCRs and G protein-gated inwardly-rectifying K⁺ (GIRK)

channels, particularly of family 3 (Kir3). Kir3 channels represent a family of ion channels that mediate the postsynaptic inhibitory effect of many neurotransmitters and drugs of abuse. In 2002, a first study reported the formation of stable complexes of Kir3 with D₂-like, D₄ and β_2 adrenergic receptors using co-immunoprecipitation and BRET experiments (Lavine et al. 2002). Further studies reported formation of such complexes with other GPCRs such as GABA_B receptors (David et al. 2006; Ciruela et al. 2010; Fowler et al. 2007), and muscarinic M₂, serotonin 1_A, adenosine A₁, and LPA₁ receptors (Jaen and Doupnik 2006).

Overall, these different studies suggest that assemblies containing these components may represent a common organizational premise needed to determine specificity and efficacy of signal transduction and may be critical to assure the speed of signaling.

12.5 Physiological Changes, Illustrated by Circadian Rhythmicity

The cellular state is constantly changing depending on the cell cycle and the developmental stage of the organism. An interesting regular modification of biological systems is imposed by the biological clock that generates circadian rhythmicity at the cellular level. It is estimated that at least 10 % of all genes are cycling in a circadian manner, which has obviously important functional consequences on cellular homeostasis (Lowrey and Takahashi 2004). Two recent examples illustrate the direct impact of circadian rhythmicity on GPCR function (Fig. 12.1h).

In mammals, the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) is the central pacemaker, generating an endogenous and self-sustained circadian activity and coordinating rhythms of numerous peripheral tissues (Sujino et al. 2003). Circadian rhythmicity is generated at the cellular level but how the phase and period of circadian oscillation of different SCN neurons is maintained remains largely unknown. Oscillation in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels is known to be an important component of circadian rhythmicity. The cAMP system can be manipulated by several means. cAMP production is controlled by stimulating G_s or G_i protein-coupled receptors that activate or inhibit adenylyl cyclases, respectively. Degradation of cAMP occurs through phosphodiesterases. In addition, RGS proteins such as RGS16 may inhibit the function of G_i proteins by accelerating their GTP-GDP exchange rate. Interestingly, RGS16 is expressed in a circadian manner in the dorsomedial part of the SCN with peak levels during dawn modulating cAMP signaling in a highly regulated spatiotemporal manner (Doi et al. 2011). Ablation of the *Rgs16* gene eliminates the circadian cAMP production and, as a result, lengthened the circadian period of the locomotor activity rhythm thus demonstrating the importance of defined circadian activation patterns for behavioral outputs. This is further underlined by the fact that cAMP levels in *Rgs16* knockout mice remained constant at an elevated level demonstrating that not elevated cAMP levels *per se* but rather their rhythmicity are important. Taken together, rhythmic

changes in the expression of an important component of GPCR signaling, RGS16, may define signaling specificity in a temporal manner.

Another example illustrating the impact of the circadian rhythm on GPCR signaling has been shown in a peripheral organ, the liver (Zhang et al. 2010). In hepatic cells, intracellular cAMP levels appear to be regulated by a core component of the circadian rhythm generating cellular machinery, cryptochrome proteins (Cry). Circadian control of gene expression is achieved by two transcriptional activators, Clock and Bmal1, which stimulate Cry1, Cry2 and Period repressors that feedback on Clock-Bmal1 activity (Reppert and Weaver 2002). Recent evidence indicates that Cry may have additional, extra-nuclear, functions in hepatocytes (Zhang et al. 2010). Cry protein expression is rhythmic with peak levels during the night-day transition. By interacting with G_s proteins, Cry diminishes intracellular cAMP levels in a circadian manner due to its circadian expression pattern. This may be of physiological relevance as the liver clock regulates the gluconeogenic genetic program through Cry-mediated inhibition of CREB activity during fasting. Furthermore, hepatic overexpression of Cry1 lowered blood glucose concentrations and improved insulin sensitivity in insulin-resistant db/db mice suggesting that enhancing Cry activity might be beneficial in type 2 diabetes treatment. Taken together, circadian expression of proteins involved in the regulation of GPCR signaling provides a powerful means to control GPCR signaling specificity.

12.6 Localization of GPCRs at Different Subcellular Compartments

GPCR signaling specificity can be modulated depending on receptor localization at different subcellular compartments (Fig. 12.1g). Targeting of receptors to these compartments determines receptor function due to the specific physicochemical properties of each compartment (membrane rigidity and lipid composition) and the enrichment of GAPCs and signaling pathway components in these compartments. Microdomains (lipid rafts and caveolae) are specialized compartments of the plasma membrane that are highly structured zones of low fluidity due to their enrichment in cholesterol and sphingolipids. The structural integrity of caveolae is further maintained by a coat composed of caveolin protein at the cytoplasmic side. Microdomains have been suggested to constitute a scaffolding zone of GPCR signaling cascades that also modify GPCR trafficking and favor crosstalk with other signaling pathways. The precise mechanism of GPCR targeting into these microdomains remains unclear, in particular whether some GPCRs show higher intrinsic affinity for microdomains than others or whether microdomain-enriched GAPCs target GPCR to these domains (Insel et al. 2005). Furthermore, the impact of microdomains on GPCR localization and signaling specificity may vary depending on the tissue, as some cells, such as adipocytes, are richer in microdomains than others.

An obvious role of caveolae in determining the functional outcome of GPCR signaling is provided by caveolae-localized PAR1 receptors that phosphorylate

caveolin-1 in a Src-dependent manner. Phosphocaveolin-1 then binds to the SH2 domain of the C-terminal Src kinase (Csk) resulting in a rapid decrease in Src kinase activity. Thus, PAR1-induced Src activation is down-regulated by recruiting Csk specifically in caveolin-1 containing microdomains (Lu et al. 2006).

GnRH receptors have been shown to constitutively localize within microdomains as part of a preformed signaling complex composed of caveolin-1, c-Src, protein kinase C, Ras, MAPK kinase 1/2, ERK1/2, tubulin, FAK, paxillin, vinculin, and kinase suppressor of Ras-1 (Dobkin-Bekman et al. 2009). Stimulation by GnRH induces molecular rearrangement of the complex, the rapid dissociation of some components and the phosphorylation of FAK and paxillin by ERK1/2. Whereas activation of ERK1/2 typically induces their nuclear translocation and phosphorylation of transcription factors, scaffolding into microdomain-associated multiprotein signaling complexes, as described here, helps to maintain the activated ERK1/2 pool within the cytoplasm and to phosphorylate FAK and paxillin at focal adhesions.

Primary cilia are appendages present at the cell surface on most mammalian cells involved in signal sensing and transmission (Goetz and Anderson 2010). Some GPCRs, including somatostatin receptor 3, serotonin receptor 6, smoothened, dopamine D₁ receptor and melanin-concentrating hormone receptor 1 localize to cilia. The importance of the localization and signaling of GPCRs in primary cilia is suggested by altered signaling caused by the absence of cilia formation (Berbari et al. 2009). Some molecular determinants directing localization of GPCRs to cilia have been identified in the third intracellular loop, which most likely binds to cytoskeleton proteins involved in the transport into and out of cilia (Berbari et al. 2008). The functions of cilia are defined by the signaling proteins localized to the ciliary membrane such as adenylyl cyclases, heterotrimeric G proteins and β -arrestins. What makes primary cilia so special compared to other cell surface-exposed membrane regions, remains still an open question and warrants further investigation.

Many GPCRs contain a PSD-95/Disc large/Zonula occludens 1 (PDZ) ligand sequence composed of three amino acids at their carboxyl-terminal extremity (Heydorn et al. 2004). These PDZ ligands are recognized by PDZ domains, which are present in almost 200 proteins. PDZ domains are scaffolding domains per excellence that are involved in GPCR trafficking and subcellular localization. The post-synaptic density protein 95 (PSD95) contains three PDZ domains and interacts with the serotonin 5-HT_{2C} receptor and other GPCRs in post-synaptic membranes (Becamel et al. 2002). PSD95 is also part of large molecular networks such as the PSD95/GKAP/Shank/Homer3 complex that physically and functionally connects NMDA receptors (PSD95 binding partner) to metabotropic glutamate 5 receptors (mGluR5) (Homayoun and Moghaddam 2010). Homer three proteins assemble into tetramers bridging GKAP and mGluR5. Interestingly, this complex can be disrupted by the monomeric immediate early gene Homer1a that blocks the interaction between GKAP and mGluR5 by competing with Homer3. This indicates a dynamic regulation of the presence of mGluR5 in the complex and possibly its localization to post-synaptic membranes (Bertaso et al. 2010).

Signaling of GPCRs has been reported not only at the plasma membrane or specialized plasma membrane sub-compartments such as microdomains, primary

cilia and synapses, but also in intracellular membranes such as endosomes and nuclear membranes (Boivin et al. 2008; Calebiro et al. 2010). GAPCs appear to play an important role under these circumstances as current observations are compatible with the joint translocation of both receptors and their GAPCs from the cell surface to intracellular compartments to prolong their signaling capacity. It remains however unclear why these complexes remain stable during receptor endocytosis and which component is responsible for the targeting of the complex to specific intracellular sites. Although it is tempting to speculate that specific GAPCs participate in this new paradigm of signaling specificity, experimental proof for this hypothesis is still lacking.

12.7 Targeting GPCR-GIP Interaction In Vivo: A Promising Approach for Specific Therapeutic Intervention?

An important issue concerns the pathophysiological relevance of such differential assembly of GAPCs. Indeed, the potential of targeting GPCR-GIP interactions as a novel approach for therapeutic intervention is of particular interest and specific disruption of a GPCR/GIP interaction in a given tissue without affecting the interaction of this same GPCR with other GIPs in another tissue represents an attractive strategy for drug discovery. Emerging evidence that illustrate this concept came from studies based on the use of cell-penetrating HIV TAT-conjugated peptides that clearly showed the potential of peptides in disrupting a specific GPCR/GIP interaction.

A first example was proposed by the study of Ji et al. (2006) reporting that intravenous injection in rats of a TAT-conjugated peptide encompassing the PTEN-binding motif located within the i3 loop of 5-HT_{2C} receptor suppresses the firing rate of ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons induced by d9-tetrahydrocannabinol (THC), thereby reproducing the effect of 5-HT_{2C} receptor agonists. As 5-HT_{2C} receptor agonists, this TAT-peptide also inhibits the rewarding effects of THC (and nicotine) mediated by VTA dopaminergic neurons. However, it does not reproduce the side effects (anxiogenic effects, penile erection, hypophagia, and motor functional suppression) observed following administration of 5-HT_{2C} agonists (Ji et al. 2006).

Disruption of the mGluR7a/PICK1 interaction by intravenous injection of a TAT-conjugated peptide was able to trigger absence epilepsy-like seizures in mice and rats, providing evidence that a single PDZ protein/GPCR interaction can result in a specific neurological disorder (Bertaso et al. 2008). More recently, disruption of the interaction between 5-HT_{2A} and PDZ proteins in diabetic neuropathic rats by a TAT-conjugated peptide encompassing the nine C-terminal residues of the 5-HT_{2A} receptor was shown to induce an antihyperalgesic effect and to strongly enhance antihyperalgesia induced by the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine. This study thus suggests that 5-HT_{2A} receptor/PDZ protein interactions might contribute to the resistance to SSRI-induced analgesia in painful diabetic neuropathy and that disruption of these interactions might be a valuable strategy to

design novel treatments for neuropathic pain and to increase the effectiveness of SSRIs (Pichon et al. 2010).

The importance of D_1/D_2 heterodimers in human disease was suggested in a recent study showing that physical interaction between dopamine D_1 and D_2 receptors is markedly increased in postmortem brains of patients suffering from major depression. Administration of an interfering peptide consisting of a sequence located in the third intracellular loop of D_2 that disrupts the D_1 - D_2 receptor complex reduced immobility in the forced swim test without affecting locomotor activity, and decreased escape failures in learned helplessness tests in rats (Pei et al. 2010). This study thus provided evidence for potential implication of GPCR heterodimers and associated signaling specificity in human diseases.

12.8 Conclusions

Evolution has selected several ways to achieve signaling specificity, by generating receptor isoforms, receptor polymorphisms, differential localization and targeting of receptors and pre-assembly of receptors and GAPCs into defined and distinct signaling modules. The latter holds the potential to explain many of the observed signaling specificity. However, we are only beginning to define the precise composition and impact of these modules on receptor signaling. Given the dynamic nature of these modules, a precise analysis has to be performed for each receptor in a specific cellular context and under defined physiological and pathological conditions.

Acknowledgements We thank Jean-Luc Guillaume (Institut Cochin, Paris) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (“Equipe FRM”, to RJ), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Servier and a research fellowship from the Ile-de-France region (ABC).

References

- Adan RA, Kas MJ (2003) Inverse agonism gains weight. *Trends Pharmacol Sci* 24(6):315–321
- Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* 9(1):31–40. doi:10.1038/nn1605, pii:nn1605
- Becamel C, Alonso G, Geleotti N, Demey E, Jouin P, Ullmer C, Dumuis A, Bockaert J, Marin P (2002) Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT_{2C} receptors: a proteomic approach. *EMBO J* 21(10):2332–2342
- Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, Hamid J, Nargeot J, Bourinet E, Zamponi GW (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* 7(2):118–125

- Berbari NF, Johnson AD, Lewis JS, Askwith CC, Mykityn K (2008) Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* 19(4):1540–1547. doi:[10.1091/mbc.E07-09-0942](https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0942), pii:E07-09-0942
- Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK (2009) The primary cilium as a complex signaling center. *Curr Biol* 19(13):R526–R535. doi:[10.1016/j.cub.2009.05.025](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.025), pii:S0960-9822(09)01126-9
- Bertaso F, Zhang C, Scheschonka A, de Bock F, Fontanaud P, Marin P, Huganir RL, Betz H, Bockaert J, Fagni L, Lerner-Natoli M (2008) PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nat Neurosci* 11(8):940–948. doi:[10.1038/nn.2142](https://doi.org/10.1038/nn.2142), pii:nn.2142
- Bertaso F, Roussignol G, Worley P, Bockaert J, Fagni L, Ango F (2010) Homer1a-dependent crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in mouse neurons. *PLoS One* 5(3):e9755. doi:[10.1371/journal.pone.0009755](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009755)
- Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE (2008) G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *J Recept Signal Transduct Res* 28(1–2):15–28. doi:[10.1080/10799890801941889](https://doi.org/10.1080/10799890801941889), pii:792548935
- Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ (2010) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31(5):221–228. doi:[10.1016/j.tips.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.002), pii:S0165-6147(10)00014-3
- Ciruella F, Fernandez-Duenas V, Sahlholm K, Fernandez-Alacid L, Nicolau JC, Watanabe M, Lujan R (2010) Evidence for oligomerization between GABAB receptors and GIRK channels containing the GIRK1 and GIRK3 subunits. *Eur J Neurosci* 32(8):1265–1277. doi:[10.1111/j.1460-9568.2010.07356.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07356.x)
- Cowan CW, Fariss RN, Sokal I, Palczewski K, Wensel TG (1998) High expression levels in cones of RGS9, the predominant GTPase accelerating protein of rods. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(9):5351–5356
- David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupre DJ, Hebert TE (2006) Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cell Signal* 18(12):2172–2181. doi:[10.1016/j.cellsig.2006.05.014](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.014), pii:S0898-6568(06)00102-1
- Dobkin-Bekman M, Naidich M, Rahamim L, Przeddecki F, Almog T, Lim S, Melamed P, Liu P, Wohland T, Yao Z, Seger R, Naor Z (2009) A preformed signaling complex mediates GnRH-activated ERK phosphorylation of paxillin and FAK at focal adhesions in L beta T2 gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 23(11):1850–1864. doi:[10.1210/me.2008-0260](https://doi.org/10.1210/me.2008-0260), pii:me.2008-0260
- Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H (2011) Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Commun* 2:327. doi:[10.1038/ncomms1316](https://doi.org/10.1038/ncomms1316), pii:ncomms1316
- Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, Vilardaga JP (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* 5(10):734–742. doi:[10.1038/nchembio.206](https://doi.org/10.1038/nchembio.206), pii:nchembio.206
- Fowler CE, Aryal P, Suen KF, Slesinger PA (2007) Evidence for association of GABA(B) receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *J Physiol* 580(Pt 1):51–65. doi:[10.1113/jphysiol.2006.123216](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.123216), pii:jphysiol.2006.123216
- Fredriksson R, Schiöth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67(5):1414–1425
- George SR, Fan T, Xie ZD, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors – generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275(34):26128–26135
- Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11(5):331–344. doi:[10.1038/nrg2774](https://doi.org/10.1038/nrg2774), pii:nrg2774
- Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ (1997) Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* 17(20):8024–8037

- Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009) Allosteric communication between promoters of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* 5(9):688–695
- He W, Cowan CW, Wensel TG (1998) RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 20(1):95–102. pii:S0896-6273(00)80437-7
- He SQ, Zhang ZN, Guan JS, Liu HR, Zhao B, Wang HB, Li Q, Yang H, Luo J, Li ZY, Wang Q, Lu YJ, Bao L, Zhang X (2011) Facilitation of mu-opioid receptor activity by preventing delta-opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron* 69(1):120–131. doi:10.1016/j.neuron.2010.12.001, pii:S0896-6273(10)00986-4
- Heydorn A, Sondergaard BP, Ersboll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, Whistler J, Schwartz TW (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem* 279(52):54291–54303
- Homayoun H, Moghaddam B (2010) Group 5 metabotropic glutamate receptors: role in modulating cortical activity and relevance to cognition. *Eur J Pharmacol* 639(1–3):33–39. doi:10.1016/j.ejphar.2009.12.042, pii:S0014-2999(10)00254-2
- Hurst JH, Hooks SB (2009) Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* 78(10):1289–1297. doi:10.1016/j.bcp.2009.06.028, pii:S0006-2952(09)00497-3
- Insel PA, Head BP, Ostrom RS, Patel HH, Swaney JS, Tang CM, Roth DM (2005) Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047:166–172. doi:10.1196/annals.1341.015, pii:1047/1/166
- Jaen C, Doupnik CA (2006) RGS3 and RGS4 differentially associate with G protein-coupled receptor-Kir3 channel signaling complexes revealing two modes of RGS modulation. Precoupling and collision coupling. *J Biol Chem* 281(45):34549–34560. doi:10.1074/jbc.M603177200, pii:M603177200
- Ji SP, Zhang Y, Van Cleemput J, Jiang W, Liao M, Li L, Wan Q, Backstrom JR, Zhang X (2006) Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nat Med* 12(3):324–329. doi:10.1038/nm1349, pii:nm1349
- Kamal M, Maurice P, Jockers R (2011) Expanding the concept of G protein-coupled receptor (GPCR) dimer asymmetry towards GPCR-interacting proteins. *Pharmaceuticals* 4:273–284
- Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277(48):46010–46019. doi:10.1074/jbc.M205035200, pii:M205035200
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111(2):219–230. pii:S0092867402009625
- Lee FJ, Pei L, Moszczynska A, Vukusic B, Fletcher PJ, Liu F (2007) Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J* 26(8):2127–2136. doi:10.1038/sj.emboj.7601656, pii:7601656
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403(6767):274–280. doi:10.1038/35002014
- Lowrey PL, Takahashi JS (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:407–441. doi:10.1146/annurev.genom.5.061903.175925
- Lu TL, Kuo FT, Lu TJ, Hsu CY, Fu HW (2006) Negative regulation of protease-activated receptor 1-induced Src kinase activity by the association of phosphocaveolin-1 with Csk. *Cell Signal* 18(11):1977–1987. doi:10.1016/j.cellsig.2006.03.002, pii:S0898-6568(06)00068-4
- Mancuso JJ, Qian Y, Long C, Wu GY, Wensel TG (2010) Distribution of RGS9-2 in neurons of the mouse striatum. *J Neurochem* 112(3):651–661. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06488.x, pii:JNC6488

- Marazziti D, Mandillo S, Di Pietro C, Golini E, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP (2007) GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(23):9846–9851
- Maurice P, Daulat AM, Turecek R, Ivankova-Susankova K, Zamponi F, Kamal M, Clement N, Guillaume JL, Bettler B, Gales C, Delagrange P, Jockers R (2010) Molecular organization and dynamics of the melatonin MT receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J* 29(21):3646–3659. doi:[10.1038/emboj.2010.236](https://doi.org/10.1038/emboj.2010.236), pii:emboj2010236
- Maurice P, Kamal M, Jockers R (2011) Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol Sci* 32(9):514–520. doi:[10.1016/j.tips.2011.05.006](https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.006), pii:S0165-6147(11)00095-2
- Michaelides M, Li Z, Rana NA, Richardson EC, Hykin PG, Moore AT, Holder GE, Webster AR (2010) Novel mutations and electrophysiologic findings in RGS9- and R9AP-associated retinal dysfunction (Bradyopsia). *Ophthalmology* 117(1):120–127. e1. doi:[10.1016/j.ophtha.2009.06.011](https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.06.011), pii:S0161-6420(09)00613-7
- Milligan G (2009) G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol* 158(1):5–14
- Nishiguchi KM, Sandberg MA, Kooijman AC, Martemyanov KA, Pott JW, Hagstrom SA, Arshavsky VY, Berson EL, Dryja TP (2004) Defects in RGS9 or its anchor protein R9AP in patients with slow photoreceptor deactivation. *Nature* 427(6969):75–78. doi:[10.1038/nature02170](https://doi.org/10.1038/nature02170)
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, LeTrong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 289(5480):739–745
- Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, Nobrega JN, Liu F (2010) Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med* 16(12):1393–1395. doi:[10.1038/nm.2263](https://doi.org/10.1038/nm.2263), pii:nm.2263
- Perroy J, Raynaud F, Homburger V, Rousset MC, Telley L, Bockaert J, Fagni L (2008) Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 283(11):6799–6805. doi:[10.1074/jbc.M705661200](https://doi.org/10.1074/jbc.M705661200), pii:M705661200
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Hollt V, Schulz S (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277(22):19762–19772
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schroder H, Hollt V, Schulz S (2003) Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem* 278(51):51630–51637. doi:[10.1074/jbc.M307095200](https://doi.org/10.1074/jbc.M307095200), pii:M307095200
- Pichon X, Wattiez AS, Becamel C, Ehrlich I, Bockaert J, Eschalier A, Marin P, Courteix C (2010) Disrupting 5-HT(2A) receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol Ther* 18(8):1462–1470. doi:[10.1038/mt.2010.101](https://doi.org/10.1038/mt.2010.101), pii:mt2010101
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(2):654–659
- Reiner S, Ambrosio M, Hoffmann C, Lohse MJ (2010) Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 285(46):36188–36198. doi:[10.1074/jbc.M110.175604](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175604), pii:M110.175604
- Reiter E, Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17(4):159–165
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935–941
- Shen HC, Ding FX, Raghavan S, Deng Q, Luell S, Forrest MJ, Carballo-Jane E, Wilsie LC, Krsmanovic ML, Taggart AK, Wu KK, Wu TJ, Cheng K, Ren N, Cai TQ, Chen Q, Wang J,

- Wolff MS, Tong X, Holt TG, Waters MG, Hammond ML, Tata JR, Colletti SL (2010) Discovery of a biaryl cyclohexene carboxylic acid (MK-6892): a potent and selective high affinity niacin receptor full agonist with reduced flushing profiles in animals as a preclinical candidate. *J Med Chem* 53(6):2666–2670. doi:[10.1021/jm100022r](https://doi.org/10.1021/jm100022r)
- Shi GW, Chen J, Concepcion F, Motamedchaboki K, Marjoram P, Langen R (2005) Light causes phosphorylation of nonactivated visual pigments in intact mouse rod photoreceptor cells. *J Biol Chem* 280(50):41184–41191. doi:[10.1074/jbc.M506935200](https://doi.org/10.1074/jbc.M506935200), pii:M506935200
- Sjogren B (2011) Regulator of G protein signaling proteins as drug targets: current state and future possibilities. *Adv Pharmacol* 62:315–347. doi:[10.1016/B978-0-12-385952-5.00002-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00002-6), pii:B978-0-12-385952-5.00002-6
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H, Inouye ST (2003) Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol* 13(8):664–668, pii:S0960982203002227
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8):4903–4908
- Walters RW, Shukla AK, Kovacs JJ, Violin JD, DeWire SM, Lam CM, Chen JR, Muehlbauer MJ, Whalen EJ, Lefkowitz RJ (2009) Beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest* 119(5):1312–1321. doi:[10.1172/JCI36806](https://doi.org/10.1172/JCI36806), pii:36806
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330(6007):1066–1071. doi:[10.1126/science.1194396](https://doi.org/10.1126/science.1194396), pii:science.1194396
- Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 16(10):1152–1156. doi:[10.1038/nm.2214](https://doi.org/10.1038/nm.2214), pii:nm.2214

Pascal Maurice^{*,†,‡}, Jean-Luc Guillaume^{*,†,‡},
Abla Benleulmi-Chaachoua^{*,†,‡}, Avais M. Daulat^{*,†,‡},
Maud Kamal^{*,†,‡}, and Ralf Jockers^{*,†,‡}

*Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

†CNRS UMR 8104, Paris, France

‡Université Paris Descartes, Paris, France

GPCR-Interacting Proteins, Major Players of GPCR Function

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are, with approximately 800 members, among the most abundant membrane proteins in humans. They are responding to a plethora of ligands and are involved in the transmission of extracellular signals inside the cell. GPCRs are synthesized in the endoplasmatic reticulum and are then transported to the cell surface where they are typically activated. Receptor activation triggers several processes such as signaling and receptor endocytosis. Along their life cycle, GPCRs are accompanied by a range of specialized GPCR-interacting proteins (GIPs) to assist nascent receptors in proper folding, to target them to the appropriate subcellular compartments and to fulfill their signaling tasks. Differential expression of GIPs and rapid alterations of GPCR/GIP interaction networks are efficient means to regulate GPCR function in a tissue-specific and spatiotemporal manner to trigger appropriate cellular responses. Interfering with a GPCR/GIP interaction might become a new strategy for specific therapeutic intervention. This chapter will focus on the importance of GIPs along the GPCR life cycle and discuss the dynamics and molecular organization of GPCR/GIP complexes.

I. Introduction

The G protein-coupled receptor (GPCR) family represents in humans, with approximately 800 members, the largest family of cell surface proteins corresponding to about 3% of all genes. Although GPCRs may have very

different primary sequences, they have all in common a seven-transmembrane-spanning core domain involved in signal transduction. Important advances in genetic and proteomic methods identified numerous GPCR-interacting proteins (GIPs) that directly interact with the receptor and are part of larger GPCR-associated protein complexes (GAPCs), showing that GPCRs are integral parts of protein networks (Daulat et al., 2009). The significance of these interactions in respect of GPCR-associated functions has been identified in several cases. However, much remains to be done (Bockaert et al., 2010).

Systematic identification of GAPCs revealed various types of proteins, that is, cytoskeleton and nuclear proteins and proteins involved in trafficking and intracellular signaling. The various functions of these proteins nicely match the different stages of the life cycle of GPCRs including biosynthesis in the endoplasmic reticulum (ER), maturation in the Golgi, and transport to the cell surface followed by signal transduction and receptor internalization. Clearly, GPCRs are accompanied by different GAPCs at each of these stages. Accordingly, the framework of this chapter follows the different stages of the GPCR life cycle (biosynthesis, signaling, internalization). We will discuss the spatiotemporal organization of GAPCs, which is defined by the subcellular localization of these complexes or their dynamic nature depending on the activation state of the receptor as well as the repertoire of expressed GAPCs in a given cellular context. The last part of this chapter will highlight some recent *in vivo* reports showing that peptides interfering with the interaction between GPCRs and GIPs may abolish GPCR functions and might thus be of future therapeutic use by antagonizing specific GPCR functions.

II. Biosynthesis and Cell Surface Targeting of GPCRs _____

During their biosynthesis, nascent GPCRs interact in the ER with chaperones of the general cell machinery, which assist their correct folding and maturation by masking hydrophobic surfaces (family of heat-shock protein 70 chaperone, Hsp-70), by blocking unpaired cysteins or assisting disulfide bridge formation (protein disulfide isomerase), or by interacting with immature *N*-glycosyl chains cotranslationally added to the peptidic chain by the oligosaccharyl transferase complex (calnexin, calreticulin) (Fig. 1). Once sufficient folding is attained, proteins are packed into COPII-coated vesicles and exported to the ER-Golgi intermediate complex (ERGIC) and the Golgi where they are submitted to additional modifications such as maturation of glycosylated chains. Mature proteins are then exported from the Golgi to their destination, while misprocessed proteins undergo a retrograde transport to ER compartments for refolding steps or degradation. Both mechanisms involve COPI-coated vesicles under control of different Rab GTPases. The machinery components constitute the biosynthesis quality control by acting as sensors of misprocessed proteins. A growing body of

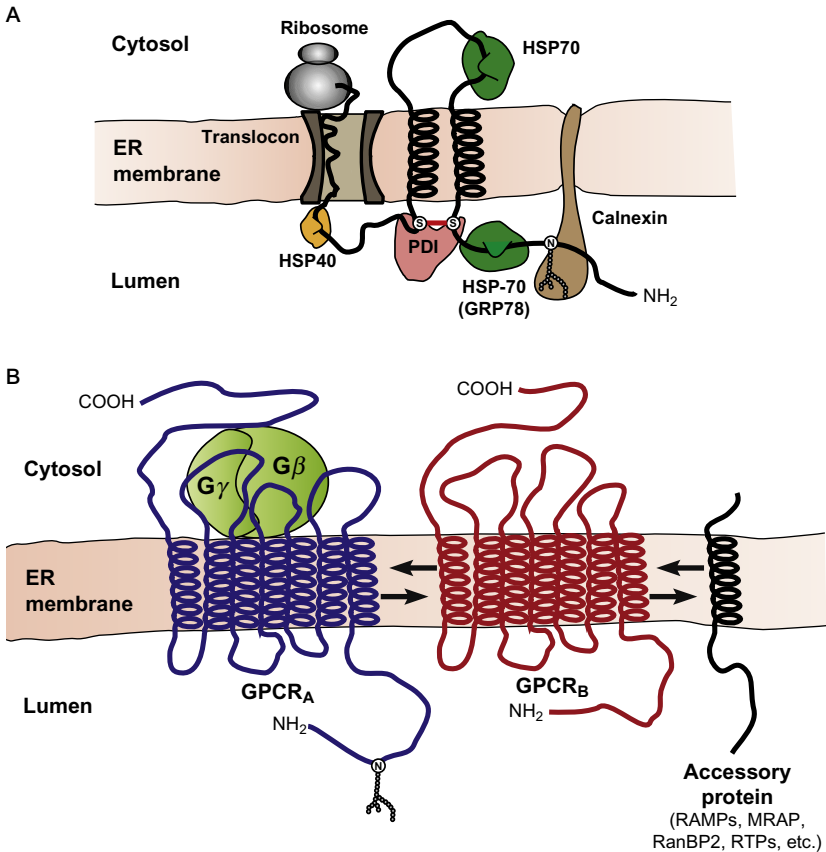


FIGURE I Endoplasmic reticulum (ER) interacting proteins of GPCRs. (A) Newly synthesized GPCRs interact with ER chaperones that assist their folding and first steps of maturation (Hsp-40, -70, heat-shock protein 40, 70, PDI, protein disulfide isomerase). (B) In the ER, monomers of GPCRs (GPCR-A and GPCR-B) can associate as homo- or heteromers and/or interact with accessory proteins stabilizing their structure and defining their export profile, and with signaling partners such as G $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G protein (RAMP, receptor activity-modifying protein; MRAP, melanocortin receptor accessory protein; RTP, receptor-transferring protein; RanBP2, Ran-binding protein 2).

evidence suggests that GPCRs dimerize/oligomerize as soon as at the biosynthesis stage (Bulenger et al., 2005). Oligomerization could represent an additional mechanism for proper folding, each protomer acting as a chaperone for the other via interaction of their hydrophobic surfaces. In addition, signaling proteins can be incorporated to the complex already at this early stage (Dupre & Hebert, 2006; Gales et al., 2005; Nobles et al., 2005) and could function as sorting signals for specific complexes.

A. Interaction Partners from the Biosynthesis Machinery

Not surprisingly, chaperones and effectors of GPCR maturation were found associated with receptor complexes by protein identification techniques (Daulat et al., 2007). However, recent works have reported specific interactions between chaperones and receptors.

The glucose-regulated protein GRP78 is a general Hsp-70 chaperone, which is specific to certain GPCRs. For instance, in line with its role in quality control, GRP78 binds to pathological mutants of the human luteinizing hormone (LH) receptor and retains them in the ER while it does not interact with the wild-type receptor, which is addressed to the cell surface (Mizrachi & Segaloff, 2004). GRP78 has been shown to bind β_2 -adrenoceptors (β_2 AR) but not angiotensin AT₁ receptors (Hammad & Dupre, 2010). Surprisingly, GRP78 can exhibit signaling properties by associating with the Hsp-40 chaperone MTJ11. In macrophages, by translocating to the plasma membrane, it forms a $G\alpha_{q/11}$ -coupled signaling complex activated by α_2 -macroglobulin (Misra & Pizzo, 2008).

HSJ1b is a Hsp-40 cochaperone protein preferentially expressed in neurons. In neuroblastoma cells, HSJ1b interacts with rhodopsin (Chapple & Cheetham, 2003) and provokes its retention in the ER. The large Ran-binding protein 2 (RanBP2) is another opsin chaperone, with peptide prolyl *cis-trans* activity. Its *Drosophila melanogaster* homologue NinaA binds Rh1 rhodopsin and is required for Rh1 expression to the cell membrane in the fly retina. Its absence leads to Rh1 ER retention and degradation (Baker et al., 1994). Similarly, RanBP2 is required for membrane expression of a functional red/green opsin in mammalian cells (Ferreira et al., 1996).

The dopamine receptor-interacting protein DRIP78 is another cochaperone of the Hsp-40 family (Chen et al., 2003). DRIP78 associates with the dopamine D₁ receptor (Bermak et al., 2001) to assist its export to the cell surface. DRIP78 binds to a FXXXXXXX motif in the C-tail of the receptor. Disruption of this interaction by a D₁ C-terminal peptide or by mutating D₁ at the phenylalanine residues of the motif reduces cell surface expression of the receptor and its accumulation in the ER. However, DRIP78 could have a dual role in D₁ trafficking, since its overexpression also induces the retention of the receptor in the ER. The binding sequence is present in other GPCRs. Indeed, DRIP78 overexpression resulted in similar ER retention for the acetylcholine muscarinic M₂ receptor but facilitates expression of AT₁ at the cell surface (Leclerc et al., 2002). Additional investigations are needed to understand the mechanisms involved. Interestingly, DRIP78 is also a chaperone for γ subunits of heterotrimeric G proteins (Dupre et al., 2009), protecting them from degradation until their association with the G β subunit.

Ribophorin I (RPNI) is a component of the oligosaccharyl transferase complex. It has been recently shown that its interaction with the μ opioid receptor (μ OR) is necessary for surface localization of this receptor (Ge et al., 2009).

ERp57 is a disulfide isomerase chaperone. In complex with calnexin, ERp57 interacts with human gonadotropin-releasing hormone receptor GnRH, known to be stabilized by two disulfide bridges, limiting its surface expression (Ayala Yanez & Conn, 2010).

These few examples show that in addition to acting as sensors of protein integrity, chaperones can also have a role in regulating the cell surface expression of GPCRs.

B. Accessory Proteins

Some motifs in the GPCR sequence allow the recruitment of specific GIPs. The *RXR* sequence present in several GPCRs promotes their interaction with the COPI complex responsible for ER retention/retrograde transport. Such a *RSRR* motif was first identified in the C-tail of the γ -amino butyric acid receptor B1 ($\text{GABA}_{\text{B}1}$) and shown to provoke its localization in the ER. Heteromerization with $\text{GABA}_{\text{B}2}$ masks this motif and allows surface expression of the functional GABA_{B} receptor (Jones et al., 1998). A similar *RARR* sequence is found in the second intracellular (i2) loop of the melanocortin MC_1 receptor, whose mutations are associated with increased skin cancer risk. Interestingly, threonine phosphorylation in a PKC target sequence, few residues upstream of this *RARR* motif, allows the MC_1 receptor to be released from the ER (Sanchez-Laorden et al., 2009). Protein phosphorylation has possibly a more general function in assisting the export of GPCRs from the ER: for the HIV coreceptor GPR15, containing a *RRRKR* sequence in its C-tail, phosphorylation of a downstream serine residue alleviates its interaction with the COPI complex; phosphorylation-dependent association with a 14-3-3 protein promotes anterograde transport to the Golgi, favoring subsequent cell surface expression (Chung et al., 2009).

A hydrophobic sequence present in the N-terminus of the α_{2c} -adrenoceptor has recently been associated with ER retention of the receptor (Angelotti et al., 2010). Since no retention is seen in native cells, it is suspected that these cells express helper proteins absent in other cells.

The receptor-activity modifying proteins (RAMPs) are single transmembrane-spanning proteins necessary for the trafficking and signaling of the calcitonin receptor-like receptor (CLR). The interaction of CLR with RAMPs allows surface targeting of the heteromeric complex, otherwise retained in the ER. Further, association of CLR with specific RAMPs directs the specificity of CLR for different peptide ligands of the calcitonin family. For instance, association with RAMP1 confers specificity for the calcitonine gene-related peptide while association with RAMP2 confers specificity for adrenomedullin

(McLatchie *et al.*, 1998). In addition to allow the trafficking of CLR, RAMP1 and RAMP3 associate with the calcium sensing CaS receptor, facilitating its surface expression (Bouschet *et al.*, 2005). RAMPs interact with other GPCRs without affecting receptor surface expression but rather modulating ligand specificity or receptor internalization (reviewed in Wootten *et al.*, 2010).

Receptor transport proteins RTP1 and RTP2 and the receptor expression-enhancing protein REEP1 have been identified as necessary accessory proteins for functional cell surface expression of mammalian olfactory receptors (Saito *et al.*, 2004). Similarly, RTP3 and RTP4 requirement was reported for different T2R bitter receptors (Behrens *et al.*, 2006). Recent work on sweet receptor T1R2/T1R3 heteromers determined that REEP2 does not promote surface expression but rather can associate with both subunits and specifically target the complex to lipid rafts (Ilegems *et al.*, 2010). In addition, RTP4 is a regulator of cell surface expression of μ - δ OR heteromers: heteromerization in the ER leads to a high degradation rate of the complex, while in the presence of RTP4, which interacts with both receptors, the μ - δ or heteromer/RTP4 complex is efficiently targeted to the plasma membrane (Decailot *et al.*, 2008).

The receptor for activated C-kinase RACK1, by interacting with the C-tail and the i1 loop of the thromboxane A2 receptor, allows its trafficking to the cell surface. A similar positive effect of RACK1 was observed for other receptors such as AT₁ and chemokine CXCR4 receptors (Parent *et al.*, 2008).

The melanocortin receptor accessory proteins (MRAPs) are single transmembrane proteins associated in the ER as antiparallel dimers with the ACTH receptor MC₂. This interaction results in a stable complex targeted to the surface. In humans, MC₂-inactivating mutations are responsible for familial glucocorticoid deficiency (FGD; Clark *et al.*, 2005). In the absence of MRAP, wild-type MC₂ remains in the ER. FGD has also been associated with mutations in MRAP (Metherell *et al.*, 2005).

Homer is a family of proteins binding the C-tail of the metabotropic glutamate receptors mGlu₁ and mGlu₅ and participating in signal complex formation at postsynaptic densities (Sheng & Hoogenraad, 2007). In neurons, Homer1b has been shown to cause intracellular retention of mGlu₅, while Homer1a reversed this effect (Ango *et al.*, 2002). Thus, in these cells, the ratio between the two proteins is a key regulator for surface expression of the receptor and the associated cellular response.

The single transmembrane proteins p23 and p24A are COPI-binding proteins important in the regulation of Golgi-associated vesicles. p24A was found to interact with the second extracellular (e2) loop of the protease-activated receptor PAR2 and to retain it at the Golgi level in unstimulated cells (Luo *et al.*, 2007). Upon activation of cell surface PAR2, the PAR2/p24A complex dissociates allowing the renewal of receptors at the plasma membrane. Thus, p24A acts as a regulator of signal-dependent trafficking. The μ OR and the purine receptor P2Y₄ also exhibit intracellular retention by the e2 loop-driven interaction with p24A and p23 (Luo *et al.*,

2011). Immature glycosylated forms of CaS also interact with p24A through its C-tail (Stepanchick & Breitwieser, 2010). This interaction increases the residence time of the receptor in Golgi compartments, allowing full maturation to proceed, therefore enhancing plasma membrane targeting.

C. Cytoskeleton-Associated Proteins

Transport of vesicles from the Golgi to their target location is driven by their interaction with microtubules and actin cytoskeleton. While the motor proteins dynein and kinesin act at the microtubule level, myosin plays a role along actin tracks. A number of proteins modulate intracellular trafficking of GPCR-containing vesicles by acting as adapters between specific receptors and cytoskeleton-associated proteins.

GEC1 is a microtubule-associated protein, first identified as a linker between the ligand-gated chloride GABA_A channel and microtubules (Wang et al., 1999b). GEC1 also interacts with the C-tail of the κ OR and facilitates the cell surface expression of the mature receptor (Chen et al., 2006).

Interaction between the C-tail of rhodopsin and the dynein light chain Tctex-1 (t-complex testis expressed 1) is important in rhodopsin trafficking (Tai et al., 1999), targeting the receptor to apical localization (Yeh et al., 2006). The interaction between Tctex-1 and the parathyroid hormone (PTH) receptor PTH1 has also been reported (Sugai et al., 2003). Recently, Tctex-1 was identified as activator of G protein signaling (AGS) 2, which interacts directly with G $\beta\gamma$ dimers of heterotrimeric G proteins (Takesono et al., 1999). G $\beta\gamma$ regulates the dynein-independent function of Tctex-1 in neurite outgrowth in primary hippocampal neurons (Sachdev et al., 2007). This discovery raised questions about the dual role of Tctex-1 as a bridge to connect GPCRs to dynein and its role as G $\beta\gamma$ effector.

Polarized transport of D₁ is promoted by the interaction of its i3 loop with neurofilament-M (NF-M). This interaction reduces the axonal transport of D₁ by increasing its intracellular retention and, therefore, attenuating D₁-mediated cAMP accumulation (Kim et al., 2002).

The protein 4.1 family contributes to cell shape maintenance, by tethering actin and spectrin (Discher et al., 1993). Protein 4.1R interacts with transmembrane proteins and is responsible for their stable incorporation into the erythrocyte plasma membrane (Baines et al., 2009). GPCRs such as mGlu₁ (Lu et al., 2004) and PTH1 (Saito et al., 2005) associate with protein 4.1G, thereby increasing their cell surface expression. Protein 4.1N interacts with the i3 loops of dopamine D₂ and D₃ receptors and facilitates their transport to the cell surface (Binda et al., 2002). On the opposite, binding of protein 4.1G to the i3 loop of adenosine A₁ receptor reduces its cell surface expression (Lu et al., 2004).

Filamin A, an actin-binding protein (ABP), has been shown to interact with several GPCRs and to regulate their trafficking. It binds to the i3 loop of

D₂ and D₃ (Li *et al.*, 2000, 2002). Expression of D₂ in filamin A-deficient M2 melanoma cells results in intracellular localization of the receptor (Lin *et al.*, 2001) suggesting that filamin A plays a role in membrane targeting of dopamine receptor subtypes. Other GPCR interactions with filamin A have been described. Binding of filamin A to the C-tail of mGlu₇ could participate in its synaptic localization (Enz, 2002). Similarly, binding of filamin A to the C-tail of the CaS receptor and caveolin 1 possibly contributes to the localization of this receptor in caveolae (Hjalm *et al.*, 2001).

The intraflagellar transport (IFT) in the primary cilia is a conserved mechanism required to assemble cilia and IFT-A and -B complex trafficking within cilia by interacting with dynein and kinesin. Recently, Tubby-like protein 3 (TULP3) has been identified to interact with IFT-A, which mediates its entry in the cilia. By “loss-of-function” experiments, TULP3 was shown to promote cilia localization of a subset of GPCRs such as somatostatin receptor sst₃ and melanin-concentrating hormone receptor MCH₁. Whether TULP3 interacts directly or indirectly with these receptors remains to be demonstrated (Mukhopadhyay *et al.*, 2010).

D. Conclusion

Trafficking of GPCRs during biosynthesis has is far less studied than their endocytic trafficking, and much work is needed to better understand their targeting to specific compartments. In many cases, specific interaction partners have been identified by observing the deficient routing of heterologously expressed receptors and the enhancement observed by coexpressed partners (Dunham & Hall, 2009). A number of GPCR mutations responsible for receptor trapping in the ER and rerouting toward the degradation compartment are linked to diseases such as retinitis pigmentosa for rhodopsin (Krebs *et al.*, 2010) or nephrogenic diabetes insipidus for the vasopressin V₂ receptor (Tao, 2006). GPCR heteromerization during biosynthesis can allow ER-trapped receptors to reach the plasma membrane, but in many cases, these receptors exhibit a dominant-negative effect on export of associated GPCR. Pharmacologically modulating the expression of GPCR-associated proteins or targeting the interacting interface will possibly constitute in the future a mean to redirect deficiently addressed GPCRs.

III. Modulation of GPCR Signaling

GIPs may organize GPCR signaling complexes, modulate G protein signaling, or may be signaling proteins by themselves. The two main binding sites for GIPs on GPCRs are the C-tail and the i3 loop. This part of the review will not give an exhaustive list of GIPs but rather focus on some illustrative examples highlighting the importance of GIPs in GPCR signaling (Fig. 2). For

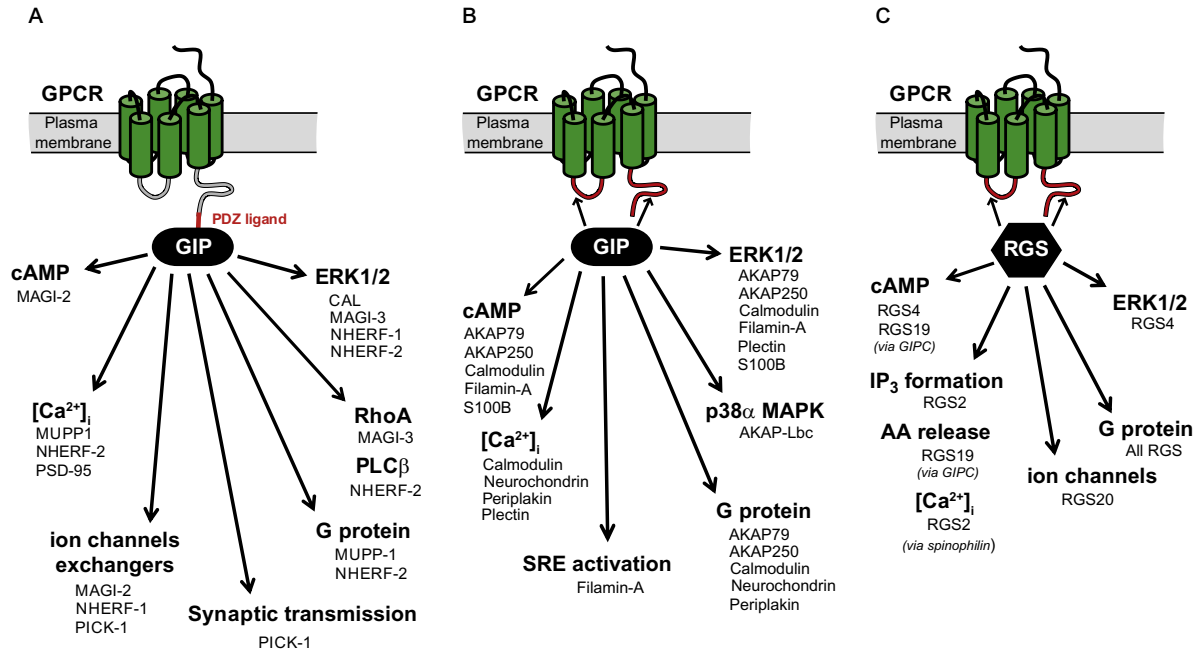


FIGURE 2 Modulation of GPCR signaling by GPCR-interacting proteins (GIPs). GPCR signaling can be modulated by GIPs interacting through the PDZ ligand (A) or through the C-tail and i3 loop of the receptor (B). (C) Focus on RGS proteins that modulate GPCR signaling through direct interaction with the C-tail and/or i3 loop of the receptor (AKAP, cyclic AMP-dependent kinase-anchoring protein; CAL, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-associated ligand; GIPC, GAIP-interacting protein, C-terminus; MAGI, membrane-associated guanylate kinase inverted; MUPP1, multiple PDZ domain protein; NHERF, Na⁺-H⁺ exchange regulatory factor; PICK1, protein interacting with C kinase 1; PSD-95, postsynaptic density protein 95; RGS, regulator of G protein signaling).

additional information, the reader is referred to two expert reviews in the field (Bockeaert *et al.*, 2004; Ritter & Hall, 2009).

A. Modulation of GPCR Signaling by GIPs Interacting Through PDZ Ligands

At their C-terminal extremity, many GPCRs possess a PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) ligand typically composed of three to four amino acid residues that bind to PDZ domains. PDZ domains belong to a family of widespread protein modules that function as “adapters” of multimeric complexes. Several PDZ domain-containing proteins bind and modulate GPCR signaling. The sodium–hydrogen exchanger regulatory factors, NHERF-1 (also known as EBP50) and NHERF-2, represent a family of adaptor proteins characterized by two tandem PDZ domains and a C-terminal domain that binds the ezrin–radixin–moesin family of actin-binding proteins. NHERF-1 and NHERF-2 have been shown to interact with several GPCRs (reviewed in Weinman *et al.*, 2006). A first example was provided by the β_2 AR (Hall *et al.*, 1998). NHERF-1 interaction with β_2 ARs was shown to prevent β_2 AR-mediated inhibition of the activity of the Na^+/H^+ exchanger type 3. Interaction of NHERF-1 with the κ OR also significantly enhances Na^+/H^+ exchange mediated by a κ OR agonist. Another GPCR that binds to NHERFs is the lysophosphatidic acid (LPA) receptor LPA_2 . Interaction with NHERF-2 indirectly links LPA_2 to phospholipase $\text{C}\beta_3$ and potentiates LPA-induced PLC β and ERK activation (Oh *et al.*, 2004). More recently, MAGI-3, another PDZ domain-containing protein, has been shown to compete with NHERF-2 for binding to LPA_2 and to negatively regulate LPA_2 signaling in colon cancer cells (Lee *et al.*, 2010). NHERF-2 also prolongs GPCR-mediated calcium (Ca^{2+}) signaling such as for the purinergic P2Y_1 receptor (Fam *et al.*, 2005) and mGlu_5 (Paquet *et al.*, 2006). More recently, NHERF proteins have been shown to control PTH1 signaling by facilitating differential activation of $\text{G}\alpha$ protein subunits (Wang *et al.*, 2010). Indeed, NHERF-1 increases PTH-stimulated PTH1 coupling to $\text{G}\alpha_q$, whereas NHERF-2 decreases PTH-induced $\text{G}\alpha_s$ and increases $\text{G}\alpha_q$ and $\text{G}\alpha_i$ activation, demonstrating that NHERF protein interaction with PTH1 can directly influence receptor coupling to G proteins (Wang *et al.*, 2009). NHERF-1 also associates with CCR5 homodimers but not with CXCR4 homodimers or CXCR4–CCR5 heterodimers, arguing in favor of privileged binding of NHERF-1 to specific oligomeric forms of some GPCRs (Hammad *et al.*, 2010). Although the PDZ2 domain of NHERF-1 seems to be important for the interaction with CCR5, no evidence for direct interaction was reported in resulting in the potentiation of RANTES-induced ERK phosphorylation (Hammad *et al.*, 2010).

MUPP1 is a multi-PDZ domain protein composed of 13 PDZ domains. The first GPCR reported to interact with MUPP1 via its PDZ10 domain was

the serotonin 5-HT_{2C} receptor (Becamel et al., 2001; Ullmer et al., 1998). The functional consequences of this interaction remain poorly known, and an effect on 5-HT_{2C} clustering has been suspected (Parker et al., 2003). The PDZ10 domain of MUPP1 also interacts with the melatonin MT₁ receptor (Guillaume et al., 2008). In this case, MUPP1 promotes coupling of the receptor to the G_i/adenylate cyclase pathway. MUPP1 also interacts with GABA_B via its PDZ13 domain (Balasubramanian et al., 2007; Dooley et al., 2009). These interactions enhance GPCR signaling by modulating the duration of Ca²⁺ responses (Balasubramanian et al., 2007). Recently, an interaction of MUPP1 via its PDZ1 and PDZ2 domains with the olfactory OR2AG1 receptor has been reported (Dooley et al., 2009). As for GABA_B receptors, MUPP1 controls the duration of Ca²⁺ signaling mediated by OR2AG1 receptors.

PSD-95, another multiple PDZ domain-containing protein, has been identified as a specific binding partner of the β₁AR. Although coexpression of PSD-95 had no effect on either receptor desensitization or β₁AR-induced cAMP accumulation, agonist-induced internalization of β₁AR was markedly attenuated in the presence of PSD-95. In addition, PSD-95 facilitates the physical association of β₁AR with synaptic proteins, such as the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Hu et al., 2000). PSD-95 and another membrane-associated guanylate kinase, MAGUK p55 subfamily member 3 (MPP3), have been reported to oppositely regulate desensitization of receptor responses in both transfected cells and mice cortical neurons. PSD-95 increases desensitization of the 5-HT_{2C}-mediated Ca²⁺ response, whereas MPP3 prevents this desensitization. In addition, these effects were correlated with a differential regulation of cell surface expression of the receptor (Gavarini et al., 2006). PSD-95 also associates with dopamine D₁, D₂, and D₅ receptors (Sun et al., 2009; Zhang et al., 2007b).

Other regulators of GPCR signaling possessing PDZ domains are the members of the membrane-associated guanylate kinase inverted (MAGI) family. MAGIs are multidomain scaffolding proteins that contain PDZ and WW domains, and a guanylate kinase-like domain. MAGI-2 has been shown to promote association of β₁AR with β-catenin, a known MAGI-2-binding partner, but despite the fact that agonist-induced internalization of the β₁AR is markedly increased in the presence of MAGI-2, no major impact on β₁AR signaling has been observed (Xu et al., 2001). MAGI-2 also associates with the vasoactive intestinal polypeptide (VIP) type-1 receptor (VPAC1) and overexpression of MAGI-2 has been shown to inhibit VPAC1-mediated cAMP production and agonist-induced VPAC1 internalization in different cell lines. In addition, MAGI-2 decreases VPAC1-mediated current through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Xenopus* oocytes (Gee et al., 2009). MAGI-3 interacts with β₁- and β₂AR and modulates ERK1/2 activation (He et al., 2006; Yang et al., 2010). Other GPCRs that interact with MAGI-3 are the LPA receptors. MAGI-3 has been reported to

specifically interact with LPA₂ but not LPA₁ and LPA₃ and silencing or overexpressing MAGI-3 drastically inhibits LPA-induced ERK1/2 activation or stimulates LPA-induced RhoA activation, respectively (Zhang *et al.*, 2007a). As mentioned before, MAGI-3 also competes with NHERF-2 for binding to this receptor to negatively regulate LPA₂ receptor signaling (Lee *et al.*, 2011).

The protein interacting with C kinase 1 (also known as PICK1) is another example of PDZ domain-containing protein that modulates GPCR signaling. This GIP interacts mainly with mGlu receptors that are highly enriched in the presynaptic terminals of glutamatergic synapses where they mediate feedback inhibition of neurotransmitter release. The mGlu_{7a} appears to be the predominant PICK1-binding partner, although other mGluRs have been reported to interact with PICK1 (Boudin *et al.*, 2000; Dev *et al.*, 2000; El Far *et al.*, 2000). In cerebellar granule cell cultures, interaction between PICK1 and mGlu_{7a} is required for specific inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels, of synaptic transmission following activation of presynaptic mGluR_{7a} (Perroy *et al.*, 2002) and of glutamate release (Zhang *et al.*, 2008).

B. Modulation of GPCR Signaling by GIPs Interacting with Other Motifs of the C-Tail and with the i3 Loop

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and β -arrestins are major GIPs. In addition to their well-established role in receptor internalization and desensitization (see Section IV), both are also involved in cell signaling by acting as scaffolds for a variety of intracellular signaling proteins (Fig. 3). Indeed, several studies have shown that β -arrestins can interact with c-Src, JNK-3, components of the Raf/MEK/ERK cascade, cAMP phosphodiesterase PDE4, Ral-GDS regulator of the cytoskeleton, components of the Nf- κ B signaling pathway and Mdm2 ubiquitin ligase. GRKs specifically interact with G α_q and with a plethora of other signaling proteins such as PI3K, α -actinin, calmodulin (CaM), clathrin, GIT, caveolin, MEK, AKT, RKIP, RalA GTPase, and the APC protein. For more details on the role of these two scaffold GIPs in GPCR signaling, the reader is referred to recent expert reviews (Defea, 2008; Penela *et al.*, 2010; Premont & Gainetdinov, 2007; Reiter & Lefkowitz, 2006).

Cyclic AMP-dependent kinase-anchoring proteins (AKAPs) belong to another class of scaffold. AKAP250 (also known as Gravin) interacts with the C-tail of the β_2 AR (Fan *et al.*, 2001b; Shih *et al.*, 1999). The interaction between AKAP250 and β_2 AR is dynamic and displays a three-fold increase in response to activation of the receptor and is reversible following agonist-induced desensitization and/or loss of agonist stimulation (Tao *et al.*, 2003). PKA phosphorylation of both the AKAP and the receptor C-tail has been shown to be essential for this increased association in response to agonist activation (Tao *et al.*, 2003). Another AKAP, AKAP79, also interacts with

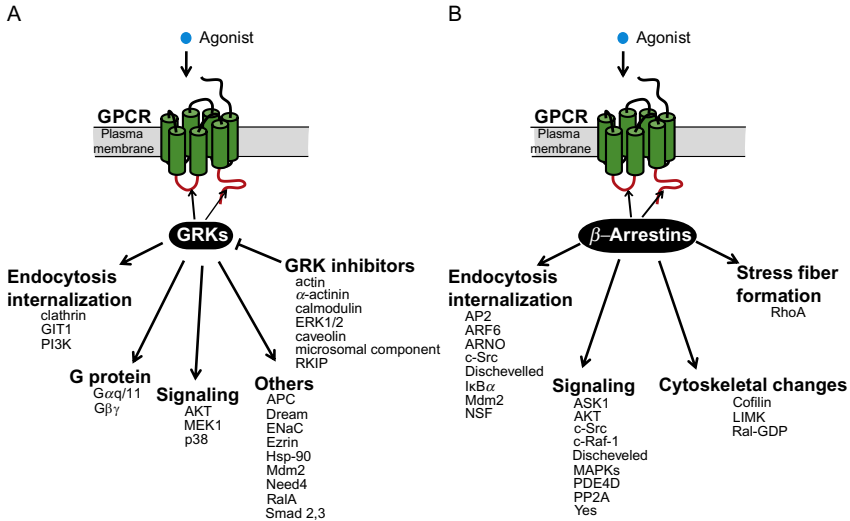


FIGURE 3 The GRK and β -arrestin interactomes. In addition to their “classical” role in promoting GPCR phosphorylation, internalization and desensitization, GRKs (A) and β -arrestins (B) display a complex network of functional interactions with proteins involved in signal transduction (APC, adenomatous polyposis coli; ENaC, epithelial sodium channel; GIT1, G protein-coupled receptor kinase-interacting ArfGAP 1; Hsp-90, heat-shock protein 90; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; RKIP, RAF kinase inhibitory protein).

the C-tail and i3 loop of the β_2 AR but, in contrast to AKAP250, this interaction appears to be constitutive (Fraser et al., 2000; Lynch et al., 2005). AKAP79 and AKAP250 play a prominent role in the switch of downstream signaling by the β_2 AR from the activation of the G_s /adenylate cyclase pathway to the activation of G_i protein-dependent MAPK cascade downstream to the level of ERK1/2 (Baillie & Houslay, 2005; Lefkowitz & Shenoy, 2005). In contrast, phosphorylation of the β_2 AR by GRK2 creates a docking site for β -arrestin. The β -arrestin, in turn, recruits PDE4D5 that acts to compartmentalize the cyclic AMP generated in the vicinity of the AKAP79-tethered PKA catalyzing the phosphorylation of the receptor (Baillie & Houslay, 2005; Baillie et al., 2003; Bolger et al., 2006). AKAP250 functions like AKAP79, maintaining PKA in close proximity to the receptor and inhibition of PKA binding to AKAP250 precludes agonist-stimulated phosphorylation of either the receptor or AKAP, preventing the resensitization/recycling process (Tao et al., 2003). Very recently, AKAP-Lbc, another AKAP with an intrinsic Rho-specific guanine nucleotide exchange factor activity, has been reported to play a critical role in the activation of the p38 α MAPK upon agonist stimulation of α_{1b} AR without affecting receptor-mediated activation of other MAPK pathways (Cariolato et al., 2011).

The cytosolic Ca^{2+} -binding protein calmodulin (CaM) interacts with a wide range of GPCRs. Interaction between CaM and mGlu has been well

characterized. Binding of CaM to mGlu_{7a} is Ca²⁺-dependent and inhibits PKC phosphorylation of a serine residue within the CaM-binding site of the receptor (Airas et al., 2001). This CaM-binding site competes with the binding site for Gβγ as both are binding to overlapping site of the receptor C-tail (O'Connor et al., 1999 Science). CaM modulates GPCR signaling at the level of G protein coupling/activation and further downstream. In the case of D₂, 5-HT_{2A}, and opioid receptors, CaM has been shown to block G protein coupling or to inhibit the guanine nucleotide exchange reaction promoted by receptor activation, thereby modulating directly G protein activation (Bofill-Cardona et al., 2000; Turner & Raymond, 2005; Wang et al., 1999a). Moreover, blocking of CaM binding to P2Y₁ inhibits agonist-promoted intracellular Ca²⁺ release and P2Y₁-dependent platelet aggregation (Arthur et al., 2006). Binding of CaM to D₂ receptors modulates agonist-induced ERK1/2 activation and cAMP accumulation (Liu et al., 2007). In addition, mutation of the binding site for CaM on 5-HT_{2C} inhibits both β-arrestin recruitment and receptor-induced ERK1/2 activation (Labasque et al., 2008). Interestingly, arrestins have also been reported to sequester CaM. This interaction may regulate the availability of arrestin and CaM for their intracellular partners in a Ca²⁺-dependent manner (Wu et al., 2006).

S100B is another Ca²⁺-binding protein recently identified as GIP. S100 proteins are implicated in the regulation of protein phosphorylation, Ca²⁺ homeostasis, enzyme activity, gene transcription, cell growth and differentiation, and the inflammatory response. Interaction of S100B with the i3 loop of the D₂ receptor increases ERK1/2 activation and adenylate cyclase inhibition (Liu et al., 2008).

Another class of GIPs that modulates GPCR signaling is the ABP family. In addition to their role as linker of the actin cytoskeleton, some ABPs have been reported to directly interact with GPCRs and to modulate their subcellular localization (see Section II.C) and their signaling. For instance, lack of filamin A binding to the i3 loop of D₂ and D₃ dampens the inhibitory effect of these receptors on forskolin-stimulated cAMP production (Li et al., 2000, 2002). In addition, D₃ receptors form a complex with filamin A and β-arrestin2 that is destabilized by increased GRK2/3 activity (Kim et al., 2005). Filamin A binding to the C-tail of CaS was shown to be absolutely required for ERK1/2 phosphorylation (Awata et al., 2001; Hjalm et al., 2001). Filamin A also promotes activation of serum response element by CaS receptors by assembling Gα_q, RhoGEFs, and Rho signaling complexes (Pi et al., 2002) and by preventing receptor degradation (Zhang & Breitwieser, 2005). More recently, filamin A has been shown to interact with the C-tail of P2Y₂ to selectively regulate spreading and migration of vascular smooth muscle cells (Yu et al., 2008).

Periplakin is another ABP that interacts with the C-tail of GPCRs. Indeed, binding of periplakin to MCH₁ and μOR reduces agonist-induced [³⁵S]GTPγS incorporation and increases intracellular Ca²⁺ (Feng et al., 2003; Murdoch et al., 2005). These functional effects are antagonized by the neurite-outgrowth

related factor, neurochondrin, which competes with periplakin for binding to MCH₁ (Francke et al., 2006). Both periplakin and neurochondrin have recently been shown to interact with further GPCRs (Ward et al., 2009).

Plectin, a member of the spectrin superfamily of ABPs, interacts with the C-tail of CXCR4. Silencing of plectin attenuates CXCR4-mediated Ca²⁺ mobilization, ERK1/2 activation, chemotaxis and HIV-1 infection (Ding et al., 2008).

Finally, a recent GIP that generated some interest is the cannabinoid receptor-interacting protein (CRIP) 1a. This protein together with its alternative splice variant CRIP1b was identified as a GIP interacting with the last 9 amino acids of the CB₁ but not CB₂ receptor. Interestingly, CRIP1a was shown to specifically inhibit the constitutive activity of CB₁, as measured by tonic inhibition of N-type Ca²⁺ channels at basal state in rat superior cervical ganglion neurons (Niehaus et al., 2007).

C. Modulation of GPCR Signaling by GIPs of the RGS Family

GPCR signaling can also be regulated by RGS proteins, a family of diverse and multifunctional proteins that attenuate and/or modulate GPCR-mediated signaling in part by binding to active G α subunits and by acting as GTPase-activating proteins (GAPs). RGS protein family members share a conserved 120 amino acid “RGS box” containing the binding site for G α and responsible for the GAP activity. Their N- and C-terminal domains flanking the RGS box can contain structural domains and binding motifs for a variety of signaling proteins. Recent studies have revealed that in addition to modulate G protein activity, RGS are GIPs that can also directly interact with GPCR and modulate their signaling.

RGS2 has been reported to associate with the i3 loop of the muscarinic M₁ and M₅ receptors and weakly to the M₃ receptor (Bernstein et al., 2004). Coexpression of RGS2 with M₁ receptors potently inhibits M₁-mediated inositol phosphate (IP) formation (Bernstein et al., 2004). Similar effects of RGS2 on IP formation of other GPCRs such as the α_{1A} AR and the cholecystokinin-2 (CCK₂) receptor were observed (Hague et al., 2005; Langer et al., 2009).

RGS4 directly interacts with the C-tail of μ OR and the C-tail and i3 loop of δ OR to attenuate agonist-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase (Georgoussi et al., 2006) and ERK1/2 phosphorylation for both receptors and to accelerate agonist-induced internalization of the δ OR (Leontiadis et al., 2009).

More recently, an interaction of RGS20 (also known as RGSZ1) with the C-tail and the i3 loop of the melatonin MT₁ receptor was reported (Maurice et al., 2010). Interaction of RGS20 with MT₁ increases the incorporation of [³⁵S]GTP γ S, accelerates the turning on of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK or Kir3) channels and prevents rapid deactivation of the channels upon agonist stimulation of MT₁ (Maurice et al., 2008, 2010). Similar observations were made for heteromeric complexes composed of MT₁ and

MT₂, the second melatonin receptor, with MT₁ binding to RGS20 and MT₂ binding to G_i proteins. This example suggests that in heteromers, a receptor could become sensitive to the action of a GIP specifically associated with its receptor partner, thus providing additional options in fine-tuning GPCR function in a context-dependent manner.

Interestingly, RGS proteins can also modulate GPCR signaling by indirect coupling through scaffold proteins. The two prominent examples are the PDZ domain-containing proteins: GAIIP-interacting protein, C-terminus (GIPC) and spinophilin. GIPC has been shown to recruit GAIIP (RGS19) to D₂ receptors and to be required for GAIIP modulation of D₂ receptor signaling (Jeanneteau *et al.*, 2004). Indeed, GAIIP attenuates agonist-induced arachidonic acid release and inhibition of cAMP accumulation triggered by forskolin in a GIPC-dependent manner. As GIPC interacts with other GPCRs, this scaffold mechanism may be of general relevance.

Spinophilin binds to the i3 loop of several GPCRs such as M₂ and M₃ (Kurogi *et al.*, 2009), α_{2A} , α_{2B} , and α_{2C} AR (Brady *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005) and D₂ receptors (Smith *et al.*, 1999). Spinophilin acts as a scaffold that binds both α ARs and the N-terminal domain of RGS2 to regulate α AR-dependent Ca²⁺ signaling (Brady *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Therefore, spinophilin plays a role in determining signaling specificity by improving access of RGS proteins to GPCRs and facilitating the interaction of the RGS with the GPCR-associated G α protein. It is conceivable that the mode and strength of binding to spinophilin is specific to particular GPCRs and/or RGS proteins. In addition, spinophilin antagonizes β -arrestin functions by inhibiting the association of GRK2 with GPCR-G $\beta\gamma$ complexes (Wang & Limbird, 2002; Wang *et al.*, 2004).

IV. Endocytosis and Recycling of GPCRs

Activation of GPCRs not only induces signaling but also triggers receptor endocytosis within seconds to few minutes. The functional outcome of endocytosis depends on the further fate of the receptor. The receptor can be directed toward late endosomes and then be degraded in the lysosomal compartment, thus desensitizing the functional response, or the receptor can be sorted toward recycling endosomes and redirected back to the plasma membrane, thus resensitizing the functional response (von Zastrow, 2003). In addition, recent evidence suggest that sustained activation of some signaling pathways is strongly dependent on successful receptor endocytosis (Calebiro *et al.*, 2010).

A. G Protein-Coupled Receptor Kinases

GRKs are cytosolic kinases that phosphorylate serine/threonine residues located in intracellular loops or in the C-tail of GPCRs, an important step to

initiate receptor endocytosis and formation of clathrin-coated pits and/or to determine the fate of the receptor inside the cell (Reiter & Lefkowitz, 2006). GRK is rapidly recruited to the ligand-occupied receptor by a still unknown mechanism that is, however, independent of G protein activation. The role of GRK-mediated phosphorylation in intracellular GPCR trafficking is suggested by studies showing that phosphorylation of serine residues within the C-tail of CXCR4 is needed for ubiquitination-dependent receptor degradation (Marchese & Benovic, 2001). Further, recycling of the D₂ receptor depends on the phosphorylation by GRK (Namkung et al., 2009). The effect of GRKs on GPCR function is not only dependent on their kinase activity but may also be due to competition with G proteins (Raveh et al., 2010). GRKs can also be considered as scaffolding proteins as they interact with various other proteins involved in receptor endocytosis and signaling such as clathrin, PI3K, GIT, caveolin, AKT, MEK-ERK, tubulin, etc. (Fig. 3; Penela et al., 2010).

B. β -Arrestins

GRK phosphorylation of GPCRs facilitates the recruitment of β -arrestins to the receptor. β -Arrestins are involved in GPCR desensitization (by competing with G protein binding to receptors), GPCR endocytosis, and G protein-independent signaling (Shenoy & Lefkowitz, 2003). Accordingly, β -arrestins have been shown to interact with multiple proteins (clathrin, adaptor protein AP2 and AP3, 14-3-3 protein, ras-GAP, ERK2, etc) highlighting the central scaffolding function of these proteins (Fig. 3; Xiao et al., 2007).

In respect to the endocytotic function of β -arrestins, GPCRs can be divided into type A and B depending on their β -arrestin-binding profile. Type A GPCRs have a higher affinity for β -arrestin2 than β -arrestin1, and the interaction is transient and occurs near the cell surface. Type A receptors are in general dephosphorylated at the level of early endosomes, and rapidly recycled in a ligand-free form. Typical members are α_{1b} AR, β_2 AR, μ OR, endothelin ET_A, and D₁ receptors. Type B GPCRs stably bind both β -arrestin1 and β -arrestin2 with the same affinity leading to prolonged half-life of the complex and preferential trafficking to late endosomes and lysosomal compartments. Typical members are neurotensin 1, AT₁, vasopressin V₂, and tyrotropin-releasing hormone receptors.

C. Other Proteins Involved in GPCR Internalization and Recycling

Src is a tyrosine kinase protein that interferes at multiple levels of GPCR function. In some cases, Src most likely phosphorylates GPCRs directly at Tyr³⁵⁰ in the C-tail of the β_2 AR promoting receptor desensitization (Valiquette et al., 1990). Src may also phosphorylate other signaling proteins

such as GRK2 (Fan et al., 2001a). Moreover, β_2 AR activation promotes dynamin phosphorylation by Src which is essential for β_2 AR internalization (Ahn et al., 1999). Further, Src can phosphorylate β_2 adaptin when recruited by β -arrestin into an AT_1/β -arrestin/ β_2 adaptin complex leading to subsequent dissociation of the arrestin/AP2 complex during receptor internalization (Zimmerman et al., 2009).

AP2 mediates receptor endocytosis and is essential for clathrin assembly into coats. This protein recruits ready-to-internalize receptors or “cargo” into preformed coated pits and reinforces receptor/arrestin/clathrin colocalization (Scott et al., 2002). AP2 directly interacts with clathrin, β -arrestin, PIP3K, and PIP2 (for more details, see Schmid & McMahon, 2007). AP2 recognizes different internalization motifs present in the C-tail of most GPCRs: (i) the classical dileucine-based *DXXLL* motif found in the β_2 AR, CXCR4 and CXCR2 receptors; (ii) the tyrosine-based *Yxx Φ* motif; (iii) a stretch of eight Arg within the C-tail of the α_{1b} AR; (iv) the acidic dileucine-based motif (*(D/E)XXXL(L/I)*).

Rab GTPases are small Ras-like GTPases over 60 members, implicated in membrane trafficking of endocytosed proteins including GPCRs. The best-characterized GTPases are Rab5 that mediates receptor internalization, and Rab4, Rab11, and Rab7 that are involved in rapid and slow recycling, and lysosomal sorting, respectively (reviewed in Seachrist & Ferguson, 2003). Rab-binding domains are beginning to be defined. Recent evidence show that Rab4, Rab5 and Rab11 bind to helix 8 of the C-tail of internalized AT_1 (Esseltine et al., 2011). Similar results were obtained for the prostacyclin receptor (Reid et al., 2010).

PDZ domain-containing proteins of the NHERF family not only regulate GPCR signaling (see Section III.B) but are also involved in GPCR trafficking by binding to the C-terminal PDZ ligand of receptors. Several mechanisms have been proposed including the recently described role of NHERF-1 to facilitate β -arrestin recruitment to the activated PTH1 (Klenk et al., 2010). The endothelin receptor ET_A contains an internal β -finger PDZ motif recognized by PSD-95 that mediates receptor recycling (Paasche et al., 2005), and it has been shown that PSD-95 enhances signaling of 5-HT $_{2A}$ by slowing down its internalization (Xia et al., 2003). Although the *N*-ethyl maleimide-sensitive factor (NSF) does not contain a PDZ domain, it binds, like PDZ domain proteins, to the last 3 amino acids of β_2 AR thus competing for binding of NHERF to this receptor. NSF plays a major role in receptor internalization and recycling as exemplified by the R412A mutant of the β_2 AR, which does not bind anymore to NSF (Gage et al., 2005).

Postendocytic sorting of mammalian GPCRs is not well understood compared to other membrane receptors. Studies in yeast indicate that Vps27 (Hrs in mammals) is an important sorting protein that directs ubiquitinated proteins such as the Ste3 GPCR to the conserved Vps23/ESCORT machinery and subsequent degradation (Bilodeau et al., 2002). Among the large family of GPCR-associated sorting proteins (GASPs), at least GASP-1

appears to be involved in the late endosomal sorting of GPCRs. GASP-1 is a cytosolic protein that binds to the membrane-proximal helix 8 within the C-tail of GPCRs (reviewed in [Abu-Helo & Simonin, 2010](#)). GASP-1 associates with numerous GPCRs, targeting these receptors for lysosomal degradation ([Martini et al., 2010](#); [Thompson & Whistler, 2011](#)). Additional roles of GASP-1 in receptor recycling have been described in mice under sustained cocaine administration, suggesting a more widespread role of GASP-1 in GPCR trafficking ([Boeuf et al., 2009](#)).

V. Conclusion

It became apparent over the past 10 years that GIPs are major players of GPCR function. Interaction of GPCRs with GIPs is a highly dynamic process. GPCRs travel through different subcellular compartments and interact with various GIPs at the different stages of their life cycle. This process is very well orchestrated in space and time. Binding of GIPs depends either on the presence of specific motifs in the primary sequence of the receptor, posttranslational modifications or specific receptor conformations. During receptor biosynthesis, unique structural traits of immature receptors are recognized and stabilized by several chaperon proteins of which some may also assist transport to the cell surface. Once arrived at the cell surface, fully matured GPCRs become accessible for ligand activation, which has profound consequences on their GIP network. Indeed, agonist-activated GPCRs undergo conformational changes within their seven-transmembrane-spanning domain, rearranging the connected cytoplasmic loops and receptor C-tail thus providing an intracellular surface for productive G protein coupling. Activated G proteins dissociate into $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ subunits, which both can signal through a variety of effectors and modulate different aspects of cellular physiology. Receptor activation is typically turned-off by GRKs that either directly compete for G protein binding to GPCRs or modify the receptor by phosphorylating serine/threonine residues within its C-tail. GPCR phosphorylation increases the affinity for β -arrestins, which upon recruitment to the receptor impairs G protein coupling. Binding of G proteins, GRKs, and β -arrestins to the receptor occurs through multiple contact points located in intracellular loops and the C-tail of the receptor. As the interacting surfaces of these three GIPs are largely overlapping, they are considered to bind sequentially to the receptor. However, recent evidence suggest that there might be, at least for a short period of time, simultaneous binding of G proteins and GRKs to the receptor ([Breton et al., 2010](#)). Moreover, GPCRs may bind to different types of G protein indicating that these G proteins have to bind either sequentially to the same receptor or to different receptor complexes. Although many GPCRs have been reported to couple to more than one type of G protein, only few studies have addressed this issue.

For example, sequential binding of G_s and G_i proteins has indeed been observed for the β_2AR (Daaka et al., 1997). In contrast, a recent work on PAR_1 suggests the existence of two distinct populations of receptors that differentially couple to $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_{i2}$. A first population of PAR_1 is preassembled with $G\alpha_{i1}$, and receptor activation induces both rapid and transient $G\alpha_{i1}$ activation. The second population is not precoupled to G proteins but slowly and stably recruits $G\alpha_{i2}$ to the complex (Ayoub et al., 2007). Apart from these “classical” GIPs, recent genetic and proteomic screens discovered a lot of further GIPs that may include cytosolic proteins and membrane proteins as diverse as GPCRs (Milligan, 2009), neurotransmitter transporters (Lee et al., 2007; Liu et al., 2000) or ion channels (Beedle et al., 2004; Davare et al., 2001). The interaction with neurotransmitter transporters and ion channels is of particular interest since these proteins are privileged pharmacological targets by themselves.

Many of these GIPs are binding constitutively to the receptor with two preferential hotspots within the receptor C-tail: the membrane proximal helix 8 and the PDZ ligand at the C-terminal extremity of many GPCRs. Indeed, proteins, as diverse as Rab proteins, RGS20 and GASP-1, are preferentially binding to helix 8, whereas members of the large family of PDZ domain-containing proteins and NSF recognize PDZ ligands. Although simultaneous binding of GIPs to these two motifs is feasible, sterical hindrance cannot be excluded and might depend on the size of the respective GIPs. GIPs binding to the same motif are expected to be competitive if they are expressed at the same time and are located in the same subcellular compartment. Obviously, the expression profile and the relative quantity of GIPs, GPCRs, and other GIPs that might titrate GIPs away from GPCRs are important parameters defining the protein network of a given GPCR. Little is known about these parameters but it can be anticipated that a satisfying answer will only be obtained in cells or tissues expressing all components at endogenous levels. In addition, this cellular context may change depending on different physiological or pathological situations.

Another important issue concerns the potential of targeting GPCR/GIP interactions as a novel approach for therapeutic intervention. Indeed, specific disruption of a GPCR/GIP interaction in a given tissue without affecting the interaction of this same GPCR with other GIPs in another tissues represents an attractive strategy for drug discovery and emerging evidence from the literature suggest that targeting GPCR/GIP interaction might be of clinical interest. The use of Tat-conjugated peptides has clearly illustrated the potential of peptides in disrupting a specific GPCR/GIP interactions. Indeed, the Tat protein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a cell-membrane transduction domain and Tat-conjugated peptides can cross the blood–brain barrier and plasma membrane, thus making them well suited for *in vivo* applications (Schwarze et al., 1999).

A first example in the GPCR field came from the study of Ji et al. (2006) showing that intravenous injection in rats of a Tat-conjugated peptide

encompassing the PTEN-binding motif located within the i3 loop of 5-HT_{2C} suppresses the firing rate of ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons induced by δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), thereby reproducing the effect of 5-HT_{2C} receptor agonists. As 5-HT_{2C} receptor agonists, this peptide also inhibits the rewarding effects of THC (and nicotine) mediated by VTA dopaminergic neurons. However, it does not reproduce the side effects (anxiogenic effects, penile erection, hypophagia, and motor functional suppression) observed following administration of 5-HT_{2C} agonists. This study, therefore, suggests that targeting the interaction between 5-HT_{2C} and PTEN might be an effective strategy for the treatment of addiction-related behaviors, with perhaps less pronounced side effects than occur with strategies that involve the use of 5-HT_{2C} agonists (Ji et al., 2006). In another case, disruption of the mGlu_{7a}/PICK1 interaction by intravenous injection of a Tat-conjugated peptide was able to trigger absence epilepsy-like seizures in mice and rats, providing evidence that a single PDZ protein/GPCR interaction can result in a specific neurological disorder (Bertaso et al., 2008). More recently, disruption of the interaction between 5-HT_{2A} and PDZ proteins in diabetic neuropathic rats by a Tat-conjugated peptide encompassing the nine C-terminal residues of the 5-HT_{2A} receptor that competes for interaction between 5-HT_{2A} and its target PDZ proteins (identified in the study as PSD-95, SAP97, MAGI-2, and MPP2) was shown to induce an antihyperalgesic effect and to strongly enhance antihyperalgesia induced by the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine. This study thus suggests that 5-HT_{2A} receptor/PDZ protein interactions might contribute to the resistance to SSRI-induced analgesia in painful diabetic neuropathy and that disruption of these interactions might be a valuable strategy to design novel treatments for neuropathic pain and to increase the effectiveness of SSRIs (Pichon et al., 2010).

In conclusion, GIPs and associated protein networks are a powerful mean to regulate GPCR function. Many GIPs have been identified during the past 15 years but we are only beginning to understand the complex interplay between all these different GIPs and its spatiotemporal dimension that clearly will help us to fully understand the function of GPCRs *in vivo*. Identification of therapeutic tools to disrupt the interaction between receptors and their GIPs will be a challenging task, which however holds great promise in term of specificity.

Acknowledgments

This work was supported by grants from SERVIER, the Fondation Recherche Médicale (Equipe FRM), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, n° 5051), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Abu-Helo, A., & Simonin, F. (2010). Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacology and Therapeutics*, 126, 244–250.
- Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., & Daaka, Y. (1999). Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta(2)-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 1185–1188.
- Airas, J. M., Betz, H., & El Far, O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Letters*, 494, 60–63.
- Angelotti, T., Daunt, D., Shcherbakova, O. G., Kobilka, B., & Hurt, C. M. (2010). Regulation of G-protein coupled receptor traffic by an evolutionary conserved hydrophobic signal. *Traffic*, 11, 560–578.
- Ango, F., Robbe, D., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., Pin, J. P., Bockaert, J., & Fagni, L. (2002). Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 20, 323–329.
- Arthur, J. F., Shen, Y., Mu, F. T., Leon, C., Gachet, C., Berndt, M. C., & Andrews, R. K. (2006). Calmodulin interacts with the platelet ADP receptor P2Y1. *The Biochemical Journal*, 398, 339–343.
- Awata, H., Huang, C., Handlogten, M. E., & Miller, R. T. (2001). Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 34871–34879.
- Ayala Yanez, R., & Conn, P. M. (2010). Protein disulfide isomerase chaperone ERP-57 decreases plasma membrane expression of the human GnRH receptor. *Cell Biochemistry and Function*, 28, 66–73.
- Ayoub, M. A., Maurel, D., Binet, V., Fink, M., Prezeau, L., Ansanay, H., & Pin, J. P. (2007). Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galpha1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Molecular Pharmacology*, 71, 1329–1340.
- Baillie, G. S., & Houslay, M. D. (2005). Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 129–134.
- Baillie, G. S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S. J., Lefkowitz, R. J., & Houslay, M. D. (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 940–945.
- Baines, A. J., Bennett, P. M., Carter, E. W., & Terracciano, C. (2009). Protein 4.1 and the control of ion channels. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 42, 211–215.
- Baker, E. K., Colley, N. J., & Zuker, C. S. (1994). The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *The EMBO Journal*, 13, 4886–4895.
- Balasubramanian, S., Fam, S. R., & Hall, R. A. (2007). GABAB receptor association with the PDZ scaffold Mupp 1 alters receptor stability and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 4162–4171.
- Bacamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H., & Ullmer, C. (2001). Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 12794–12982.

- Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E., & Zamponi, G. W. (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature Neuroscience*, 7, 118–125.
- Behrens, M., Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C., & Meyerhof, W. (2006). Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 20650–20659.
- Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C., & Zhou, Q. Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature Cell Biology*, 3, 492–498.
- Bernstein, L. S., Ramineni, S., Hague, C., Cladman, W., Chidiac, P., Levey, A. I., & Hepler, J. R. (2004). RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate Gq/11alpha signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 21248–21256.
- Bertaso, F., Zhang, C., Scheschonka, A., de Bock, F., Fontanaud, P., Marin, P., Huganir, R. L., Betz, H., Bockaert, J., Fagni, L., & Lerner-Natoli, M. (2008). PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nature Neuroscience*, 11, 940–948.
- Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C., & Piper, R. C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature Cell Biology*, 4, 534–539.
- Binda, A. V., Kabbani, N., Lin, R., & Levenson, R. (2002). D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N. *Molecular Pharmacology*, 62, 507–513.
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A., & Marin, P. (2004). GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacology and Therapeutics*, 103, 203–221.
- Bockaert, J., Perroy, J., Becamel, C., Marin, P., & Fagni, L. (2010). GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 89–109.
- Boeuf, J., Trigo, J. M., Moreau, P. H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J. C., Mathis, C., Klosien, P., Maldonado, R., & Simonin, F. (2009). Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *The European Journal of Neuroscience*, 30, 860–868.
- Bofill-Cardona, E., Kudlacek, O., Yang, Q., Ahorn, H., Freissmuth, M., & Nanoff, C. (2000). Binding of calmodulin to the D-2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 32672–32680.
- Bolger, G. B., Baillie, G. S., Li, X., Lynch, M. J., Herzyk, P., Mohamed, A., Mitchell, L. H., McCahill, A., Hundsrucker, C., Klusmann, E., Adams, D. R., & Houslay, M. D. (2006). Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *The Biochemical Journal*, 398, 23–36.
- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R. L., Worley, P., & Craig, A. M. (2000). Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron*, 28, 485–497.
- Boschet, T., Martin, S., & Henley, J. M. (2005). Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 118, 4709–4720.
- Brady, A. E., Wang, Q., Colbran, R. J., Allen, P. B., Greengard, P., & Limbird, L. E. (2003). Spinophilin stabilizes cell surface expression of alpha 2B-adrenergic receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 32405–32412.

- Breton, B., Lagace, M., & Bouvier, M. (2010). Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the α 2A-adrenergic receptor, G α i1 β 1 γ 2, and GRK2. *The FASEB Journal*.
- Bulenger, S., Marullo, S., & Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 131–137.
- Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Persani, L., & Lohse, M. J. (2010). Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 221–228.
- Cariolato, L., Cavin, S., & Diviani, D. (2011). AKAP-LBC anchors a PKN-based signaling complex involved in α 1-adrenergic receptor-induced p38 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 7925–7937.
- Chapple, J. P., & Cheetham, M. E. (2003). The chaperone environment at the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum can modulate rhodopsin processing and inclusion formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 19087–19094.
- Chen, J., Huang, Y., Wu, H., Ni, X., Cheng, H., Fan, J., Gu, S., Gu, X., Cao, G., Ying, K., Mao, Y., Lu, Y., & Xie, Y. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel human J-domain protein gene (HDJ3) from the fetal brain. *Journal of Human Genetics*, 48, 217–221.
- Chen, C., Li, J. G., Chen, Y., Huang, P., Wang, Y., & Liu-Chen, L. Y. (2006). GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 7983–7993.
- Chung, J. J., Okamoto, Y., Coblitz, B., Li, M., Qiu, Y., & Shikano, S. (2009). PI3K/Akt signalling-mediated protein surface expression sensed by 14-3-3 interacting motif. *The FEBS Journal*, 276, 5547–5558.
- Clark, A. J., Metherell, L. A., Cheetham, M. E., & Huebner, A. (2005). Inherited ACTH insensitivity illuminates the mechanisms of ACTH action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16, 451–457.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390, 88–91.
- Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrèze, P., & Jockers, R. (2007). Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 835–844.
- Daulat, A. M., Maurice, P., & Jockers, R. (2009). Recent methodological advances in the discovery of GPCR-associated protein complexes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 72–78.
- Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T., & Hell, J. W. (2001). A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science*, 293, 98–101.
- Decaillet, F. M., Rozenfeld, R., Gupta, A., & Devi, L. A. (2008). Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16045–16050.
- Defea, K. (2008). Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: Collaborators and competitors in signal transduction. *British Journal of Pharmacology*, 153(Suppl. 1), S298–S309.
- Dev, K. K., Nakajima, Y., Kitano, J., Braithwaite, S. P., Henley, J. M., & Nakanishi, S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGluR7. *The Journal of Neuroscience*, 20, 7252–7257.
- Ding, Y., Zhang, L., Goodwin, J. S., Wang, Z., Liu, B., Zhang, J., & Fan, G. H. (2008). Plectin regulates the signaling and trafficking of the HIV-1 co-receptor CXCR4 and plays a role in HIV-1 infection. *Experimental Cell Research*, 314, 590–602.

- Discher, D., Parra, M., Conboy, J. G., & Mohandas, N. (1993). Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 7186–7195.
- Dooley, R., Baumgart, S., Rasche, S., Hatt, H., & Neuhaus, E. M. (2009). Olfactory receptor signaling is regulated by the post-synaptic density 95, *Drosophila* discs large, zonoccludens 1 (PDZ) scaffold multi-PDZ domain protein 1. *The FEBS Journal*, 276, 7279–7290.
- Dunham, J. H., & Hall, R. A. (2009). Enhancement of the surface expression of G protein-coupled receptors. *Trends in Biotechnology*, 27, 541–545.
- Dupre, D. J., & Hebert, T. E. (2006). Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cellular Signalling*, 18, 1549–1559.
- Dupre, D. J., Robitaille, M., Rebois, R. V., & Hebert, T. E. (2009). The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 31–56.
- El Far, O., Airas, J., Wischmeyer, E., Nehring, R. B., Karschin, A., & Betz, H. (2000). Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *The European Journal of Neuroscience*, 12, 4215–4221.
- Enz, R. (2002). The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *FEBS Letters*, 514, 184–188.
- Esseltine, J. L., Dale, L. B., & Ferguson, S. S. (2011). Rab GTPases bind at a common site within the angiotensin II type I receptor carboxyl-terminal tail: Evidence that Rab4 regulates receptor phosphorylation, desensitization, and resensitization. *Molecular Pharmacology*, 79, 175–184.
- Fam, S. R., Paquet, M., Castleberry, A. M., Oller, H., Lee, C. J., Traynelis, S. F., Smith, Y., Yun, C. C., & Hall, R. A. (2005). P2Y1 receptor signaling is controlled by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8042–8047.
- Fan, G., Shumay, E., Malbon, C. C., & Wang, H. (2001a). c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 13240–13247.
- Fan, G. F., Shumay, E., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (2001b). The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the beta(2)-adrenergic receptor via the receptor cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 24005–24014.
- Feng, G. J., Kellett, E., Scorer, C. A., Wilde, J., White, J. H., & Milligan, G. (2003). Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 33400–33407.
- Ferreira, P. A., Nakayama, T. A., Pak, W. L., & Travis, G. H. (1996). Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature*, 383, 637–640.
- Francke, F., Ward, R. J., Jenkins, L., Kellett, E., Richter, D., Milligan, G., & Bachner, D. (2006). Interaction of neurochondrin with the melanin-concentrating hormone receptor 1 interferes with G protein-coupled signal transduction but not agonist-mediated internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 32496–32507.
- Fraser, I. D. C., Cong, M., Kim, J., Rollins, E. N., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J., & Scott, J. D. (2000). Assembly of an A kinase-anchoring protein–2-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Current Biology*, 10, 409–412.

- Gage, R. M., Matveeva, E. A., Whiteheart, S. W., & von Zastrow, M. (2005). Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 3305–3313.
- Gales, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T. E., & Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nature Methods*, *2*, 177–184.
- Gavarini, S., Becamel, C., Altier, C., Lory, P., Poncet, J., Wijnholds, J., Bockaert, J., & Marin, P. (2006). Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability. *Molecular Biology of the Cell*, *17*, 4619–4631.
- Ge, X., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2009). μ -Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with Ribophorin I. *Molecular Pharmacology*, *75*, 1307–1316.
- Gee, H. Y., Kim, Y. W., Jo, M. J., Namkung, W., Kim, J. Y., Park, H. W., Kim, K. S., Kim, H., Baba, A., Yang, J., Kim, E., Kim, K. H., & Lee, M. G. (2009). Synaptic scaffolding molecule binds to and regulates vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor in epithelial cells. *Gastroenterology*, *137*, 607–617, 617.e1–4.
- Georgoussi, Z., Leontiadis, L., Mazarakou, G., Merkouris, M., Hyde, K., & Hamm, H. (2006). Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the μ - and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cellular Signalling*, *18*, 771–782.
- Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpoux, B., Borg-Capra, C., & Jockers, R. (2008). The PDZ protein mupp 1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*, 16762–16771.
- Hague, C., Bernstein, L. S., Ramineni, S., Chen, Z., Minneman, K. P., & Hepler, J. R. (2005). Selective inhibition of α 1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 27289–27295.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S., & Lefkowitz, R. J. (1998). The β (2)-adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. *Nature*, *392*, 626–630.
- Hammad, M. M., & Dupre, D. J. (2010). Chaperones contribute to G protein coupled receptor oligomerization, but do not participate in assembly of the G protein with the receptor signaling complex. *Journal of Molecular Signaling*, *5*, 16.
- Hammad, M. M., Kuang, Y. Q., Yan, R., Allen, H., & Dupre, D. J. (2010). Na^+/H^+ exchanger regulatory factor-1 is involved in chemokine receptor homodimer CCR5 internalization and signal transduction but does not affect CXCR4 homodimer or CXCR4-CCR5 heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*, 34653–34664.
- He, J., Bellini, M., Inuzuka, H., Xu, J., Xiong, Y., Yang, X., Castleberry, A. M., & Hall, R. A. (2006). Proteomic analysis of β 1-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*, 2820–2827.
- Hjalm, G., MacLeod, R. J., Kifor, O., Chattopadhyay, N., & Brown, E. M. (2001). Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 34880–34887.
- Hu, L. Y. A., Tang, Y. T., Miller, W. E., Cong, M., Lau, A. G., Lefkowitz, R. J., & Hall, R. A. (2000). β 1-adrenergic receptor association with PSD-95—Inhibition of receptor internalization and facilitation of β (1)-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 38659–38666.

- Ilegems, E., Iwatsuki, K., Kokrashvili, Z., Benard, O., Ninomiya, Y., & Margolskee, R. F. (2010). REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *The Journal of Neuroscience*, 30, 13774–13783.
- Jeanneteau, F., Guillin, O., Diaz, J., Griffon, N., & Sokoloff, P. (2004). GIPC recruits GAIP (RGS19) to attenuate dopamine D2 receptor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 4926–4937.
- Ji, S. P., Zhang, Y., Van Cleemput, J., Jiang, W., Liao, M., Li, L., Wan, Q., Backstrom, J. R., & Zhang, X. (2006). Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nature Medicine*, 12, 324–329.
- Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., & Gerald, C. (1998). GABA_B receptors function as a heterotrimeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature*, 396, 674–679.
- Kim, O. J., Ariano, M. A., Lazzarini, R. A., Levine, M. S., & Sibley, D. R. (2002). Neurofilament-M interacts with the D1 dopamine receptor to regulate cell surface expression and desensitization. *The Journal of Neuroscience*, 22, 5920–5930.
- Kim, K. M., Gainetdinov, R. R., Laporte, S. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2005). G protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 receptor signaling by modulating the stability of a receptor-filamin-beta-arrestin complex. A case of autoreceptor regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 12774–12780.
- Klenk, C., Vetter, T., Zurn, A., Vilardaga, J. P., Friedman, P. A., Wang, B., & Lohse, M. J. (2010). Formation of a ternary complex among NHERF1, beta-arrestin, and parathyroid hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 30355–30362.
- Krebs, M. P., Holden, D. C., Joshi, P., Clark, C. L. 3rd, Lee, A. H., & Kaushal, S. (2010). Molecular mechanisms of rhodopsin retinitis pigmentosa and the efficacy of pharmacological rescue. *Journal of Molecular Biology*, 395, 1063–1078.
- Kurogi, M., Nagatomo, K., Kubo, Y., & Saitoh, O. (2009). Effects of spinophilin on the function of RGS8 regulating signals from M2 and M3-mAChRs. *NeuroReport*, 20, 1134–1139.
- Labasque, M., Reiter, E., Becamel, C., Bockaert, J., & Marin, P. (2008). Physical interaction of calmodulin with the 5-HT_{2C} receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent, receptor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4640–4650.
- Langer, I., Tikhonova, I. G., Boulegue, C., Esteve, J. P., Vatinel, S., Ferrand, A., Moroder, L., Robberecht, P., & Fourmy, D. (2009). Evidence for a direct and functional interaction between the regulators of G protein signaling-2 and phosphorylated C terminus of cholecystokinin-2 receptor. *Molecular Pharmacology*, 75, 502–513.
- Leclerc, P. C., Auger-Messier, M., Lanctot, P. M., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (2002). A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology*, 143, 4702–4710.
- Lee, F. J., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P. J., & Liu, F. (2007). Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *The EMBO Journal*, 26, 2127–2136.
- Lee, S. J., Ritter, S. L., Zhang, H., Shim, H., Hall, R. A., & Yun, C. C. (2011). MAGI-3 competes with NHERF-2 to negatively regulate LPA(2) receptor signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology*, 140, 924–934.
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512–517.
- Leontiadis, L. J., Papakonstantinou, M. P., & Georgoussi, Z. (2009). Regulator of G protein signaling 4 confers selectivity to specific G proteins to modulate mu- and delta-opioid receptor signaling. *Cellular Signalling*, 21, 1218–1228.
- Li, M., Bermak, J. C., Wang, Z. W., & Zhou, Q. Y. (2000). Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Molecular Pharmacology*, 57, 446–452.

- Li, M., Li, C., Weingarten, P., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., & Zhou, Q. Y. (2002). Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280). *Biochemical Pharmacology*, 63, 859–863.
- Lin, R., Karpa, K., Kabbani, N., Goldman-Rakic, P., & Levenson, R. (2001). Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5258–5263.
- Liu, Y., Buck, D. C., Macey, T. A., Lan, H., & Neve, K. A. (2007). Evidence that calmodulin binding to the dopamine D2 receptor enhances receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 27, 47–65.
- Liu, Y., Buck, D. C., & Neve, K. A. (2008). Novel interaction of the dopamine D2 receptor and the Ca²⁺ binding protein S100B: Role in D2 receptor function. *Molecular Pharmacology*, 74, 371–378.
- Liu, F., Wan, Q., Pristupa, Z. B., Yu, X. M., Wang, Y. T., & Niznik, H. B. (2000). Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature*, 403, 274–280.
- Lu, D., Yan, H., Othman, T., & Rivkees, S. A. (2004). Cytoskeletal protein 4.1G is a binding partner of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 alpha. *Journal of Neuroscience Research*, 78, 49–55.
- Luo, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2007). p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 30246–30255.
- Luo, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2011). Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and mu-opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 117, 71–81.
- Lynch, M. J., Baillie, G. S., Mohamed, A., Li, X., Maisonneuve, C., Klusmann, E., van Heeke, G., & Houslay, M. D. (2005). RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 33178–33189.
- Marchese, A., & Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 45509–45512.
- Martini, L., Thompson, D., Kharazia, V., & Whistler, J. L. (2010). Differential regulation of behavioral tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1363–1373.
- Maurice, P., Daulat, A. M., Broussard, C., Mozo, J., Clary, G., Hotellier, F., Chafey, P., Guillaume, J. L., Ferry, G., Boutin, J. A., Delagrangé, P., Camoin, L., & Jockers, R. (2008). A generic approach for the purification of signaling complexes that specifically interact with the carboxy-terminal domain of G protein-coupled receptors. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 1556–1569.
- Maurice, P., Daulat, A. M., Turecek, R., Ivankova-Susankova, K., Zamponi, F., Kamal, M., Clement, N., Guillaume, J. L., Bettler, B., Gales, C., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2010). Molecular organization and dynamics of the melatonin MT receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *The EMBO Journal*, 29, 3646–3659.
- McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., & Foord, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393, 333–339.
- Metherell, L. A., Chapple, J. P., Cooray, S., David, A., Becker, C., Ruschendorf, F., Naville, D., Begeot, M., Khoo, B., Nurnberg, P., Huebner, A., Cheetham, M. E., & Clark, A. J. (2005). Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nature Genetics*, 37, 166–170.

- Milligan, G. (2009). G protein-coupled receptor hetero-dimerization: Contribution to pharmacology and function. *British Journal of Pharmacology*, 158, 5–14.
- Misra, U. K., & Pizzo, S. V. (2008). Heterotrimeric Galphaq11 co-immunoprecipitates with surface-anchored GRP78 from plasma membranes of alpha2M*-stimulated macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104, 96–104.
- Mizrachi, D., & Segaloff, D. L. (2004). Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Molecular Endocrinology*, 18, 1768–1777.
- Mukhopadhyay, S., Wen, X., Chih, B., Nelson, C. D., Lane, W. S., Scales, S. J., & Jackson, P. K. (2010). TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes & Development*, 24, 2180–2193.
- Murdoch, H., Feng, G. J., Bachner, D., Ormiston, L., White, J. H., Richter, D., & Milligan, G. (2005). Periplakin interferes with G protein activation by the melanin-concentrating hormone receptor-1 by binding to the proximal segment of the receptor C-terminal tail. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 8208–8220.
- Namkung, Y., Dipace, C., Javitch, J. A., & Sibley, D. R. (2009). G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 15038–15051.
- Niehaus, J. L., Liu, Y., Wallis, K. T., Egertova, M., Bhartur, S. G., Mukhopadhyay, S., Shi, S., He, H., Selley, D. E., Howlett, A. C., Elphick, M. R., & Lewis, D. L. (2007). CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. *Molecular Pharmacology*, 72, 1557–1566.
- Nobles, M., Benians, A., & Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18706–18711.
- O'Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J. M., Betz, H., & Boehm, S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science*, 286, 1180–1184.
- Oh, Y. S., Jo, N. W., Choi, J. W., Kim, H. S., Seo, S. W., Kang, K. O., Hwang, J. I., Heo, K., Kim, S. H., Kim, Y. H., Kim, I. H., Kim, J. H., Banno, Y., Ryu, S. H., & Suh, P. G. (2004). NHERF2 specifically interacts with LPA2 receptor and defines the specificity and efficiency of receptor-mediated phospholipase C-beta3 activation. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 5069–5079.
- Paasche, J. D., Attramadal, T., Kristiansen, K., Oksvold, M. P., Johansen, H. K., Huitfeldt, H. S., Dahl, S. G., & Attramadal, H. (2005). Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology*, 67, 1581–1590.
- Paquet, M., Asay, M. J., Fam, S. R., Inuzuka, H., Castleberry, A. M., Oller, H., Smith, Y., Yun, C. C., Traynelis, S. F., & Hall, R. A. (2006). The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 29949–29961.
- Parent, A., Laroche, G., Hamelin, E., & Parent, J. L. (2008). RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A(2). *Traffic*, 9, 394–407.
- Parker, L. L., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., & Shieh, B. H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT2C receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 21576–21583.
- Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Lafarga, V., & Mayor, F. Jr., (2010). The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *British Journal of Pharmacology*, 160, 821–832.
- Perroy, J., El Far, O., Bertaso, F., Pin, J. P., Betz, H., Bockaert, J., & Fagni, L. (2002). PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7. *The EMBO Journal*, 21, 2990–2999.

- Pi, M., Spurney, R. F., Tu, Q., Hinson, T., & Quarles, L. D. (2002). Calcium-sensing receptor activation of rho involves filamin and rho-guanine nucleotide exchange factor. *Endocrinology*, *143*, 3830–3838.
- Pichon, X., Wattiez, A. S., Becamel, C., Ehrlich, I., Bockaert, J., Eschaliere, A., Marin, P., & Courteix, C. (2010). Disrupting 5-HT(2A) receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Molecular Therapy*, *18*, 1462–1470.
- Premont, R. T., & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual Review of Physiology*, *69*, 511–534.
- Raveh, A., Cooper, A., Guy-David, L., & Reuveny, E. (2010). Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell*, *143*, 750–760.
- Reid, H. M., Mulvaney, E. P., Turner, E. C., & Kinsella, B. T. (2010). Interaction of the human prostacyclin receptor with Rab11: Characterization of a novel Rab11 binding domain within alpha-helix 8 that is regulated by palmitoylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*, 18709–18726.
- Reiter, E., & Lefkowitz, R. J. (2006). GRKs and beta-arrestins: Roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *17*, 159–165.
- Ritter, S. L., & Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*, 819–830.
- Sachdev, P., Menon, S., Kastner, D. B., Chuang, J. Z., Yeh, T. Y., Condeelis, C., Caceres, A., Sung, C. H., & Sakmar, T. P. (2007). G protein beta gamma subunit interaction with the dynein light-chain component Tctex-1 regulates neurite outgrowth. *The EMBO Journal*, *26*, 2621–2632.
- Saito, H., Kubota, M., Roberts, R. W., Chi, Q., & Matsunami, H. (2004). RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*, *119*, 679–691.
- Saito, M., Sugai, M., Katsushima, Y., Yanagisawa, T., Sukegawa, J., & Nakahata, N. (2005). Increase in cell-surface localization of parathyroid hormone receptor by cytoskeletal protein 4.1G. *The Biochemical Journal*, *392*, 75–81.
- Sanchez-Laorden, B. L., Herraiz, C., Valencia, J. C., Hearing, V. J., Jimenez-Cervantes, C., & Garcia-Borron, J. C. (2009). Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. *Journal of Cellular Physiology*, *220*, 640–654.
- Schmid, E. M., & McMahon, H. T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature*, *448*, 883–888.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., & Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, *285*, 1569–1572.
- Scott, M. G., Benmerah, A., Muntaner, O., & Marullo, S. (2002). Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 3552–3559.
- Seachrist, J. L., & Ferguson, S. S. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sciences*, *74*, 225–235.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 823–847.
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical Journal*, *375*, 503–515.
- Shih, M. L., Lin, F. B., Scott, J. D., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (1999). Dynamic complexes of beta(2)-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 1588–1595.
- Smith, F. D., Oxford, G. S., & Milgram, S. L. (1999). Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 19894–19900.
- Stepanchick, A., & Breitwieser, G. E. (2010). The cargo receptor p24A facilitates calcium sensing receptor maturation and stabilization in the early secretory pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *395*, 136–140.

- Sugai, M., Saito, M., Sukegawa, I., Katsushima, Y., Kinouchi, Y., Nakahata, N., Shimosegawa, T., Yanagisawa, T., & Sukegawa, J. (2003). PTH/PTH-related protein receptor interacts directly with Tctex-1 through its COOH terminus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 24–31.
- Sun, P., Wang, J., Gu, W., Cheng, W., Jin, G. Z., Friedman, E., Zheng, J., & Zhen, X. (2009). PSD-95 regulates D1 dopamine receptor resensitization, but not receptor-mediated Gs-protein activation. *Cell Research*, 19, 612–624.
- Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U., & Sung, C. H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell*, 97, 877–887.
- Takesono, A., Cismowski, M. J., Ribas, C., Bernard, M., Chung, P., Hazard, S., Duzic, E., & Lanier, S. M. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33202–33205.
- Tao, Y. X. (2006). Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure–function insights and therapeutic implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 111, 949–973.
- Tao, J., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (2003). Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the beta2-adrenergic receptor. *The EMBO Journal*, 22, 6419–6429.
- Thompson, D., & Whistler, J. L. (2011). Dopamine D(3) receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 1598–1608.
- Turner, J. H., & Raymond, J. R. (2005). Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine2A receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 30741–30750.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A., & Lubbert, H. (1998). Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Letters*, 424, 63–68.
- Valiquette, M., Bonin, H., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Bouvier, M. (1990). Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5089–5093.
- von Zastrow, M. (2003). Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sciences*, 74, 217–224.
- Wang, B., Ardura, J. A., Romero, G., Yang, Y., Hall, R. A., & Friedman, P. A. (2010). Na/H exchanger regulatory factors control parathyroid hormone receptor signaling by facilitating differential activation of G(alpha) protein subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 26976–26986.
- Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J., & Olsen, R. W. (1999a). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397, 69–72.
- Wang, Q., & Limbird, L. E. (2002). Regulated interactions of the alpha 2A adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 50589–50596.
- Wang, D. X., Sadee, W., & Quillan, J. M. (1999b). Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 22081–22088.
- Wang, B., Yang, Y., Abou-Samra, A. B., & Friedman, P. A. (2009). NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor desensitization: Interference with beta-arrestin binding. *Molecular Pharmacology*, 75, 1189–1197.
- Wang, X., Zeng, W., Soyombo, A. A., Tang, W., Ross, E. M., Barnes, A. P., Milgram, S. L., Penninger, J. M., Allen, P. B., Greengard, P., & Muallem, S. (2005). Spinophilin regulates Ca^{2+} signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nature Cell Biology*, 7, 405–411.

- Wang, Q., Zhao, J., Brady, A. E., Feng, J., Allen, P. B., Lefkowitz, R. J., Greengard, P., & Limbird, L. E. (2004). Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science*, *304*, 1940–1944.
- Ward, R. J., Jenkins, L., & Milligan, G. (2009). Selectivity and functional consequences of interactions of family A G protein-coupled receptors with neurochondrin and periplakin. *Journal of Neurochemistry*, *109*, 182–192.
- Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L. Y., & Shenolikar, S. (2006). The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annual Review of Physiology*, *68*, 491–505.
- Wooten, D. L., Simms, J., Hay, D. L., Christopoulos, A., & Sexton, P. M. (2010). Receptor activity modifying proteins and their potential as drug targets. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *91*, 53–79.
- Wu, N., Hanson, S. M., Francis, D. J., Vishnivetskiy, S. A., Thibonnier, M., Klug, C. S., Shoham, M., & Gurevich, V. V. (2006). Arrestin binding to calmodulin: A direct interaction between two ubiquitous signaling proteins. *Journal of Molecular Biology*, *364*, 955–963.
- Xia, Z., Gray, J. A., Compton-Toth, B. A., & Roth, B. L. (2003). A direct interaction of PSD-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 21901–21908.
- Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R. 3rd, & Lefkowitz, R. J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 12011–12016.
- Xu, J., Paquet, M., Lau, A. G., Wood, J. D., Ross, C. A., & Hall, R. A. (2001). Beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 41310–41317.
- Yang, X., Zheng, J., Xiong, Y., Shen, H., Sun, L., Huang, Y., Sun, C., Li, Y., & He, J. (2010). Beta-2 adrenergic receptor mediated ERK activation is regulated by interaction with MAGI-3. *FEBS Letters*, *584*, 2207–2212.
- Yeh, T. Y., Peretti, D., Chuang, J. Z., Rodriguez-Boulan, E., & Sung, C. H. (2006). Regulatory dissociation of Tctex-1 light chain from dynein complex is essential for the apical delivery of rhodopsin. *Traffic*, *7*, 1495–1502.
- Yu, N., Erb, L., Shivaji, R., Weisman, G. A., & Seyer, C. I. (2008). Binding of the P2Y₂ nucleotide receptor to filamin A regulates migration of vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, *102*, 581–588.
- Zhang, C. S., Bertaso, F., Eulenburg, V., Lerner-Natoli, M., Herin, G. A., Bauer, L., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H., & Scheschonka, A. (2008). Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylenetetrazol. *The Journal of Neuroscience*, *28*, 8604–8614.
- Zhang, M., & Breitwieser, G. E. (2005). High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 11140–11146.
- Zhang, J., Vinuela, A., Neely, M. H., Hallett, P. J., Grant, S. G., Miller, G. M., Isacson, O., Caron, M. G., & Yao, W. D. (2007a). Inhibition of the dopamine D1 receptor signaling by PSD-95. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*, 15778–15789.
- Zhang, H., Wang, D., Sun, H., Hall, R. A., & Yun, C. C. (2007b). MAGI-3 regulates LPA-induced activation of Erk and RhoA. *Cellular Signalling*, *19*, 261–268.
- Zimmerman, B., Simaan, M., Lee, M. H., Luttrell, L. M., & Laporte, S. A. (2009). c-Src-mediated phosphorylation of AP-2 reveals a general mechanism for receptors internalizing through the clathrin pathway. *Cellular Signalling*, *21*, 103–110.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AbdAlla, S., Lother, H., & Quitterer, U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, 407(6800), 94-98.
- Abu-Helo, A., & Simonin, F. (2010). Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacology & therapeutics*, 126(3), 244-250.
- Achour, L., Labbé-Jullié, C., Scott, M. G., & Marullo, S. (2008). An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 528-535.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-29.
- Ahlquist RP (1948). "A study of the adrenotropic receptors". *Am. J. Physiol.* 153 (3): 586–600
- Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., & Daaka, Y. (1999). Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for β 2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1185-1188.
- Ahn, S., Shenoy, S. K., Wei, H., & Lefkowitz, R. J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35518-35525.
- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T. R., & Lefkowitz, R. J. (2004b). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by β -arrestins 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7807-7811.
- Ajith Karunarathne, W. K., O'Neill, P. R., Martinez-Espinosa, P. L., Kalyanaraman, V., & Gautam, N. (2012). All G protein $\beta\gamma$ complexes are capable of translocation on receptor activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(3), 605-611.
- Alarma-Estrany, P., & Pintor, J. (2007). Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacology & therapeutics*, 113(3), 507-522.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., ... & Durroux, T. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nature chemical biology*, 6(8), 587-594.
- Aleandri, V., Spina, V., & Morini, A. (1996). The pineal gland and reproduction. *Human reproduction update*, 2(3), 225-235.
- Al-Ghoul, W. M., Herman, M. D., & Dubocovich, M. L. (1998). Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*, 9(18), 4063-4068.
- Alonso, V., & Friedman, P. A. (2013). Minireview: Ubiquitination-regulated G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *Molecular Endocrinology*, 27(4), 558-572.
- Altier, C., & Zamponi, G. W. (2008). Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 28(1-2), 71-81.
- Altier, C., Dale, C. S., Kisilevsky, A. E., Chapman, K., Castiglioni, A. J., Matthews, E. A., ... & Zamponi, G. W. (2007). Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *The Journal of neuroscience*, 27(24), 6363-6373.
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R. M., Hameed, S., Peloquin, J. B., Vartian, B. A., ... & Zamponi, G. W. (2006). ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature neuroscience*, 9(1), 31-40.
- Ambrosio, M., & Lohse, M. J. (2012). Nonequilibrium activation of a G-protein-coupled receptor. *Molecular pharmacology*, 81(6), 770-777.

- Andersson, E. A., Holst, B., Sparsø, T., Grarup, N., Banasik, K., Holmkvist, J., ... & Hansen, T. (2010). MTNR1B G24E variant associates with BMI and fasting plasma glucose in the general population in studies of 22,142 Europeans. *Diabetes*, 59(6), 1539-1548.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., & Bouvier, M. (2000). Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3684-3689.
- Ango, F., Pin, J. P., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., Bockaert, J., & Fagni, L. (2000). Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *The Journal of Neuroscience*, 20(23), 8710-8716.
- Ango, F., Prézeau, L., Muller, T., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., ... & Fagni, L. (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature*, 411(6840), 962-965.
- Archbold, J. K., Flanagan, J. U., Watkins, H. A., Gingell, J. J., & Hay, D. L. (2011). Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends in pharmacological sciences*, 32(10), 591-600.
- Arendt, J., & Deacon, S. (1997). Treatment of circadian rhythm disorders-melatonin. *Chronobiology international*, 14(2), 185-204.
- Aridor, M., Bannykh, S. I., Rowe, T., & Balch, W. E. (1995). Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *The Journal of cell biology*, 131(4), 875-893.
- Armstrong D, Strange PG. Dopamine D2 receptor dimer formation: evidence from ligand binding. (2001). *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22621-9.
- Armstrong, S. M. (1989). Melatonin: the internal zeitgeber of mammals. *Pineal Res Rev*, 7, 157-202.
- Attwood, T. K., & Findlay, J. B. C. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering*, 7(2), 195-203.
- Attwood, T. K., Eliopoulos, E. E., & Findlay, J. B. (1991). Multiple sequence alignment of protein families showing low sequence homology: a methodological approach using database pattern-matching discriminators for G-protein-linked receptors. *Gene*, 98(2), 153-159.
- Audet, M., & Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*, 151(1), 14-23.
- Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21522-21528.
- Ayoub, M. A., Levoye, A., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2004). Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Molecular pharmacology*, 66(2), 312-321.
- Baba, K., Benleulmi-Chaachoua, A., Journe, A. S., Kamal, M., Guillaume, J. L., Dussaud, S., ... & Tosini, G. (2013). Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Science signaling*, 6(296), ra89.
- Baba, K., Pozdeyev, N., Mazzoni, F., Contreras-Alcantara, S., Liu, C., Kasamatsu, M., ... & Tosini, G. (2009). Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 15043-15048.
- Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S., & Couturier, C. (2008). The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnology journal*, 3(3), 311-324.
- Bai, F., & Witzmann, F. A. (2007). Synaptosome proteomics. In *Subcellular Proteomics* (pp. 77-98). Springer Netherlands.
- Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., & Hamodrakas, S. J. (2013). Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *Journal of structural biology*, 182(3), 209-218.

- Banères, J. L., & 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. *Journal of molecular biology*, 329(4), 815-829.
- Barak, L. S., Menard, L., Ferguson, S. S., Colapietro, A. M., & 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(47), 15407-15414.
- Barth, J., & Volkhardt, W. (2011). Proteomic investigations of the synaptic vesicle interactome.
- Bartlett, S. E., Enquist, J., Hopf, F. W., Lee, J. H., Gladher, F., Kharazia, V., ... & Whistler, J. L. (2005). Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11521-11526.
- Bartoi, T., Rigbolt, K. T., Du, D., Köhr, G., Blagoev, B., & Kornau, H. C. (2010). GABAB receptor constituents revealed by tandem affinity purification from transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20625-20633.
- Bauch, C., Koliwer, J., Buck, F., Hönck, H. H., & Kreienkamp, H. J. (2014). Subcellular Sorting of the G-Protein Coupled Mouse Somatostatin Receptor 5 by a Network of PDZ-Domain Containing Proteins. *PLoS one*, 9(2), e88529.
- Baydas, G., Özer, M., Yasar, A., Tuzcu, M., & Koz, S. T. (2005). Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain research*, 1046(1), 187-194.
- Baydas, G., Reiter, R. J., Nedzvetskii, V. S., Nerush, P. A., & Kirichenko, S. V. (2002). Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin. *Journal of pineal research*, 33(3), 134-139.
- Bazwinsky-Wutschke, I., Bieseke, L., Mühlbauer, E., & Peschke, E. (2014). Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *Journal of pineal research*, 56(1), 82-96.
- Bécamel, C., Alonso, G., Galéotti, N., Demey, E., Jouin, P., Ullmer, C., ... & Marin, P. (2002a). Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT_{2C} receptors: a proteomic approach. *The EMBO journal*, 21(10), 2332-2342.
- Bécamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., ... & Ullmer, C. (2001). Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12974-12982.
- Bécamel, C., Galéotti, N., Poncet, J., Jouin, P., Dumuis, A., Bockaert, J., & Marin, P. (2002b). A proteomic approach based on peptide affinity chromatography, 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify multiprotein complexes interacting with membrane-bound receptors. *Biological procedures online*, 4(1), 94-104.
- Bécamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galéotti, N., Dumuis, A., ... & Marin, P. (2004). The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20257-20266.
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., & Carlberg, C. (1997). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16707-16707.
- Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., ... & Zamponi, G. W. (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature neuroscience*, 7(2), 118-125.
- Beets, I., Lindemans, M., Janssen, T., & Verleyen, P. (2011). Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. In *Neuropeptides* (pp. 377-391). Humana Press.
- Benes, F. M., Paskevich, P. A., Davidson, J., & Domesick, V. B. (1985). The effects of haloperidol on synaptic patterns in the rat striatum. *Brain Research*, 329(1), 265-273.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Chiergatti, E., & Greengard, P. (1992). Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. *Neuron*, 8(2), 377-386.

- Benians, A., Nobles, M., Hosny, S., & Tinker, A. (2005). Regulators of G-protein Signaling Form a Quaternary Complex with the Agonist, Receptor, and G-protein A NOVEL EXPLANATION FOR THE ACCELERATION OF SIGNALING ACTIVATION KINETICS. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13383-13394.
- Benleulmi-Chaachoua, A., Wojciech, S., & Jockers, R. (2013). Les récepteurs couplés aux protéines G sous les feux de la rampe. *Biologie Aujourd'hui*, 207(3), 191-200.
- Benloucif, S., & Dubocovich, M. L. (1996). Melatonin and light induce phase shifts of circadian activity rhythms in the C3H/HeN mouse. *Journal of biological rhythms*, 11(2), 113-125.
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2797-2801.
- Bergmayr, C., Thurner, P., Keuerleber, S., Kudlacek, O., Nanoff, C., Freissmuth, M., & Gruber, C. W. (2013). Recruitment of a Cytoplasmic Chaperone Relay by the A2A Adenosine Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 28831-28844.
- Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C., & Zhou, Q. Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature cell biology*, 3(5), 492-498.
- Bernier, V., Bichet, D. G., & Bouvier, M. (2004). Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Current opinion in pharmacology*, 4(5), 528-533.
- BERTHET J, RALL TW, SUTHERLAND EW The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem*. 1957 Jan;224(1):463-75.
- Beuckmann, C. T., Sinton, C. M., Miyamoto, N., Ino, M., & Yanagisawa, M. (2003). N-type calcium channel $\alpha 1B$ subunit (CaV2. 2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *The Journal of neuroscience*, 23(17), 6793-6797.
- Bhattacharya, A., Sankar, S., & Panicker, M. M. (2010). Differences in the C-terminus contribute to variations in trafficking between rat and human 5-HT_{2A} receptor isoforms: identification of a primate-specific tripeptide ASK motif that confers GRK-2 and β arrestin-2 interactions. *Journal of neurochemistry*, 112(3), 723-732.
- Bizzarri, M., Proietti, S., Cucina, A., & Reiter, R. J. (2013). Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(12), 1483-1496.
- Blumer, J. B., & Lanier, S. M. (2014). Activators of G Protein Signaling Exhibit Broad Functionality and Define a Distinct Core Signaling Triad. *Molecular pharmacology*, 85(3), 388-396.
- Blumer, J. B., Lord, K., Saunders, T. L., Pacchioni, A., Black, C., Lazartigues, E., ... & Lanier, S. M. (2008). Activator of G protein signaling 3 null mice: I. Unexpected alterations in metabolic and cardiovascular function. *Endocrinology*, 149(8), 3842-3849.
- Boatright, J. H., Rubim, N. M., & Iuvone, P. M. (1994). Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. *Visual neuroscience*, 11(05), 1013-1018.
- Bock, A., Chirinda, B., Krebs, F., Messerer, R., Bätz, J., Muth, M., ... & Mohr, K. (2014). Dynamic ligand binding dictates partial agonism at a G protein-coupled receptor. *Nature Chemical Biology*, 10(1), 18-20.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., & Fagni, L. (2003). The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS letters*, 546(1), 65-72.
- Bockaert, J., Perroy, J., Bécamel, C., Marin, P., & Fagni, L. (2010). GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: roles in physiology and pathologies. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 89-109.
- Bockaert, J., Roussignol, G., Becamel, C., Gavarini, S., Joubert, L., Dumuis, A., ... & Marin, P. (2004). GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochemical Society Transactions*, 32(5), 851-855.
- Bogen, I. L., Boulland, J. L., Mariussen, E., Wright, M. S., Fonnum, F., Kao, H. T., & Walaas, S. I. (2006). Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. *Journal of neurochemistry*, 96(5), 1458-1466.
- Boguth, C. A., Singh, P., Huang, C. C., & Tesmer, J. J. (2010). Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases. *The EMBO journal*, 29(19), 3249-3259.

- Bolan, E. A., Kivell, B., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L. D., Han, Y., ... & Shippenberg, T. S. (2007). D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Molecular pharmacology*, 71(5), 1222-1232.
- Bomberger, J. M., Parameswaran, N., Hall, C. S., Aiyar, N., & Spielman, W. S. (2005b). Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9297-9307.
- Bomberger, J. M., Spielman, W. S., Hall, C. S., Weinman, E. J., & Parameswaran, N. (2005a). Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23926-23935.
- Bonnefond, A., Clément, N., Fawcett, K., Yengo, L., Vaillant, E., Guillaume, J. L., ... & Froguel, P. (2012). Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nature genetics*, 44(3), 297-301.
- Borgkvist, A., Malmlöf, T., Feltmann, K., Lindskog, M., & Schilström, B. (2012). Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(04), 531-540.
- BORNANCIN, F., PFISTER, C., & CHABRE, M. (1989). The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. *European Journal of Biochemistry*, 184(3), 687-698.
- Borroto-Escuela, D. O., Correia, P. A., Romero-Fernandez, W., Narvaez, M., Fuxe, K., Ciruela, F., & Garriga, P. (2011). Muscarinic receptor family interacting proteins: role in receptor function. *Journal of neuroscience methods*, 195(2), 161-169.
- Bosch, D. E., Zielinski, T., Lowery, R. G., & Siderovski, D. P. (2012). Evaluating Modulators of “Regulator of G-protein Signaling”(RGS) Proteins. *Current Protocols in Pharmacology*, 2-8.
- Botham, A., Xiaodan, G., Yu, P. X., Alyn, H. M., Steven, J., & Laura, R. S. (2011). Palmitoylation of human proteinase-activated receptor-2 differentially regulates receptor-triggered ERK1/2 activation, calcium signalling and endocytosis. *Biochemical Journal*, 438(2), 359-367.
- Boughton AP, Yang P, Tesmer VM, Ding B, Tesmer JJ, Chen Z.(2011) Heterotrimeric G protein beta1gamma2 subunits change orientation upon complex formation with G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) on a model membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13;108(37):E667-73.
- Bouschet, T., Martin, S., & Henley, J. M. (2005). Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane. *Journal of cell science*, 118(20), 4709-4720.
- Bray, J. K., Abrol, R., Goddard, W. A., Trzaskowski, B., & Scott, C. E. (2014). SuperBiHelix method for predicting the pleiotropic ensemble of G-protein-coupled receptor conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E72-E78.
- Bruno, A., Costantino, G., de Fabritiis, G., Pastor, M., & Selent, J. (2012). Membrane-Sensitive Conformational States of Helix 8 in the Metabotropic Glu2 Receptor, a Class C GPCR. *PloS one*, 7(8), e42023.
- Brydon, L., Petit, L., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P. J., Strosberg, A. D., & Jockers, R. (1999b). Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reproduction Nutrition Development*, 39(3), 315-324.
- Brydon, L., Petit, L., Delagrang, P., Strosberg, A. D., & Jockers, R. (2001). Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology*, 142(10), 4264-4271.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., ... & Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins. *Molecular Endocrinology*, 13(12), 2025-2038.
- Brzezinski, A., Vangel, M. G., Wurtman, R. J., Norrie, G., Zhdanova, I., Ben-Shushan, A., & Ford, I. (2005). Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep medicine reviews*, 9(1), 41-50.
- Bulenger, S., Marullo, S., & Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo-and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends in pharmacological sciences*, 26(3), 131-137.
- Burchett, S. A., Bannon, M. J., & Granneman, J. G. (1999). RGS mRNA Expression in Rat Striatum. *Journal of neurochemistry*, 72(4), 1529-1533.

- Burré, J., & Volkandt, W. (2007). The synaptic vesicle proteome. *Journal of neurochemistry*, 101(6), 1448-1462.
- Bykhovskaia, M. (2011, June). Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 4, pp. 387-392). Academic Press.
- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D. C., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., ... & Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *Journal of neurochemistry*, 109(5), 1497-1507.
- Cabrera-Vera, T. M., Hernandez, S., Earls, L. R., Medkova, M., Sundgren-Andersson, A. K., Surmeier, D. J., & Hamm, H. E. (2004). RGS9-2 modulates D2 dopamine receptor-mediated Ca²⁺ channel inhibition in rat striatal cholinergic interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16339-16344.
- Calebiro, D., Nikolaev, V. O., & Lohse, M. J. (2010). Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *Journal of molecular endocrinology*, 45(1), 1-8.
- Calebiro, D., Rieken, F., Wagner, J., Sungkaworn, T., Zabel, U., Borzi, A., ... & Lohse, M. J. (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 743-748.
- Calvo, J. R., González-Yanes, C., & Maldonado, M. D. (2013). The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *Journal of pineal research*, 55(2), 103-120.
- Canals, M., Lopez-Gimenez, J., & Milligan, G. (2009). Cell surface delivery and structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha1b-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochem. J*, 417, 161-172.
- Cancino J, Capalbo A, Luini A. (2013). Golgi-dependent signaling: self-coordination of membrane trafficking. *Methods Cell Biol*. 2013;118:359-82.
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., & von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the β 2-adrenergic receptor. *Nature*, 401(6750), 286-290.
- Carneiro, R. C., Pereira, E. P., Cipolla-Neto, J. O. S. E., & Markus, R. P. (1993). Age-related changes in melatonin modulation of sympathetic neurotransmission. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(3), 1536-1540.
- Carneiro, R. C., Toffoleto, O., Cipolla-Neto, J., & Marcus, R. P. (1994). Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *European journal of pharmacology*, 257(1), 73-77.
- Caron, M. G., Srinivasan, Y., Pitha, J., Kociolek, K. & Lefkowitz, R. J. (1979) Affinity chromatography
- Carrel, D., Simon, A., Emerit, M. B., Rivals, I., Leterrier, C., Biard, M., ... & Lenkei, Z. (2011). Axonal Targeting of the 5-HT1B Serotonin Receptor Relies on Structure-Specific Constitutive Activation. *Traffic*, 12(11), 1501-1520.
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., ... & Franco, R. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nature methods*, 5(8), 727-733.
- Carrillo, J. J., Lopez-Gimenez, J. F., & Milligan, G. (2004). Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric α 1b-adrenoceptor. *Molecular pharmacology*, 66(5), 1123-1137.
- Carrillo-Vico, A., Garcia-Perganeda, A., Naji, L., Calvo, J. R., Romero, M. P., & Guerrero, J. M. (2003). Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(10), 2272-2278.
- Catapano, F., Monteleone, P., Fuschino, A., Maj, M., & Kemali, D. (1992). Melatonin and cortisol secretion in patients with primary obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry research*, 44(3), 217-225.
- Catterall, W. A., & Few, A. P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59(6), 882-901.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 411-425.

- Cermakian, N., & Sassone-Corsi, P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 59-67.
- Cervinski, M. A., Foster, J. D., & Vaughan, R. A. (2005). Psychoactive substrates stimulate dopamine transporter phosphorylation and down-regulation by cocaine-sensitive and protein kinase C-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40442-40449.
- Cervinski, M. A., Foster, J. D., & Vaughan, R. A. (2010). Syntaxin 1A regulates dopamine transporter activity, phosphorylation and surface expression. *Neuroscience*, 170(2), 408-416.
- Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., & Benfenati, F. (2010). The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Progress in neurobiology*, 91(4), 313-348.
- Chabre, M., & le Maire, M. (2005). Monomeric G-protein-coupled receptor as a functional unit. *Biochemistry*, 44(27), 9395-9403.
- Chan, A. S., Lai, F. P., Lo, R. K., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Stanbridge, E. J., & Wong, Y. H. (2002). Melatonin mtl and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and-insensitive G proteins. *Cellular signalling*, 14(3), 249-257.
- Chan, A. W., Khanna, R., Li, Q., & Stanley, E. F. (2007b). Munc18: a presynaptic transmitter release site N type (CaV2. 2) calcium channel interacting protein. *Channels*, 1(1), 11-20.
- Chan, A. W., Owens, S., Tung, C., & Stanley, E. F. (2007). Resistance of presynaptic CaV2. 2 channels to voltage-dependent inactivation: dynamic palmitoylation and voltage sensitivity. *Cell calcium*, 42(4), 419-425.
- Chaste, P., Clement, N., Mercati, O., Guillaume, J. L., Delorme, R., Botros, H. G., ... & Bourgeron, T. (2010). Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. *PLoS One*, 5(7), e11495.
- Chaudhury, D., Wang, L. M., & Colwell, C. S. (2005). Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. *Journal of biological rhythms*, 20(3), 225-236.
- Chaurasia, S. S., Pozdeyev, N., Haque, R., Visser, A., Ivanova, T. N., & Iuvone, P. M. (2006). Circadian clockwork machinery in neural retina: evidence for the presence of functional clock components in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures. *Mol Vis*, 12, 215-223.
- Chen, B., Dores, M. R., Grimsey, N., Canto, I., Barker, B. L., & Trejo, J. (2011). Adaptor protein complex-2 (AP-2) and epsin-1 mediate protease-activated receptor-1 internalization via phosphorylation-and ubiquitination-dependent sorting signals. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40760-40770.
- Chen, C. A., & Manning, D. R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*, 20(13).
- Cheng, D., Hoogenraad, C. C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M. A., Duong, D. M., ... & Peng, J. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Molecular & cellular proteomics*, 5(6), 1158-1170.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., ... & Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *science*, 318(5854), 1258-1265.
- Chidiac, P., Nouet, S., & Bouvier, M. (1996). Agonist-induced modulation of inverse agonist efficacy at the beta 2-adrenergic receptor. *Molecular pharmacology*, 50(3), 662-669.
- Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A., ... & Stevens, R. C. (2010). Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*, 330(6007), 1091-1095.
- Chini, B., & Parenti, M. (2004). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?. *Journal of molecular endocrinology*, 32(2), 325-338.
- Cho, D. I., Min, C., Jung, K. S., Cheong, S. Y., Zheng, M., Cheong, S. J., ... & Kim, K. M. (2012). The N-terminal region of the dopamine D2 receptor, a rhodopsin-like GPCR, regulates correct integration into the plasma membrane and endocytic routes. *British journal of pharmacology*, 166(2), 659-675.
- Choi, W. T., Kumar, S., Madani, N., Han, X., Tian, S., Dong, C. Z., ... & An, J. (2012). A novel synthetic bivalent ligand to probe chemokine receptor CXCR4 dimerization and inhibit HIV-1 entry. *Biochemistry*, 51(36), 7078-7086.

- Chuluyan, H. E., Rosenstein, R. E., Chang, S. M., Gálvez, M. M., & Cardinali, D. P. (1991). Presynaptic effects of melatonin on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *Journal of pineal research*, 10(4), 165-173.
- Chung, K. Y., Day, P. W., Vélez-Ruiz, G., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2013). Identification of GPCR-Interacting Cytosolic Proteins Using HDL Particles and Mass Spectrometry-Based Proteomic Approach. *PLoS one*, 8(1), e54942.
- Chyan, Y. J., Poeggeler, B., Omar, R. A., Chain, D. G., Frangione, B., Ghiso, J., & Pappolla, M. A. (1999). Potent neuroprotective properties against the Alzheimer β -amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21937-21942.
- Cismowski, M. J., Ma, C., Ribas, C., Xie, X., Spruyt, M., Lizano, J. S., ... & Duzic, E. (2000). Activation of Heterotrimeric G-protein Signaling by a Ras-related Protein IMPLICATIONS FOR SIGNAL INTEGRATION. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23421-23424.
- Cismowski, M. J., Takesono, A., Ma, C., Lizano, J. S., Xie, X., Fuernkranz, H., ... & Duzic, E. (1999). Genetic screens in yeast to identify mammalian nonreceptor modulators of G-protein signaling. *Nature biotechnology*, 17(9), 878-883.
- Civelli, O., Reinscheid, R. K., Zhang, Y., Wang, Z., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2013). G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 127-146.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2001). β -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and β 2-adrenergic receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42509-42513.
- Clark, A. J. (1933) The mode of action of drugs on cells, Edward Arnold & Co., London.
- Clark, A.J. (1937) General Pharmacology: Heffter's Handbuch d. exp Pharmacology (Erghand 4), Springer
- Clark, S. D., Tran, H. T., Zeng, J., & Reinscheid, R. K. (2010). Importance of extracellular loop one of the neuropeptide S receptor for biogenesis and function. *Peptides*, 31(1), 130-138.
- Cogé, F., Guenin, S. P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., ... & Boutin, J. A. (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT2 receptor. *British journal of pharmacology*, 158(5), 1248-1262.
- Coleman, D. E., Berghuis, A. M., Lee, E., Linder, M. E., Gilman, A. G., & Sprang, S. R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, 265(5177), 1405-1412..
- Collins, D. R., & Davies, S. N. (1997). Melatonin blocks the induction of long-term potentiation in an α -methyl-D-aspartate independent manner. *Brain research*, 767(1), 162-165.
- Comps-Agrar, L., Kniazeff, J., Nørskov-Lauritsen, L., Maurel, D., Gassmann, M., Gregor, N., ... & Pin, J. P. (2011). The oligomeric state sets GABAB receptor signalling efficacy. *The EMBO journal*, 30(12), 2336-2349.
- Conchon, S., Barrault, M. B., Miserey, S., Corvol, P., & Clauser, E. (1997). The C-terminal third intracellular loop of the rat AT1A angiotensin receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25566-25572.
- Conway, S., Drew, J. E., Mowat, E. S., Barrett, P., Delagrangé, P., & Morgan, P. J. (2000). Chimeric Melatonin mt1 and Melatonin-related Receptors IDENTIFICATION OF DOMAINS AND RESIDUES PARTICIPATING IN LIGAND BINDING AND RECEPTOR ACTIVATION OF THE MELATONIN mt1 RECEPTOR. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20602-20609.
- Conway, S., Mowat, E. S., Drew, J. E., Barrett, P., Delagrangé, P., & Morgan, P. J. (2001). Serine Residues 110 and 114 Are Required for Agonist Binding but Not Antagonist Binding to the Melatonin MT₁ Receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(5), 1229-1236.
- Cordeaux, Y., Nickolls, S. A., Flood, L. A., Graber, S. G., & Strange, P. G. (2001). Agonist Regulation of D2 Dopamine Receptor/G Protein Interaction EVIDENCE FOR AGONIST SELECTION OF G PROTEIN SUBTYPE. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 28667-28675.
- Cottet, M., Faklaris, O., Trinquet, E., Pin, J. P., & Durroux, T. (2013). New Fluorescent Strategies Shine Light on the Evolving Concept of GPCR Oligomerization. In *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes* (pp. 389-415). Springer Berlin Heidelberg.

- Couve, A., Filippov, A. K., Connolly, C. N., Bettler, B., Brown, D. A., & Moss, S. J. (1998). Intracellular Retention of Recombinant GABAB Receptors. *Journal of biological chemistry*, 273(41), 26361-26367.
- Cuello, F., Schulze, R. A., Heemeyer, F., Meyer, H. E., Lutz, S., Jakobs, K. H., ... & Wieland, T. (2003). Activation of Heterotrimeric G Proteins by a High Energy Phosphate Transfer via Nucleoside Diphosphate Kinase (NDPK) B and G β Subunits COMPLEX FORMATION OF NDPK B WITH G β DIMERS AND PHOSPHORYLATION OF His-266 IN G β . *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7220-7226.
- Cunningham, M. R., McIntosh, K. A., Pediani, J. D., Robben, J., Cooke, A. E., Nilsson, M., ... & Plevin, R. (2012). Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16656-16669.
- Cvejic, S., & Devi, L. A. (1997). Dimerization of the δ opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26959-26964.
- Cyr, J. L., & Brady, S. T. (1992). Molecular motors in axonal transport. *Molecular neurobiology*, 6(2-3), 137-155.
- Daaka, Y. (2012). S-nitrosylation-regulated GPCR signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(6), 743-751
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655), 88-91.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 685-688.
- Damian, M., Martin, A., Mesnier, D., Pin, J. P., & Banères, J. L. (2006). Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *The EMBO journal*, 25(24), 5693-5702.
- Dardente, H., Cermakian, N., 2005. [How many pieces to build a circadian clock?]. *Med Sci (Paris)* 21, 66-72.
- Das, M., Subbaya Ithychanda, S., Qin, J., & Plow, E. F. (2014). Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(2), 579-588.
- Daulat, A. M., Maurice, P., & Jockers, R. (2009). Recent methodological advances in the discovery of GPCR-associated protein complexes. *Trends in pharmacological sciences*, 30(2), 72-78.
- Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., ... & Jockers, R. (2007). Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(5), 835-844.
- De Vries, L., Fischer, T., Tronchère, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P., & Farquhar, M. G. (2000). Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G α i subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14364-14369.
- Defea, K. (2008). β -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S298-S309.
- DeFea, K. A. (2011). Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold?. *Cellular signalling*, 23(4), 621-629.
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*, 6(1), 204.
- Delavest, M., Even, C., Benjemaa, N., Poirier, M. F., Jockers, R., & Krebs, M. O. (2012). Association of the intronic rs2072621 polymorphism of the X-linked GPR50 gene with affective disorder with seasonal pattern. *European Psychiatry*, 27(5), 369-371.
- Delmas, P., Coste, B., Gamper, N., & Shapiro, M. S. (2005). Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron*, 47(2), 179-182.
- Deming, S. L., Lu, W., Beeghly-Fadiel, A., Zheng, Y., Cai, Q., Long, J., ... & Zheng, W. (2012). Melatonin pathway genes and breast cancer risk among Chinese women. *Breast cancer research and treatment*, 132(2), 693-699.

- Denis, C., Saulière, A., Galandrin, S., Sénard, J. M., & Galés, C. (2012). Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands. *Current pharmaceutical design*, 18(2), 128.
- Depoortere, I. (2012). GI functions of GPR39: novel biology. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Deribe L, Y., Wild, P., Chandrashaker, A., Curak, J., Schmidt, M. H., Kalaidzidis, Y., ... & Dikic, I. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Science signaling*, 2(102), ra84.
- Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Delagrangé, P., Spadoni, G., Cohen, W., ... & Nosjean, O. (2012). Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT1 and hMT2 and discovery of inverse agonists. *Journal of pineal research*, 53(1), 29-37.
- Dhimi, G. K., Anborgh, P. H., Dale, L. B., Sterne-Marr, R., & Ferguson, S. S. (2002). Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25266-25272.
- Di Bella, G., Mascia, F., Gualano, L., & Di Bella, L. (2013). Melatonin anticancer effects: review. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 2410-2430.
- Digby, G. J., Sethi, P. R., & Lambert, N. A. (2008). Differential dissociation of G protein heterotrimers. *The Journal of physiology*, 586(14), 3325-3335.
- Dinet, V., Ansari, N., Torres-Farfan, C., & Korf, H. W. (2007). Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *Journal of pineal research*, 42(1), 83-91.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Strader, C. D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin, *Nature*. 321, 75-9.
- Don-Salu-Hewage, A. S., Chan, S. Y., McAndrews, K. M., Chetram, M. A., Dawson, M. R., Bethea, D. A., & Hinton, C. V. (2013). Cysteine (C)-xR receptor 4 undergoes transportin 1-dependent nuclear localization and remains functional at the nucleus of metastatic prostate cancer cells. *PloS one*, 8(2), e57194.
- Doolen, S., Krause, D. N., Dubocovich, M. L., & Duckles, S. P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *European journal of pharmacology*, 345(1), 67-69.
- Dowal, L., Sim, D. S., Dilks, J. R., Blair, P., Beaudry, S., Denker, B. M., ... & Flaumenhaft, R. (2011). Identification of an antithrombotic allosteric modulator that acts through helix 8 of PAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2951-2956.
- Downer, N. W. (1985b). Cross-linking of dark-adapted frog photoreceptor disk membranes. Evidence for monomeric rhodopsin. *Biophysical journal*, 47(3), 285.
- Downer, N. W., & Cone, R. A. (1985). Transient dichroism in photoreceptor membranes indicates that stable oligomers of rhodopsin do not form during excitation. *Biophysical journal*, 47(3), 277-284.
- Drag-Kozak, E., Epler, P., Luszczyk-Trojnar, E., Popek, W., & Rzasa, J. (2006). Effect of melatonin on dopamine secretion in the hypothalamus of mature female common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta ichthyologica et piscatoria*, 36(2), 135-141.
- Drake, M. T., Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2006). Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation research*, 99(6), 570-582.
- Drazen, D. L., & Nelson, R. J. (2001). Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology*, 74(3), 178-184.
- Drew, J. E., Barrett, P., Mercer, J. G., Moar, K. M., Canet, E., Delagrangé, P., & Morgan, P. J. (2001). Localization of the Melatonin-Related Receptor in the Rodent Brain and Peripheral Tissues. *Journal of neuroendocrinology*, 13(5), 453-458.
- Dubocovich, M. L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina.
- Dubocovich, M. L. (2007). Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep medicine*, 8, 34-42.

- Dubocovich, M. L., & Hensler, J. G. (1986). Modulation of [3H]-dopamine released by different frequencies of stimulation from rabbit retina. *British journal of pharmacology*, 88(1), 51-61.
- Dubocovich, M. L., Delagrangé, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., & Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological reviews*, 62(3), 343-380.
- Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-ghoul, W. M., Benloucif, S., & Masana, M. I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *The FASEB Journal*, 12(12), 1211-1220.
- Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B., & Monget, P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 105.
- Duncan, M. J. (2007). Circannual prolactin rhythms: calendar-like timer revealed in the pituitary gland. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(7), 259-260.
- Durroux, T. (2005). Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends in pharmacological sciences*, 26(7), 376-384.
- Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, Prézeau L.(2001) A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3236-41.
- Duvernoy, H. M., Parratte, B., Tatu, L., & Vuillier, F. (2000). The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurological research*, 22(8), 747-790.
- Ebisawa, T., Kajimura, N., Uchiyama, M., Katoh, M., Sekimoto, M., Watanabe, T., ... & Yamauchi, T. (1999). Allelic variants of human melatonin 1a receptor: function and prevalence in subjects with circadian rhythm sleep disorders. *Biochemical and biophysical research communications*, 262(3), 832-837.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., & Reppert, S. M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 6133-6137.
- Edvardsen, Ø., Reiersen, A. L., Beukers, M. W., & Kristiansen, K. (2002). tGRAP, the G-protein coupled receptors mutant database. *Nucleic acids research*, 30(1), 361-363.
- Egaña, L. A., Cuevas, R. A., Baust, T. B., Parra, L. A., Leak, R. K., Hochendoner, S., ... & Torres, G. E. (2009). Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *The Journal of Neuroscience*, 29(14), 4592-4604.
- Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., ... & Plückthun, A. (2014). Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201317903.
- Ehrlich, P. (1956) The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete
- Ehrlich, P. (1957) The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete
- Ekmekcioglu, C., Haslmayer, P., Philipp, C., Mehrabi, M. R., Glogar, H. D., Grimm, M., ... & Marktl, W. (2001). Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 21(1), 85-91.
- Ekmekcioglu, C., Thalhammer, T., Humpeler, S., Mehrabi, M. R., Glogar, H. D., Hölzenbein, T., ... & Marktl, W. (2003). The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *Journal of pineal research*, 35(1), 40-44.
- El Halawani, M. E., Kang, S. W., Leclerc, B., Kosonsiriluk, S., & Chaiseha, Y. (2009). Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus and their role as photoperiodic clocks. *General and comparative endocrinology*, 163(1), 123-127.
- El Qandil, S., Chakir, J., El Moussaouiti, R., Oukouchoud, R., Rami, N., Benjelloun, W. A., & Lakhdar-Ghazal, N. (2005). Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain research bulletin*, 64(5), 371-380.

- El-Sherif, Y., Tesoriero, J., Hogan, M. V., & Wieraszko, A. (2003). Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *Journal of neuroscience research*, 72(4), 454-460.
- Eriksen, J., Jørgensen, T. N., & Gether, U. (2010). Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *Journal of neurochemistry*, 113(1), 27-41.
- Eriksen, J., Rasmussen, S. G., Rasmussen, T. N., Vaegter, C. B., Cha, J. H., Zou, M. F., ... & Gether, U. (2009). Visualization of dopamine transporter trafficking in live neurons by use of fluorescent cocaine analogs. *The Journal of Neuroscience*, 29(21), 6794-6808.
- Escames, G., Macias, M., Leon, J., Garcia, J., Khaldy, H., Martin, M., ... & Acuña-Castroviejo, D. (2001). Calcium-Dependent Effects of Melatonin Inhibition of Glutamatergic Response in Rat Striatum. *Journal of neuroendocrinology*, 13(5), 459-466.
- Everett, P. B., & Senogles, S. E. (2010). D3 dopamine receptor signals to activation of phospholipase D through a complex with Rho. *Journal of neurochemistry*, 112(4), 963-971.
- Fagni, L., Worley, P. F., & Ango, F. (2002). Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Science Signaling*, 2002(137), re8.
- Fan, G. F., Shumay, E., Malbon, C. C., & Wang, H. Y. (2001). c-Src tyrosine kinase binds the β 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 13240-13247.
- Fan, G. F., Shumay, E., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (2001b). The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the β 2-adrenergic receptor via the receptor cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24005-24014.
- Farce, A., Chugunov, A. O., Logé, C., Sabaouni, A., Yous, S., Dilly, S., ... & Chavatte, P. (2008). Homology modeling of MT1 and MT2 receptors. *European journal of medicinal chemistry*, 43(9), 1926.
- Farr, C. D., Gafken, P. R., Norbeck, A. D., Doneanu, C. E., Stapels, M. D., Barofsky, D. F., ... & Saugstad, J. A. (2004). Proteomic analysis of native metabotropic glutamate receptor 5 protein complexes reveals novel molecular constituents. *Journal of neurochemistry*, 91(2), 438-450.
- Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L., & Khorana, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*, 274(5288), 768-770.
- Faust, R., Garratt, P. J., Jones, R., Yeh, L. K., Tsotinis, A., Panoussopoulou, M., ... & Sugden, D. (2000). Mapping the melatonin receptor. 6. Melatonin agonists and antagonists derived from 6 H-isoindolo [2, 1-a] indoles, 5, 6-dihydroindolo [2, 1-a] isoquinolines, and 6, 7-dihydro-5 H-benzo [c] azepino [2, 1-a] indoles. *Journal of medicinal chemistry*, 43(6), 1050-1061.
- Favero, G., Rodella, L. F., Reiter, R. J., & Rezzani, R. (2014). Melatonin and its atheroprotective effects: A review. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(2), 926-937.
- Ferrandon, S., Feinstein, T. N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J. T., ... & Villardaga, J. P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nature chemical biology*, 5(10), 734-742.
- Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein protein interactions.
- Finley, M. J., Chen, X., Bardi, G., Davey, P., Geller, E. B., Zhang, L., ... & Rogers, T. J. (2008). Bi-directional heterologous desensitization between the major HIV-1 co-receptor CXCR4 and the κ -opioid receptor. *Journal of neuroimmunology*, 197(2), 114-123.
- Fornasiero, E. F., Raimondi, A., Guarnieri, F. C., Orlando, M., Fesce, R., Benfenati, F., & Valtorta, F. (2012). Synapsins contribute to the dynamic spatial organization of synaptic vesicles in an activity-dependent manner. *The Journal of Neuroscience*, 32(35), 12214-12227.
- Foster, J. D., Pananusorn, B., & Vaughan, R. A. (2002). Dopamine transporters are phosphorylated on N-terminal serines in rat striatum. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25178-25186.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., & Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 421(6919), 127-128.

- Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J. C., Hamon, M., Giros, B., ... & Martres, M. P. (2012). The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *Journal of neurochemistry*, 121(1), 99-114.
- Francesconi, A., & Duvoisin, R. M. (2002). Alternative splicing unmasking dendritic and axonal targeting signals in metabotropic glutamate receptor 1. *The Journal of neuroscience*, 22(6), 2196-2205.
- Francesconi, A., Kumari, R., & Suzanne Zukin, R. (2009). Proteomic analysis reveals novel binding partners of metabotropic glutamate receptor 1. *Journal of neurochemistry*, 108(6), 1515-1525.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1256-1272.
- Fredriksson, R., Nordström, K. J., Stephansson, O., Hägglund, M. G., & Schiöth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS letters*, 582(27), 3811-3816.
- Fritz, J. M., Dong, M., Apsley, K. S., Martin, E. P., Na, C. L., Sitaraman, S., & Weaver, T. E. (2013). Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Molecular biology of the cell*, mbc-E13.
- Fu, Z., R Gilbert, E., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), 25-53.
- Fujieda, H., Scher, J., Hamadanizadeh, S. A., Wankiewicz, E., Pang, S. F., & Brown, G. M. (1999). Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mtl melatonin receptor in guinea pig retina. *Visual neuroscience*, 17(1), 63-70.
- Fukuda, M. (2013). Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic*, 14(9), 949-963.
- Fusar-Poli, P., & Meyer-Lindenberg, A. (2013). Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, part I: meta-analysis of dopamine active transporter (DAT) density. *Schizophrenia bulletin*, 39(1), 22-32.
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of pineal research*, 51(1), 1-16.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., ... & Pin, J. P. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *The EMBO journal*, 20(9), 2152-2159.
- Galvez, T., Prézeau, L., Milioti, G., Franek, M., Joly, C., Froestl, W., ... & Pin, J. P. (2000). Mapping the Agonist-binding Site of GABAB Type 1 Subunit Sheds Light on the Activation Process of GABAB Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 41166-41174.
- Gardner, L. A., Naren, A. P., & Bahouth, S. W. (2007). Assembly of an SAP97-AKAP79-cAMP-dependent protein kinase scaffold at the type 1 PSD-95/DLG/ZO1 motif of the human β 1-adrenergic receptor generates a receptosome involved in receptor recycling and networking. *Journal of biological chemistry*, 282(7), 5085-5099.
- Gauer, F., Masson-Pevet, M., Stehle, J., & Pevet, P. (1994). Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain research*, 641(1), 92-98.
- Gavarini, S., Bécamel, C., Altier, C., Lory, P., Poncet, J., Wijnholds, J., ... & Marin, P. (2006). Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability. *Molecular biology of the cell*, 17(11), 4619-4631.
- Ge, X., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2009). μ -Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with ribophorin I. *Molecular pharmacology*, 75(6), 1307-1316.
- Geary, G. G., Krause, D. N., & Duckles, S. P. (1997). Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273(3), H1530-H1536.
- Gerdin, M. J., Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (2004b). Melatonin-mediated regulation of human MT₁ melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochemical pharmacology*, 67(11), 2023-2030.

- Gerdin, M. J., Masana, M. I., Rivera-Bermudez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2004a). Melatonin desensitizes endogenous MT₂ melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *The FASEB journal*, 18(14), 1646-1656.
- Gerdin, M. J., Mseeh, F., & Dubocovich, M. L. (2003). Mutagenesis studies of the human MT₂ melatonin receptor. *Biochemical pharmacology*, 66(2), 315-320.
- German, C. L., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2012). Amphetamine and methamphetamine reduce striatal dopamine transporter function without concurrent dopamine transporter relocalization. *Journal of neurochemistry*, 123(2), 288-297
- Ghanouni, P., Gryczynski, Z., Steenhuis, J. J., Lee, T. W., Farrens, D. L., Lakowicz, J. R., & Kobilka, B. K. (2001). Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the β 2Adrenergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24433-24436.
- Gillette, M. U., Medanic, M., McArthur, A. J., Liu, C., Ding, J. M., Faiman, L. E., ... & Gallman, E. A. (1995, January). Intrinsic neuronal rhythms in the suprachiasmatic nuclei and their adjustment. In *Ciba Foundation Symposium 183-Circadian Clocks and their Adjustment* (pp. 134-153). John Wiley & Sons, Ltd..
- Gimenez, L. E., Vishnivetskiy, S. A., Baameur, F., & Gurevich, V. V. (2012). Manipulation of very few receptor discriminator residues greatly enhances receptor specificity of non-visual arrestins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29495-29505.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996 Feb 15;379(6566):606-12.
- Giros, B. R. U. N. O., el Mestikawy, S. A. L. A. H., Godinot, N. A. T. H. A. L. I. E., Zheng, K. E. Q. I. N., Han, H. O. N. G., Yang-Feng, T. E. R. E. S. A., & Caron, M. G. (1992). Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Molecular Pharmacology*, 42(3), 383-390.
- Giusti, P., Lipartiti, M., Franceschini, D. A. V. I. D. E., Schiavo, N., Floreani, M., & Manev, H. (1996). Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *The FASEB journal*, 10(8), 891-896.
- Glenister, R., McDaniel, K., Francis, H., Venter, J., Jensen, K., Dusio, G., ... & Alpini, G. (2013). Therapeutic actions of melatonin on gastrointestinal cancer development and progression. *Translational gastrointestinal cancer*, 2(1).
- González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Moralí, G., & Cervantes, M. (2007). Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neuroscience letters*, 423(2), 162-166.
- González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., ... & Sealfon, S. C. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452(7183), 93-97.
- Gorentla, B. K., Moritz, A. E., Foster, J. D., & Vaughan, R. A. (2009). Proline-Directed Phosphorylation of the Dopamine Transporter N-Terminal Domain†. *Biochemistry*, 48(5), 1067-1076.
- Gorny, X., Mikhaylova, M., Seeger, C., Reddy, P. P., Reissner, C., Schott, B. H., ... & Seidenbecher, C. (2012). AKAP79/150 interacts with the neuronal calcium-binding protein caldendrin. *Journal of neurochemistry*, 122(4), 714-726.
- Goupil, E., Laporte, S. A., & Hébert, T. E. (2013). GPCR heterodimers: asymmetries in ligand binding and signalling output offer new targets for drug discovery. *British journal of pharmacology*, 168(5), 1101-1103.
- Grace, M. S., Cahill, G. M., & Besharse, J. C. (1991). Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain research*, 559(1), 56-63.
- Grånäs, C., Ferrer, J., Loland, C. J., Javitch, J. A., & Gether, U. (2003). N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4990-5000.
- Gu, H., Wall, S. C., & Rudnick, G. (1994). Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7124-7130.

- Gubitza, A. K., & Reppert, S. M. (2000). Chimeric and Point-Mutated Receptors Reveal That a Single Glycine Residue in Transmembrane Domain 6 Is Critical for High Affinity Melatonin Binding 1. *Endocrinology*, 141(3), 1236-1244.
- Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., ... & Jockers, R. (2008). The PDZ protein muppl promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16762-16771.
- Gül, Ş., Çelik, S. E., Kalaycı, M., Taşyürekli, M., Çokar, N., & Bilge, T. (2005). Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimental spinal cord injury in rats. *Surgical neurology*, 64(4), 355-361.
- Guo, W., Shi, L., & Javitch, J. A. (2003). The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4385-4388.
- Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J. C., Shi, L., Filizola, M., & Javitch, J. A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *The EMBO journal*, 27(17), 2293-2304.
- Guptaroy, B., Zhang, M., Bowton, E., Binda, F., Shi, L., Weinstein, H., ... & Gnegy, M. E. (2009). A juxtamembrane mutation in the N terminus of the dopamine transporter induces preference for an inward-facing conformation. *Molecular pharmacology*, 75(3), 514-524.
- Hamouda, H. O., Chen, P., Levoye, A., Sözer-Topçular, N., Daulat, A. M., Guillaume, J. L., ... & Maurice, P. (2007). Detection of the human GPR50 orphan seven transmembrane protein by polyclonal antibodies mapping different epitopes. *Journal of pineal research*, 43(1), 10-15.
- Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B., & Schubert, C. (2001). Crystal structure of β -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure*, 9(9), 869-880.
- Han, Y., Moreira, I. S., Urizar, E., Weinstein, H., & Javitch, J. A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nature chemical biology*, 5(9), 688-695.
- Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell and tissue research*, 309(1), 73-88.
- Hanyaloglu, A. C., & Zastrow, M. V. (2008). Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48, 537-568.
- Haque, R., Ali, F. G., Biscoglia, R., Abey, J., Weller, J., Klein, D., & Iuvone, P. M. (2010). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the circadian oscillation of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in chicken cone photoreceptors. *Journal of neurochemistry*, 113(5), 1296-1306.
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of pineal research*, 34(4), 233-241.
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin—a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in neurobiology*, 93(3), 350-384.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., & Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(3), 313-316.
- Hargrave PA, McDowell JH, Curtis DR, Wang JK, Juszczak E, Fong SL, Rao JK, Argos P.(1983) The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech.* 1983;9(4):235-44.
- Harkins, A. B., Cahill, A. L., Powers, J. F., Tischler, A. S., & Fox, A. P. (2004). Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type (CaV2. 2) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15219-15224.
- Harmor, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*, 2(12), 3013-1.
- Hasdemir, B., Bunnett, N. W., & Cottrell, G. S. (2007). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. *Journal of biological chemistry*, 282(40), 29646-29657.
- Hasseldine, A. R. G., Harper, E. A., & Black, J. W. (2003). Cardiac-specific overexpression of human β 2 adrenoceptors in mice exposes coupling to both Gs and Gi proteins. *British journal of pharmacology*, 138(7), 1358-1366.

- Havlickova, M., Prezeau, L., Duthey, B., Bettler, B., Pin, J. P., & Blahos, J. (2002). The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric γ -aminobutyrate B receptor. *Molecular pharmacology*, 62(2), 343-350.
- Hayashi, M. K., Ames, H. M., & Hayashi, Y. (2006). Tetrameric hub structure of postsynaptic scaffolding protein homer. *The Journal of neuroscience*, 26(33), 8492-8501.
- He, J., Bellini, M., Inuzuka, H., Xu, J., Xiong, Y., Yang, X., ... & Hall, R. A. (2006). Proteomic analysis of β 1-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2820-2827.
- He, S. Q., Zhang, Z. N., Guan, J. S., Liu, H. R., Zhao, B., Wang, H. B., ... & Zhang, X. (2011). Facilitation of μ -opioid receptor activity by preventing δ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron*, 69(1), 120-131.
- Hebert, D., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological Review*, 87(4), 1377-1408.
- Heng, B. C., Aubel, D., & Fussenegger, M. (2013). An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1676-1694.
- Hern, J. A., Baig, A. H., Mashanov, G. I., Birdsall, B., Corrie, J. E., Lazareno, S., ... & Birdsall, N. J. (2010). Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2693-2698.
- Hernanz-Falc3n, P., Rodr3guez-Frade, J. M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S. F., ... & Mellado, M. (2004). Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nature immunology*, 5(2), 216-223.
- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Cowan, A., & Mazurkiewicz, J. E. (2013). Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis of Serotonin, Adrenergic, Muscarinic, and Dopamine Receptor Dimerization: The Oligomer Number Puzzle. *Molecular pharmacology*, 84(4), 630-642.
- Herrick-Davis, K., Weaver, B. A., Grinde, E., & Mazurkiewicz, J. E. (2006). Serotonin 5-HT_{2C} Receptor Homodimer Biogenesis in the Endoplasmic Reticulum REAL-TIME VISUALIZATION WITH CONFOCAL FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER. *Journal of biological chemistry*, 281(37), 27109-27116.
- Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H., & Levey, A. I. (1997). Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *Journal of Comparative Neurology*, 388(2), 211-227.
- Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), 141-172.
- Higy, M., Junne, T., & Spiess, M. (2004). Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 43(40), 12716-12722.
- Hill M, S., Cheng, C., Yuan, L., Mao, L., Jockers, R., Dauchy, B., & E Blask, D. (2013). Age-related decline in melatonin and its MT1 receptor are associated with decreased sensitivity to melatonin and enhanced mammary tumor growth. *Current aging science*, 6(1), 125-133.
- Hill, S. J., & Baker, J. G. (2003). The ups and downs of Gs-to Gi-protein switching. *British journal of pharmacology*, 138(7), 1188-1189.
- Hill, S., Cheng, C., Yuan, L., Mao, L., Jockers, R., Dauchy, B., & E Blask, D. (2013). Age-related decline in melatonin and its MT1 receptor are associated with decreased sensitivity to melatonin and enhanced mammary tumor growth. *Current aging science*, 6(1), 125-133.
- Hipser, C., Bushlin, I., Gupta, A., Gomes, I., & Devi, L. A. (2010). Role of Antibodies in Developing Drugs That Target G-Protein-Coupled Receptor Dimers. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(4), 374-380.
- Hirasawa, H., Betensky, R. A., & Raviola, E. (2012). Corelease of dopamine and GABA by a retinal dopaminergic neuron. *The Journal of Neuroscience*, 32(38), 13281-13291.
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M. W., H3rsch, S., Bairoch, A., Chen, W., ... & Vriend, G. (1998). GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 275-279.

- Hosaka, M., Hammer, R. E., & Südhof, T. C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron*, 24(2), 377-387.
- Hou, Y., Azpiazu, I., Smrcka, A., & Gautam, N. (2000). Selective role of G protein γ subunits in receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 38961-38964.
- Houndolo, T., Boulay, P. L., & Claing, A. (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5598-5604.
- Howell, L. L., & Kimmel, H. L. (2008). Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochemical pharmacology*, 75(1), 196-217.
- Huang, H., Lee, S. C., & Yang, X. L. (2005). Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina. *The Journal of physiology*, 569(3), 857-871.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J. J., & Huang, X. Y. (2013). Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nature structural & molecular biology*, 20(4), 419-425.
- Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(1), C110-C118.
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., & Grant, S. G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature neuroscience*, 3(7), 661-669.
- Ilouz, N., Branski, L., Parnis, J., Parnas, H., & Linial, M. (1999). Depolarization affects the binding properties of muscarinic acetylcholine receptors and their interaction with proteins of the exocytic apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29519-29528.
- Imbesi, M., Uz, T., & Manev, H. (2008). Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *Journal of neural transmission*, 115(11), 1495-1499.
- Ingham, C. A., Hood, S. H., Taggart, P., & Arbuthnott, G. W. (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *The Journal of neuroscience*, 18(12), 4732-4743.
- Ingi, T., Krumins, A. M., Chidiac, P., Brothers, G. M., Chung, S., Snow, B. E., ... & Worley, P. F. (1998). Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *The Journal of neuroscience*, 18(18), 7178-7188.
- Isberg, V., Vroling, B., van der Kant, R., Li, K., Vriend, G., & Gloriam, D. (2014). GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic acids research*, 42(D1), D422-D425.
- Ishibashi, K., Oda, K., Ishiwata, K., & Ishii, K. (2014). Comparison of dopamine transporter decline in a patient with Parkinson's disease and normal aging effect. *Journal of the neurological sciences*.
- Ivanova, E. A., Bechtold, D. A., Dupré, S. M., Brennand, J., Barrett, P., Luckman, S. M., & Loudon, A. S. (2008). Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(1), E176-E182.
- Izzo, G., Francesco, A., Ferrara, D., Campitiello, M. R., Serino, I., Minucci, S., & d'Istria, M. (2010). Expression of melatonin (MT1, MT2) and melatonin-related receptors in the adult rat testes and during development. *Zygote*, 18(03), 257-264.
- Jackson, C. R., Chaurasia, S. S., Zhou, H., Haque, R., Storm, D. R., & Iuvone, P. M. (2009). Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *Journal of neurochemistry*, 109(1), 148-157.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-Protein-Coupled Receptor Target Family. *ChemMedChem*, 1(8), 760-782.
- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201-207.
- Janovick, J. A., Brothers, S. P., Cornea, A., Bush, E., Goulet, M. T., Ashton, W. T., ... & Michael Conn, P. (2007). Refolding of misfolded mutant GPCR: Post-translational pharmacoperone action< i> in vitro</i>. *Molecular and cellular endocrinology*, 272(1), 77-85.

- Jarzynka, M. J., Passey, D. K., Ignatius, P. F., Melan, M. A., Radio, N. M., Jockers, R., ... & Witt-Enderby, P. A. (2006). Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules. *Journal of pineal research*, 41(4), 324-336.
- Jaworek, J., & Leja-Szpak, A. (2013). Melatonin influences pancreatic cancerogenesis. *Histology and histopathology*.
- Jean-Alphonse, F., Bowersox, S., Chen, S., Beard, G., Puthenveedu, M. A., & Hanyaloglu, A. C. (2014). Spatially restricted G protein-coupled receptor activity via divergent endocytic compartments. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.
- Jia, X. S., & Dermot, M. F. (2013). AKAP79, PKC, PKA and PDE4 participate in a Gq-linked muscarinic receptor and adenylate cyclase 2 cAMP signalling complex. *Biochemical Journal*, 455(1), 47-56.
- Jiang, H., Jiang, Q., & Feng, J. (2004). Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54380-54386.
- Jin, X., Von Gall, C., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., Stehle, J. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2003). Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. *Molecular and cellular biology*, 23(3), 1054-1060.
- Johnson, R. F., Moore, R. Y., & Morin, L. P. (1988). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain research*, 460(2), 297-313.
- Johnston, J. M., Wang, H., Provasi, D., & Filizola, M. (2012). Assessing the relative stability of dimer interfaces in g protein-coupled receptors. *PLoS computational biology*, 8(8), e1002649.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 4029-4034.
- Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., & Devi, L. A. (2001). Oligomerization of opioid receptors with β 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 343-348.
- Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeyssen, S., Hong, W., ... & Bockaert, J. (2004). New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT4 (a) receptor splice variant: roles in receptor targeting. *Journal of cell science*, 117(22), 5367-5379.
- Kaech, S., Fischer, M., Doll, T., & Matus, A. (1997). Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *The Journal of neuroscience*, 17(24), 9565-9572.
- Kamal, M., & Jockers, R. (2011). Biological significance of GPCR heteromerization in the neuro-endocrine system. *Frontiers in endocrinology*, 2.
- Kammermeier, P. J., & Ikeda, S. R. (1999). Expression of RGS2 Alters the Coupling of Metabotropic Glutamate Receptor 1a to M-Type K^{+} and N-Type Ca^{2+} Channels. *Neuron*, 22(4), 819-829.
- Kammermeier, P. J., Xiao, B., Tu, J. C., Worley, P. F., & Ikeda, S. R. (2000). Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *The Journal of Neuroscience*, 20(19), 7238-7245.
- Kandola, M. K., Sykes, L., Lee, Y. S., Johnson, M. R., Hanyaloglu, A. C., & Bennett, P. R. (2013). EP2 Receptor Activates Dual G Protein Signaling Pathways that Mediate Contrasting Proinflammatory and Relaxatory Responses in Term Pregnant Human Myometrium. *Endocrinology*, 155(2), 605-617.
- Kaneko, S., Cooper, C. B., Nishioka, N., Yamasaki, H., Suzuki, A., Jarvis, S. E., ... & Zamponi, G. W. (2002). Identification and characterization of novel human Cav2. 2 (α 1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site. *The Journal of neuroscience*, 22(1), 82-92.
- Kang, S. W., Thayananuphat, A., Bakken, T., & El Halawani, M. E. (2007). Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction. *Neuroscience*, 150(1), 223-233.
- Karamitri, A., Renault, N., Clement, N., Guillaume, J. L., & Jockers, R. (2013). Minireview: Toward the Establishment of a Link between Melatonin and Glucose Homeostasis: Association of Melatonin MT2 Receptor Variants with Type 2 Diabetes. *Molecular Endocrinology*, 27(8), 1217-1233.
- Karasek, M., & Winczyk, K. (2006). Melatonin in humans. *Journal of physiology and pharmacology*, 57, 19.

- Karin, M., Liu, Z. G., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology*, 9(2), 240-246.
- Kasai RS, Suzuki KG, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, Kusumi A.(2011) Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol.* 2011 Feb 7;192(3):463-80.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in pharmacological sciences*, 33(1), 17-27.
- Kaur, C., & Ling, E. A. (2008). Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Current medicinal chemistry*, 15(29), 3068-3080.
- Kaye, R. G., Saldanha, J. W., Lu, Z. L., & Hulme, E. C. (2011). Helix 8 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: scanning mutagenesis delineates a G protein recognition site. *Molecular pharmacology*, 79(4), 701-709.
- Kelestimur, H., Ozcan, M., Kacar, E., Alcin, E., Yilmaz, B., & Ayar, A. (2012). Melatonin elicits protein kinase C-mediated calcium response in immortalized GT1-7 GnRH neurons. *Brain research*, 1435, 24-28.
- Kenakin, T. (1995). Pharmacological proteus?. *Trends in pharmacological sciences*, 16(8), 256-258.
- Kenakin, T. (1995b). Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals. *Trends in pharmacological sciences*, 16(7), 232-238.
- Kerlavage, A. R., Fraser, C. M., Chung, F. Z., & Venter, J. C. (1986). Molecular structure and evolution of adrenergic and cholinergic receptors. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1(4), 287-301.
- Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J. P., Labbé, J. C., ... & Hébert, T. E. (2013). The Expanding Roles of Gβγ Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological reviews*, 65(2), 545-577.
- Khanna, R., Zougman, A., & Stanley, E. F. (2007). A proteomic screen for presynaptic terminal N-type calcium channel (CaV2. 2) binding partners. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 40(3), 302-314.
- Khoshbouei, H., Sen, N., Guptaroy, B., Johnson, L. A., Lund, D., Gnegy, M. E., ... & Javitch, J. A. (2004). N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. *PLoS biology*, 2(3), e78.
- Kile, B. M., Guillot, T. S., Venton, B. J., Wetsel, W. C., Augustine, G. J., & Wightman, R. M. (2010). Synapsins differentially control dopamine and serotonin release. *The Journal of Neuroscience*, 30(29), 9762-9770.
- Kilic, Ü., Kilic, E., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., & Hermann, D. M. (2005). Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of pineal research*, 38(1), 67-71.
- Kim, J. H., Cho, E. Y., Min, C., Park, J. H., & Kim, K. M. (2008). Characterization of functional roles of DRY motif in the 2nd intracellular loop of dopamine D2 and D3 receptors. *Archives of pharmacal research*, 31(4), 474-481.
- Kim, T. D., Woo, K. C., Cho, S., Ha, D. C., Jang, S. K., & Kim, K. T. (2007). Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production. *Genes & development*, 21(7), 797-810.
- Kino, T., Kozasa, T., & Chrousos, G. P. (2005). Statin-induced blockade of prenylation alters nucleocytoplasmic shuttling of GTP-binding proteins γ2 and β2 and enhances their suppressive effect on glucocorticoid receptor transcriptional activity. *European journal of clinical investigation*, 35(8), 508-513.
- Kirchberg, K., Kim, T. Y., Möller, M., Skegro, D., Raju, G. D., Granzin, J., ... & Alexiev, U. (2011). Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), 18690-18695.
- Kisilevsky, A. E., & Zamponi, G. W. (2008). Presynaptic calcium channels: structure, regulators, and blockers. In *Pharmacology of Neurotransmitter Release* (pp. 45-75). Springer Berlin Heidelberg.
- Kisilevsky, A. E., & Zamponi, G. W. (2008b). D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels*, 2(4), 1-8.

- Klabunde, T., & Hessler, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem*, 3(10), 928-944.
- Klemmer, P., Smit, A. B., & Li, K. W. (2009). Proteomics analysis of immuno-precipitated synaptic protein complexes. *Journal of proteomics*, 72(1), 82-90.
- Klingenberg, M. (1981). Membrane protein oligomeric structure and transport function. *Nature*, 290(5806), 449-454.
- Kloda, A., & Adams, D. J. (2005). Voltage-dependent inhibition of recombinant NMDA receptor-mediated currents by 5-hydroxytryptamine. *British journal of pharmacology*, 144(3), 323-330.
- Kobayashi, H., Ogawa, K., Yao, R., Lichtarge, O., & Bouvier, M. (2009). Functional Rescue of β 1-Adrenoceptor Dimerization and Trafficking by Pharmacological Chaperones. *Traffic*, 10(8), 1019-1033.
- Koch, M., Mauhin, V., Stehle, J. H., Schomerus, C., & Korf, H. W. (2003). Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *Journal of neurochemistry*, 85(1), 170-179.
- Kokkola, T., Salo, O. M., Poso, A., & Laitinen, J. T. (2005). The functional role of cysteines adjacent to the NRY motif of the human MT1 melatonin receptor. *Journal of pineal research*, 39(1), 1-11.
- Korkmaz, A., Ma, S., Topal, T., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Glucose: a vital toxin and potential utility of melatonin in protecting against the diabetic state. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(2), 128-137.
- Kostenis, E., Martini, L., Ellis, J., Waldhoer, M., Heydorn, A., Rosenkilde, M. M., ... & Milligan, G. (2005). A highly conserved glycine within linker I and the extreme C terminus of G protein α subunits interact cooperatively in switching G protein-coupled receptor-to-effector specificity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 78-87.
- Kotowski, S. J., Hopf, F. W., Seif, T., Bonci, A., & von Zastrow, M. (2011). Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron*, 71(2), 278-290.
- Krishnan, A., Almén, M. S., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2012). The origin of GPCRs: identification of mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in fungi. *PLoS one*, 7(1), e29817.
- Kristensen, A. S., Andersen, J., Jørgensen, T. N., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, C. J., ... & Gether, U. (2011). SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacological reviews*, 63(3), 585-640.
- Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics*, 103(1), 21-80.
- Kuwasako, K., Kitamura, K., Nagata, S., Hikosaka, T., & Kato, J. (2011). Structure–function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor. *Peptides*, 32(1), 144-149.
- Kuwasako, K., L Hay, D., Nagata, S., Murakami, M., Kitamura, K., & Kato, J. (2013). Functions of third extracellular loop and Helix 8 of Family B GPCRs complexed with RAMPs and characteristics of their receptor trafficking. *Current Protein and Peptide Science*, 14(5), 416-428.
- Labasque, M., Reiter, E., Becamel, C., Bockaert, J., & Marin, P. (2008). Physical interaction of calmodulin with the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Molecular biology of the cell*, 19(11), 4640-4650.
- Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M. A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., ... & Landry, M. (2012). Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *The EMBO Journal*, 31(15), 3239-3251.
- Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 7(4), 339-357.
- Lai, F. P., Mody, S. M., Yung, L. Y., Kam, J. Y., Pang, C. S., Pang, S. F., & Wong, Y. H. (2002). Molecular determinants for the differential coupling of G α 16 to the melatonin MT1, MT2 and Xenopus Mel1c receptors. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 736-745.
- Lambert, N. A. (2010). GPCR dimers fall apart. *Science Signaling*, 3(115), pe12.

- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., & Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein.
- Lanctot, P. X., Leclerc, P. X., Clément, M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. X. (2005). Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem. J.*, 390, 367-376.
- Lanfumey, L., Mongeau, R., & Hamon, M. (2013). Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments. *Pharmacology & therapeutics*, 138(2), 176-184.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23120-23126.
- Larson, J., Jessen, R. E., Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., & Manev, H. (2006). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT₂ receptor-deficient mice. *Neuroscience letters*, 393(1), 23-26.
- Lasiecka, Z. M., Yap, C. C., Vakulenko, M., & Winckler, B. (2008). Compartmentalizing the Neuronal Plasma Membrane: From Axon Initial Segments to Synapses. *International review of cell and molecular biology*, 272, 303-389.
- Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K., & Filipek, S. (2012). G protein-coupled receptors-recent advances. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 515-529.
- Laudon, M., & Zisapel, N. (1986). Characterization of central melatonin receptors using ¹²⁵I-melatonin. *FEBS letters*, 197(1), 9-12.
- Laudon, M., Nir, I., & Zisapel, N. (1988). Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. *Neuroendocrinology*, 48(6), 577-583.
- Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G., & Tate, C. G. (2011). Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*, 474(7352), 521-525.
- Leclerc, P. C., Auger-Messier, M., Lanctot, P. M., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (2002). A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology*, 143(12), 4702-4710.
- Lee, C. H., Choi, J. H., Yoo, K. Y., Park, O. K., Hwang, I. K., You, S. G., ... & Won, M. H. (2010). MT2 melatonin receptor immunoreactivity in neurons is very high in the aged hippocampal formation in gerbils. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(2), 255-263.
- Lee, D. K., Lança, A. J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X. D., Gobeil, F., ... & O'Dowd, B. F. (2004). Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7901-7908.
- Lee, F. J., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P. J., & Liu, F. (2007). Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *The EMBO journal*, 26(8), 2127-2136.
- Lee, K. H., Kim, M. Y., Kim, D. H., & Lee, Y. S. (2004b). Syntaxin 1A and receptor for activated C kinase interact with the N-terminal region of human dopamine transporter. *Neurochemical research*, 29(7), 1405-1409.
- Lefkowitz, R. J. (2000). The superfamily of heptahelical receptors. *Nature cell biology*, 2(7), E133-E136.
- Leger, D., Guilleminault, C., Defrance, R., Domont, A., & Paillard, M. (1996). Blindness and sleep patterns. *The Lancet*, 348(9030), 830-831.
- Legros, C., Matthey, U., Grelak, T., Pedragona-Moreau, S., Hassler, W., Yous, S., ... & Boutin, J. A. (2013a). New radioligands for describing the molecular pharmacology of MT1 and MT2 melatonin receptors. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 8948-8962.
- Legros, C., Matthey, U., Grelak, T., Pedragona-Moreau, S., Hassler, W., Yous, S., ... & Boutin, J. A. (2013b). New radioligands for describing the molecular pharmacology of MT1 and MT2 melatonin receptors. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 8948-8962.

- Leidenheimer, N. J., & Ryder, K. G. (2014). Pharmacological Chaperoning: A Primer on Mechanism and Pharmacology. *Pharmacological Research*.
- Leone, A. M., Francis, P., & Silman, R. E. (1987). The isolation, purification, and characterisation of the principal urinary metabolites of melatonin. *Journal of pineal research*, 4(3), 253-266.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587.
- Leveque, C., el Far, O. U. S. S. A. M. A., Martin-Moutot, N., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M., & Seagar, M. J. (1994). Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6306-6312.
- Leviel, V. (2011). Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences. *Journal of neurochemistry*, 118(4), 475-489.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L., Couturier, C., Delagrang, P., & Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *The EMBO journal*, 25(13), 3012-3023.
- Lezcano, N., Mrzljak, L., Eubanks, S., Levenson, R., Goldman-Rakic, P., & Bergson, C. (2000). Dual signaling regulated by calcyon, a D1 dopamine receptor interacting protein. *Science*, 287(5458), 1660-1664.
- Li, B., Zhong, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2004b). Functional role of a C-terminal Gβγ-binding domain of Cav2. 2 channels. *Molecular pharmacology*, 66(3), 761-769.
- Li, J. G., Benovic, J. L., & Liu-Chen, L. Y. (2000). Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human κ-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Molecular pharmacology*, 58(4), 795-801.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., & Stanley, E. F. (2004). A syntaxin 1, Gao, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *The Journal of neuroscience*, 24(16), 4070-4081.
- Li, X., Nooh, M. M., & Bahouth, S. W. (2013). Role of AKAP79/150 Protein in β1-Adrenergic Receptor Trafficking and Signaling in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33797-33812.
- Li, Y. (2011). The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnology letters*, 33(8), 1487-1499.
- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D. A., Palczewski, K., & Engel, A. (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21655-21662.
- Liggett, S. B., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Hnatowich, M. (1991). Coupling of a mutated form of the human beta 2-adrenergic receptor to Gi and Gs. Requirement for multiple cytoplasmic domains in the coupling process. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), 4816-4821.
- Limbird, L. E., & Lefkowitz, R. J. (1976). Negative cooperativity among beta-adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 5007-5014.
- Lin, L., Huang, Q. X., Yang, S. S., Chu, J., Wang, J. Z., & Tian, Q. (2013). Melatonin in Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14575-14593.
- Lincoln, G. A., & Clarke, I. J. (1994). Photoperiodically-Induced Cycles in the Secretion of Prolactin in Hypothalamo-Pituitary Disconnected Rams: Evidence for Translation of the Melatonin Signal in the Pituitary Gland. *Journal of neuroendocrinology*, 6(3), 251-260.
- Linial, M., Ilouz, N., & Parnas, H. (1997). Voltage-Dependent Interaction Between the Muscarinic ACh Receptor and Proteins of the Exocytic Machinery. *The Journal of physiology*, 504(2), 251-258.
- Lipartiti, M., Franceschini, D., Zanoni, R., Gusella, M., Giusti, P., Cagnoli, C. M., ... & Manev, H. (1996). Neuroprotective effects of melatonin. In *Recent Advances in Tryptophan Research* (pp. 315-321). Springer US.
- Liu, C., Fukuhara, C., Wessel III, J. H., Iuvone, P. M., & Tosini, G. (2004). Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell and tissue research*, 315(2), 197-201.

- Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., & Reppert, S. M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, *19*(1), 91-102.
- Liu, Y., Xu, X. H., Chen, Q., Wang, T., Deng, C. Y., Song, B. L., ... & Luo, Z. G. (2013). Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development. *Nature communications*, *4*.
- Logue, S. F., Grauer, S. M., Paulsen, J., Graf, R., Taylor, N., Sung, M. A., ... & Pausch, M. (2009). The orphan GPCR, GPR88, modulates function of the striatal dopamine system: A possible therapeutic target for psychiatric disorders?. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *42*(4), 438-447.
- Lohse, M. J. (2010). Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Current opinion in pharmacology*, *10*(1), 53-58.
- Lohse, M. J., Maiellaro, I., & Calebiro, D. (2014). Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation. *Current Opinion in Cell Biology*, *27*, 87-93.
- Lohse, M. J., Nuber, S., & Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacological reviews*, *64*(2), 299-336.
- Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Pediani, J. D., & Milligan, G. (2007). The $\alpha 1b$ -adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Molecular pharmacology*, *71*(4), 1015-1029.
- Lundius, E. G., Vukojevic, V., Hertz, E., Stroth, N., Cederlund, A., Hiraiwa, M., ... & Svenningsson, P. (2013). GPR37 Trafficking to the Plasma Membrane Regulated by Prosaposin and GM1 Gangliosides Promotes Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.
- Lupi, R., Dani, N., Dietrich, A., Marchegiani, A., Turacchio, S., Berrie, C., ... & Girolamo, M. (2002). Endogenous mono-ADP-ribosylation of the free G $\beta\gamma$ prevents stimulation of phosphoinositide 3-kinase- γ and phospholipase C- $\beta 2$ and is activated by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J*, *367*, 825-832.
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*, *115*(3), 455-465.
- Lyssenko, V., Nagorny, C. L., Erdos, M. R., Wierup, N., Jonsson, A., Spégel, P., ... & Groop, L. (2009). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature genetics*, *41*(1), 82-88.
- Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J., & Thomas, D. Y. (2010). Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 21, No. 5, pp. 500-511). Academic Press.
- Maeda, A., Okano, K., Park, P. S. H., Lem, J., Crouch, R. K., Maeda, T., & Palczewski, K. (2010). Palmitoylation stabilizes unliganded rod opsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(18), 8428-8433.
- Makino, C. L., Wen, X. H., Michaud, N. A., Covington, H. I., DiBenedetto, E., Hamm, H. E., ... & Caruso, G. (2012). Rhodopsin expression level affects rod outer segment morphology and photoresponse kinetics. *PLoS one*, *7*(5), e37832.
- Malpoux, B., Migaud, M., Tricoire, H., & Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of biological rhythms*, *16*(4), 336-347.
- Malpoux, B., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, *39*(3), 355-366.
- Mamillapalli, R., VanHouten, J., Zawalich, W., & Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *Journal of biological chemistry*, *283*(36), 24435-24447.
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., ... & Granier, S. (2012). Crystal structure of the [micro]-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, *485*(7398), 321-326.

- Mao, L., Yang, L., Arora, A., Choe, E. S., Zhang, G., Liu, Z., ... & Wang, J. Q. (2005b). Role of protein phosphatase 2A in mGluR5-regulated MEK/ERK phosphorylation in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12602-12610.
- Mao, L., Yang, L., Tang, Q., Samdani, S., Zhang, G., & Wang, J. Q. (2005). The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *The Journal of neuroscience*, 25(10), 2741-2752.
- Marazziti, D., Mandillo, S., Di Pietro, C., Golini, E., Matteoni, R., & Tocchini-Valentini, G. P. (2007). GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9846-9851.
- Marchese, A., Paing, M. M., Temple, B. R., & Trejo, J. (2008). G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 601.
- Marchese, A., & Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45509-45512.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2000). A Trafficking Checkpoint Controls GABA_B Receptor Heterodimerization. *Neuron*, 27(1), 97-106.
- Marion, S., Fralish, G. B., Laporte, S., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2007). N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the β -arrestins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 18937-18944.
- Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Science Signaling*, 2001(107), pe39.
- Masana, M. I., Benloucif, S., & Dubocovich, M. L. (2000). Circadian rhythm of mt1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse. *Journal of pineal research*, 28(3), 185-192.
- Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., & Krause, D. N. (2002). MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1295-1302.
- Maurice, P., Benleulmi-Chaachoua, A., & Jockers, R. (2012). Differential Assembly of GPCR Signaling Complexes Determines Signaling Specificity. In *GPCR Signalling Complexes—Synthesis, Assembly, Trafficking and Specificity* (pp. 225-240). Springer Netherlands.
- Maurice, P., Daulat, A. M., Broussard, C., Mozo, J., Clary, G., Hotellier, F., ... & Jockers, R. (2008). A generic approach for the purification of signaling complexes that specifically interact with the carboxyl-terminal domain of G protein-coupled receptors. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(8), 1556-1569.
- Maurice, P., Daulat, A. M., Turecek, R., Ivankova-Susankova, K., Zamponi, F., Kamal, M., ... & Jockers, R. (2010). Molecular organization and dynamics of the melatonin MT1 receptor/RGS20/Gi protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and Gi coupling. *The EMBO journal*, 29(21), 3646-3659.
- Maurice, P., Guillaume, J. L., Benleulmi-Chaachoua, A., Daulat, A. M., Kamal, M., & Jockers, R. (2011). GPCR-interacting proteins, major players of GPCR function. *Advances in pharmacology*, 62, 349.
- Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., & González-Gallego, J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research*, 54(1), 1-14.
- Maximov, A., & Bezprozvanny, I. (2002). Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 22(16), 6939-6952.
- Mazna, P., Berka, K., Jelinkova, I., Balik, A., Svoboda, P., Obsilova, V., ... & Teisinger, J. (2005). Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: the role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(3), 726-734.
- Mazna, P., Obsilova, V., Jelinkova, I., Balik, A., Berka, K., Sovova, Z., ... & Teisinger, J. (2004). Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val204, Leu272 and Tyr298 in ligand binding. *Journal of neurochemistry*, 91(4), 836-842.
- McGarrigle, D., & Huang, X. Y. (2007). GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Science Signaling*, 2007(392), pe35.

- McIntire, W. E. (2009). Structural determinants involved in the formation and activation of G protein $\beta\gamma$ dimers. *Neurosignals*, 17(1), 82-99.
- McLeish, T. C., Rodgers, T. L., & Wilson, M. R. (2013). Allostery without conformation change: modelling protein dynamics at multiple scales. *Physical biology*, 10(5), 056004.
- Medrihan, L., Cesca, F., Raimondi, A., Lignani, G., Baldelli, P., & Benfenati, F. (2013). Synapsin II desynchronizes neurotransmitter release at inhibitory synapses by interacting with presynaptic calcium channels. *Nature communications*, 4, 1512.
- Mendelsohn, R., Verma, A. L., Bernstein, H. J., & Kates, M. (1974). Structural studies of bacteriorhodopsin from *Halobacterium cutirubrum* by resonance Raman spectroscopy. *Canadian Journal of Biochemistry*, 52(9), 774-781.
- Menon-Johansson, A. S., Berrow, N., & Dolphin, A. C. (1993). Go transduces GABAB-receptor modulation of N-type calcium channels in cultured dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv*, 425(3-4), 335-343.
- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, 147(S1), S46-S55.
- Milligan, G., & White, J. H. (2001). Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(10), 513-518.
- Milojević, T., Reiterer, V., Stefan, E., Korkhov, V. M., Dorostkar, M. M., Ducza, E., ... & Nanoff, C. (2006). The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A2A receptor. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1083-1094.
- Miranda, M., Dionne, K. R., Sorkina, T., & Sorkin, A. (2007). Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Molecular biology of the cell*, 18(1), 313-323.
- Miranda, M., Wu, C. C., Sorkina, T., Korstjens, D. R., & Sorkin, A. (2005). Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35617-35624.
- Mirzadegan, T., Benkö, G., Filipek, S., & Palczewski, K. (2003). Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry*, 42(10), 2759-2767.
- Mirzadegan, T., Benkö, G., Filipek, S., & Palczewski, K. (2003). Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry*, 42(10), 2759-2767.
- Mizrachi, D., & Segaloff, D. L. (2004). Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Molecular Endocrinology*, 18(7), 1768-1777.
- Mochizuki, Y., Ohashi, R., Kawamura, T., Iwanari, H., Kodama, T., Naito, M., & Hamakubo, T. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is regulated by small GTPase Rab1B in the early secretory and autophagic pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 1009-1021.
- Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S., & Draeger, A. (2005). The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7135-7146.
- Moon, S. Y., & Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in cell biology*, 13(1), 13-22.
- Moore, R. H., Millman, E. E., Alpizar-Foster, E., Dai, W., & Knoll, B. J. (2004). Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of β 2-adrenergic receptors. *Journal of cell science*, 117(15), 3107-3117.
- Moore, R. Y. (1995, January). Organization of the mammalian circadian system. In *Circadian clocks and their adjustment*. Ciba Foundation Symposium (Vol. 183, pp. 88-106).
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience letters*, 150(1), 112-116.
- Mor, M., Rivara, S., Silva, C., Bordi, F., Plazzi, P. V., Spadoni, G., ... & Stankov, B. M. (1998). Melatonin receptor ligands: synthesis of new melatonin derivatives and comprehensive comparative molecular field analysis (CoMFA) study. *Journal of medicinal chemistry*, 41(20), 3831-3844.

- Morciano, M., Beckhaus, T., Karas, M., Zimmermann, H., & Volkandt, W. (2009). The proteome of the presynaptic active zone: from docked synaptic vesicles to adhesion molecules and maxi-channels. *Journal of neurochemistry*, 108(3), 662-675.
- Morcuende, J. A., Minhas, R., Dolan, L., Stevens, J., Beck, J., Wang, K., ... & Sheffield, V. (2003). Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*, 28(17), 2025-2028.
- Moreno, J. L., Holloway, T., & González-Maeso, J. (2012). G protein-coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Progress in molecular biology and translational science*, 117, 187-205.
- Morgan, J. R., Di Paolo, G., Werner, H., Shchedrina, V. A., Pypaert, M., Pieribone, V. A., & De Camilli, P. (2004). A role for talin in presynaptic function. *The Journal of cell biology*, 167(1), 43-50.
- Morin, L. P., & Cummings, L. A. (1981). Effect of surgical or photoperiodic castration, testosterone replacement or pinealectomy on male hamster running rhythmicity. *Physiology & behavior*, 26(5), 825-838.
- Moritz, A., Scheschonka, A., Beckhaus, T., Karas, M., & Betz, H. (2009). Metabotropic glutamate receptor 4 interacts with microtubule-associated protein 1B. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(1), 82-86.
- Moro, O., Lamah, J., Högger, P., & Sadee, W. (1993). Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22273-22276.
- Mouillac, B., Caron, M., Bonin, H., Dennis, M., & Bouvier, M. (1992). Agonist-modulated palmitoylation of beta 2-adrenergic receptor in Sf9 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21733-21737.
- Moukhametzianov, R., Warne, T., Edwards, P. C., Serrano-Vega, M. J., Leslie, A. G., Tate, C. G., & Schertler, G. F. (2011). Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a β 1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8228-8232.
- Mseeh, F., Gerdin, M. J., & Dubocovich, M. L. (2002). Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT₂ receptor. *European journal of pharmacology*, 449(1), 29-38.
- Mseeh, F., Gerdin, M. J., & Dubocovich, M. L. (2002). Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT₂ receptor. *European journal of pharmacology*, 449(1), 29-38.
- Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Watanabe, W., Komada, M., & Goto, S. (2010). Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt. *The EMBO journal*, 29(13), 2114-2125.
- Mukhopadhyay, S., & Ross, E. M. (1999). Rapid GTP binding and hydrolysis by Gq promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9539-9544.
- Müller, C. S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H. G., Meissner, M., ... & Schulte, U. (2010). Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 14950-14957.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., & Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nature chemical biology*, 5(6), 428-434.
- Mushegian, A., Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2012). The origin and evolution of G protein-coupled receptor kinases. *PLoS one*, 7(3), e33806.
- Naji, L., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life sciences*, 74(18), 2227-2236.
- Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., & Touhara, K. (2005). Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307, 1638-42.
- Namkung, Y., Dipace, C., Javitch, J. A., & Sibley, D. R. (2009). G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *Journal of biological chemistry*, 284(22), 15038-15051.
- Natarajan, R., Einarsdottir, E., Riutta, A., Hagman, S., Raunio, M., Mononen, N., ... & Elovaara, I. (2012). Melatonin pathway genes are associated with progressive subtypes and disability status in multiple sclerosis among Finnish patients. *Journal of neuroimmunology*, 250(1), 106-110.

- Nathans, J., & Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, 34(3), 807-814.
- Nature. 1993 Dec 16;366(6456):654-63.
- Navajas, C., Kokkola, T., Poso, A., Honka, N., Gynther, J., & Laitinen, J. T. (1996). A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *European journal of pharmacology*, 304(1), 173-183.
- Nelson, C. S., Ikeda, M., Gompf, H. S., Robinson, M. L., Fuchs, N. K., Yoshioka, T., ... & Allen, C. N. (2001). Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Molecular Endocrinology*, 15(8), 1306-1317.
- Nelson, C. S., Marino, J. L., & Allen, C. N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport*, 7(3), 717-720.
- Neu, J. M., & Niles, L. P. (1997). A marked diurnal rhythm of melatonin ML< sub>1A</sub> receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Molecular brain research*, 49(1), 303-306.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 597-606.
- Ng, W., Sergeyenko, T., Zeng, N., Brown, J. D., & Römisch, K. (2007). Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 120(4), 682-691.
- Niles, L. P., Armstrong, K. J., Castro, L. M. R., Dao, C. V., Sharma, R., McMillan, C. R., ... & Kirkham, D. L. (2004). Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC neuroscience*, 5(1), 41.
- Nobles, K. N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T. G., & Lefkowitz, R. J. (2007). The Active Conformation of β -Arrestin1 DIRECT EVIDENCE FOR THE PHOSPHATE SENSOR IN THE N-DOMAIN AND CONFORMATIONAL DIFFERENCES IN THE ACTIVE STATES OF β -ARRESTINS1 AND-2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21370-21381.
- Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S.
- Nordström, K. J., Almén, M. S., Edstam, M. M., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2011). Independent HHsearch, Needleman–Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. *Molecular biology and evolution*, 28(9), 2471-2480.
- Nordström, K. J., Lagerström, M. C., Wallér, L. M., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2009). The Secretin GPCRs descended from the family of Adhesion GPCRs. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 71-84.
- Northup JK, Sternweis PC, Smigel MD, Schleifer LS, Ross EM, Gilman AG.(1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Nov;77(11):6516-20.
- Nosedá, R., Hernández, A., Valladares, L., Mondaca, M., Laurido, C., & Soto-Moyano, R. (2004). Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT< sub>2</sub> receptor-dependent. *Neuroscience letters*, 360(1), 41-44.
- Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., ... & Boutin, J. A. (2000). Identification of the Melatonin-binding Site MT 3 as the Quinone Reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31311-31317.
- Nourry, C., Grant, S. G., & Borg, J. P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play!. *Science Signaling*, 2003(179), re7.
- O'Neill, P. R., Karunarathne, W. A., Kalyanaraman, V., Silvius, J. R., & Gautam, N. (2012). G-protein signaling leverages subunit-dependent membrane affinity to differentially control $\beta\gamma$ translocation to intracellular membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), E3568-E3577.
- Oakley, R. H., Hudson, C. C., Sjaastad, M. D., & Loomis, C. R. (2006). The Ligand-Independent Translocation Assay: An Enabling Technology for Screening Orphan G Protein-Coupled Receptors by Arrestin Recruitment. *Methods in enzymology*, 414, 50-63.

- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (1999). Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32248-32257.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- β -arrestin complexes after receptor endocytosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19452-19460.
- Oaks, A. W., Marsh-Armstrong, N., Jones, J. M., Credle, J. J., & Sidhu, A. (2013). Synucleins Antagonize Endoplasmic Reticulum Function to Modulate Dopamine Transporter Trafficking. *PLoS one*, 8(8), e70872.
- Oda, T., & Maéda, Y. (2010). Multiple conformations of F-actin. *Structure*, 18(7), 761-767.
- of the beta-adrenergic receptor, *J Biol Chem*. 254, 2923-7.
- Okuno, Y., Tamon, A., Yabuuchi, H., Nijijima, S., Minowa, Y., Tonomura, K., ... & Feng, C. (2008). GLIDA: GPCR—ligand database for chemical genomics drug discovery—database and tools update. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1), D907-D912.
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60-71.
- Opazo, F., Schulz, J. B., & Falkenburger, B. H. (2010). PKC links Gq-coupled receptors to DAT-mediated dopamine release. *Journal of neurochemistry*, 114(2), 587-596.
- Orlandi, C., Posokhova, E., Masuho, I., Ray, T. A., Hasan, N., Gregg, R. G., & Martemyanov, K. A. (2012). GPR158/179 regulate G protein signaling by controlling localization and activity of the RGS7 complexes. *The Journal of cell biology*, 197(6), 711-719.
- Osborne, H. B., Sardet, C., & Helenius, A. (1974). Bovine Rhodopsin: Characterization of the Complex Formed with Triton X-100. *European Journal of Biochemistry*, 44(2), 383-390.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there?. *Nature reviews Drug discovery*, 5(12), 993-996.
- Ozcan, M., Yilmaz, B., & Carpenter, D. O. (2006). Effects of melatonin on synaptic transmission and long-term potentiation in two areas of mouse hippocampus. *Brain research*, 1111(1), 90-94.
- Pacchierotti, C., Iapichino, S., Bossini, L., Pieraccini, F., & Castrogiovanni, P. (2001). Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22(1), 18-32.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., ... & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: AG protein-coupled receptor. *science*, 289(5480), 739-745.
- Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin. *Febs Journal*, 273(13), 2813-2838.
- Pappolla, M. A., Simovich, M. J., Bryant-Thomas, T., Chyan, Y. J., Poeggeler, B., Dubocovich, M., ... & Smith, M. A. (2002). The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer β -protein are not mediated by melatonin membrane receptors. *Journal of pineal research*, 32(3), 135-142.
- Park, P. S. H., Filipek, S., Wells, J. W., & Palczewski, K. (2004). Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry*, 43(50), 15643-15656.
- Parker, L. L., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., & Shieh, B. H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21576-21583.
- Patel, H. H., Murray, F., & Insel, P. A. (2008). G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains. In *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets* (pp. 167-184). Springer Berlin Heidelberg.
- Patel, N., Itakura, T., Gonzalez Jr, J. M., Schwartz, S. G., & Fini, M. E. (2013). GPR158, an Orphan Member of G Protein-Coupled Receptor Family C: Glucocorticoid-Stimulated Expression and Novel Nuclear Role. *PLoS one*, 8(2), e57843.
- Patel, R. C., Lange, D. C., & Patel, Y. C. (2002). Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes. *Methods*, 27(4), 340-348.

- Patowary S., Elisa, A. C., Tian-Rui, X., Jessica, D. H., Julie, A. O., Graeme, M., & Valerica, R. (2013). The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 452(2), 303-312.
- Paumi, C. M., Menendez, J., Arnoldo, A., Engels, K., Iyer, K. R., Thaminy, S., ... & Stagljar, I. (2007). Mapping protein-protein interactions for the yeast ABC transporter Ycf1p by integrated split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid analysis. *Molecular cell*, 26(1), 15-25.
- Pelé, J., Abdi, H., Moreau, M., Thybert, D., & Chabbert, M. (2011). Multidimensional scaling reveals the main evolutionary pathways of class A G-protein-coupled receptors. *PLoS one*, 6(4), e19094.
- Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Lafarga, V., & Mayor Jr, F. (2010). The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *British journal of pharmacology*, 160(4), 821-832.
- Penmatsa, A., Wang, K. H., & Gouaux, E. (2013). X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature*, 503(7474), 85-90.
- Penn, R. B., Pronin, A. N., & Benovic, J. L. (2000). Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends in cardiovascular medicine*, 10(2), 81-89.
- Perreau-Lenz, S., Pevet, P., Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2004). The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiology international*, 21(1), 1-25.
- Petäjä-Repo, U. E., & Lackman, J. J. (2013). Targeting opioid receptors with pharmacological chaperones. *Pharmacological Research*.
- Piechowski, C. L., Rediger, A., Lagemann, C., Mühlhaus, J., Müller, A., Pratzka, J., ... & Biebermann, H. (2013). INHIBITION OF MELANOCORTIN-4 RECEPTOR DIMERIZATION BY SUBSTITUTIONS IN INTRACELLULAR LOOP TWO. *Journal of molecular endocrinology*.
- Pinsonneault, J. K., Han, D. D., Burdick, K. E., Katakai, M., Bertolino, A., Malhotra, A. K., ... & Sadee, W. (2011). Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, 36(8), 1644-1655.
- Pioszak, A. A., Harikumar, K. G., Parker, N. R., Miller, L. J., & Xu, H. E. (2010). Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation. *Journal of biological chemistry*, 285(16), 12435-12444.
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., ... & 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(5074), 1264-1267.
- Poirel, V. J., Masson-Pévet, M., Pevét, P., & Gauer, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain research*, 946(1), 64-71.
- Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V. K., & Oppermann, M. (2003). Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2190-2198.
- Poo, M. M., & Cone, R. A. (1974). Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature*, 247(441), 438-441.
- Posner, B. A., Mukhopadhyay, S., Tesmer, J. J., Gilman, A. G., & Ross, E. M. (1999). Modulation of the affinity and selectivity of RGS protein interaction with G α subunits by a conserved asparagine/serine residue. *Biochemistry*, 38(24), 7773-7779.
- Prabhu, Y. & Eichinger, L. (2006) The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain
- Prokopenko, I., Langenberg, C., Florez, J. C., Saxena, R., Soranzo, N., Thorleifsson, G., ... & Lindblad, U. (2009). Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature genetics*, 41(1), 77-81.
- Pronin, A. N., Carman, C. V., & Benovic, J. L. (1998). Structure-Function Analysis of G Protein-coupled Receptor Kinase-5 ROLE OF THE CARBOXYL TERMINUS IN KINASE REGULATION. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31510-31518.
- Qanbar, R., & Bouvier, M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacology & therapeutics*, 97(1), 1-33.

- Raingo, J., Castiglioni, A. J., & Lipscombe, D. (2007). Alternative splicing controls G protein–dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nature neuroscience*, *10*(3), 285-292.
- Rajagopal, S., Ahn, S., Rominger, D. H., Gowen-MacDonald, W., Lam, C. M., DeWire, S. M., ... & Lefkowitz, R. J. (2011). Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Molecular pharmacology*, *80*(3), 367-377.
- Ramos, C., Chardonnet, S., Marchand, C. H., Decottignies, P., Ango, F., Daniel, H., & Le Maréchal, P. (2012). Native Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptor 4 (mGluR4) Interacts with Exocytosis Proteins in Rat Cerebellum. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20176-20186.
- Rankin, M. L., Marinec, P. S., Cabrera, D. M., Wang, Z., Jose, P. A., & Sibley, D. R. (2006). The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Molecular pharmacology*, *69*(3), 759-769.
- Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., ... & George, S. R. (2007). D1–D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(2), 654-659.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., ... & Kobilka, B. K. (2011b). Structure of a nanobody-stabilized active state of the [bgr] 2 adrenoceptor. *Nature*, *469*(7329), 175-180.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., ... & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human &bgr; 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, *450*(7168), 383-387.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., ... & Kobilka, B. K. (2011a). Crystal structure of the [bgr] 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, *477*(7366), 549-555.
- receptors, *Eur J Cell Biol.* *85*, 937-46.
- Redman, J., Armstrong, S., & Ng, K. T. (1983). Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*, *219*(4588), 1089-1091.
- Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., Qi, W., & Tan, D. X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *917*(1), 376-386.
- Remelli, R., Robbins, M. J., & McIlhinney, R. A. (2008). The C-terminus of the metabotropic glutamate receptor 1b regulates dimerization of the receptor. *Journal of neurochemistry*, *104*(4), 1020-1031.
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., & Gusella, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(19), 8734-8738.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, *13*(5), 1177-1185.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Ebisawa, T., Mahle, C. D., & Kolakowski Jr, L. F. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS letters*, *386*(2), 219-224.
- Richman, R. W., Strock, J., Hains, M. D., Cabanilla, N. J., Lau, K. K., Siderovski, D. P., & Diversé-Pierluissi, M. (2005). RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2. 2 calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(2), 1521-1528.
- Richter, H. G., Torres-Farfan, C., Garcia-Sesnich, J., Abarzua-Catalan, L., Henriquez, M. G., Alvarez-Felmer, M., ... & Seron-Ferre, M. (2008). Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology*, *149*(3), 995-1003.
- Ritter, S. L., & Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(12), 819-830.
- Rivero-Miüller, A., Jonasl, K. C., & Hanyaloglul, A. C. (2013). Di/Oligomerization of GPCRs—Mechanisms and Functional Significance. *Oligomerization in Health and Disease*, *117*, 163.
- Rivero-Müller, A., Chou, Y. Y., Ji, I., Lajic, S., Hanyaloglu, A. C., Jonas, K., ... & Huhtaniemi, I. (2010). Rescue of defective G protein–coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2319-2324.

- Rives, M. L., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M. A., Shigemoto, R., ... & Prézeau, L. (2009). Crosstalk between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration. *The EMBO journal*, 28(15), 2195-2208.
- Robbins, M. J., Calver, A. R., Filippov, A. K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., ... & Pangalos, M. N. (2001). GABAB2 is essential for G-protein coupling of the GABAB receptor heterodimer. *The Journal of Neuroscience*, 21(20), 8043-8052.
- Robert, J., Auzan, C., Ventura, M. A., & Clauser, E. (2005). Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42198-42206.
- Robson, J. G., Maeda, H., Saszik, S. M., & Frishman, L. J. (2004). In vivo studies of signaling in rod pathways of the mouse using the electroretinogram. *Vision research*, 44(28), 3253-3268.
- Roche, K. W., Tu, J. C., Petralia, R. S., Xiao, B., Wenthold, R. J., & Worley, P. F. (1999). Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25953-25957.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C., & Patel, Y. C. (2000b). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 288(5463), 154-157.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R. C., & Patel, Y. C. (2000). Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo-and heterodimers. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7862-7869.
- Rodriguez, M. C., Xie, Y. B., Wang, H. A. I. Y. U. N., Collison, K., & Segaloff, D. L. (1992). Effects of truncations of the cytoplasmic tail of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor on receptor-mediated hormone internalization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(3), 327-336.
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A. D., Freissmuth, M., Jockers, R., & Nanoff, C. (1999). Tight association of the human Mel1a-melatonin receptor and Gi: precoupling and constitutive activity. *Molecular pharmacology*, 56(5), 1014-1024.
- Roman, D. L., & Traynor, J. R. (2011). Regulators of G Protein Signaling (RGS) Proteins as Drug Targets: Modulating G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Signal Transduction: Miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 54(21), 7433-7440.
- Romano, C., Miller, J. K., Hyrc, K., Dikranian, S., Mennerick, S., Takeuchi, Y., ... & O'Malley, K. L. (2001). Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Molecular pharmacology*, 59(1), 46-53.
- Römisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 435-456.
- Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L., ... & Reiter, R. J. (2012). Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Journal of pineal research*, 52(2), 167-202.
- Rosenbaum, D. M., Zhang, C., Lyons, J. A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D. H., ... & Kobilka, B. K. (2011). Structure and function of an irreversible agonist-[bgr] 2 adrenoceptor complex. *Nature*, 469(7329), 236-240.
- Ross, E. M., & Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 795-827.
- Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2013). Melatonin in Autism Spectrum Disorders. *Current clinical pharmacology*.
- Rovati, G. E., Capra, V., & Neubig, R. R. (2007). The highly conserved DRY motif of class AG protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Molecular pharmacology*, 71(4), 959-964.
- Roy, D., Angelini, N. L., Fujieda, H., Brown, G. M., & Belsham, D. D. (2001). Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, 142(11), 4711-4720.
- Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J. F., Lagacé, M., Marullo, S., & Bouvier, M. (2004). Homodimerization of the β 2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33390-33397.

- Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., ... & Palczewski, K. (2006). Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16123-16128.
- Salomon Y, Lin MC, Londos C, Rendell M, Rodbell M.(1975) The hepatic adenylate cyclase system. I. Evidence for transition states and structural requirements for guanine nucleotide activation. *J Biol Chem*. 1975 Jun 10;250(11):4239-45.
- Sanchez, C., El Hajj Diab, D., Connord, V., Clerc, P., Meunier, E., Pipy, B., ... & Fourmy, D. (2014). Targeting a G-Protein Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles to Induce Cell Death. *ACS nano*.
- Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A. M., Mayor Jr, F., & Ribas, C. (2014). Gαq signalling: The new and the old. *Cellular signalling*.
- Sánchez-Hidalgo, M., Guerrero Montávez, J. M., Carrascosa-Salmoral, M. D. P., Naranjo Gutierrez, M. D. C., Lardone, P. J., & De La Lastra Romero, C. A. (2009). Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *Journal of pineal research*, 46(1), 29-35.
- Sardet, C., Tardieu, A., & Luzzati, V. (1976). Shape and size of bovine rhodopsin: a small-angle x-ray scattering study of a rhodopsin-detergent complex. *Journal of molecular biology*, 105(3), 383-407.
- Sarlak, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., & Govitrapong, P. (2013). Effects of Melatonin on Nervous System Aging: Neurogenesis and Neurodegeneration. *Journal of pharmacological sciences*.
- Savaskan, E., Olivieri, G., Meier, F., Brydon, L., Jockers, R., Ravid, R., ... & Müller-Spahn, F. (2002). Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Journal of pineal research*, 32(1), 59-62.
- Scheuer, C., Pommergaard, H. C., Rosenberg, J., & Gögenur, I. (2013). Melatonin's protective effect against UV radiation: a systematic review of clinical and experimental studies. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*.
- Schiff, M. L., Siderovski, D. P., Jordan, J. D., Brothers, G., Snow, B., De Vries, L., ... & Diversé-Pierluissi, M. (2000). Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature*, 408(6813), 723-727.
- Scholz, K. P., & Miller, R. J. (1991). GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, 444(1), 669-686.
- Schott, M. B., & Grove, B. (2013). Receptor-mediated Ca²⁺ and PKC signaling triggers the loss of cortical PKA compartmentalization through the redistribution of gravin. *Cellular signalling*, 25(11), 2125-2135.
- Schüle, R., Hermosilla, R., Oksche, A., Dehe, M., Wiesner, B., Krause, G., & Rosenthal, W. (1998). A Dileucine Sequence and an Upstream Glutamate Residue in the Intracellular Carboxyl Terminus of the Vasopressin V2 Receptor Are Essential for Cell Surface Transport in COS. M6 Cells. *Molecular pharmacology*, 54(3), 525-535.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research*, 28(1), 231-234.
- Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., ... & Bettler, B. (2010). Native GABAB receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature*, 465(7295), 231-235.
- Seachrist, J. L., Anborgh, P. H., & Ferguson, S. S. (2000). β₂-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27221-27228.
- Selkoe, D. J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426(6968), 900-904.
- Sethi, S., Adams, W., Pollock, J., & Witt-Enderby, P. A. (2008). C-terminal domains within human MT1 and MT2 melatonin receptors are involved in internalization processes. *Journal of pineal research*, 45(2), 212-218.
- Seward, E., Hammond, C., & Henderson, G. (1991). μ-Opioid-receptor-mediated Inhibition of the N-Type Calcium-Channel Current. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 244(1310), 129-135.

- Sharma, S., Moon, C. S., Khogali, A., Haidous, A., Chabenne, A., Ojo, C., ... & Ebadi, M. (2013). Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). *Neurochemistry international*, 63(3), 201-229.
- Sheikh, S. P., Zvyaga, T. A., Lichtarge, O., Sakmar, T. P., & Bourne, H. R. (1996). Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature*, 383(6598), 347-350.
- Sheng, Z. H., Rettig, J., Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1994). Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron*, 13(6), 1303-1313.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., & Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science*, 294(5545), 1307-1313.
- Shore, D. M., Ballie, G. L., Hurst, D. P., Navas, F. J., Seltzman, H. H., Marcu, J. P., ... & Reggio, P. H. (2013). Allosteric Modulation of a Cannabinoid G Protein-Coupled Receptor: Binding Site Elucidation and Relationship to G Protein Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.
- Shukla, A. K., Manglik, A., Kruse, A. C., Xiao, K., Reis, R. I., Tseng, W. C., ... & Lefkowitz, R. J. (2013). Structure of active [bgr]-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 497(7447), 137-141.
- Shupliakov, O., Haucke, V., & Pechstein, A. (2011, June). How synapsin I may cluster synaptic vesicles. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 4, pp. 393-399). Academic Press.
- Sidibe, A., Mullier, A., Chen, P., Baroncini, M., Boutin, J. A., Delagrangé, P., ... & Jockers, R. (2010). Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *Journal of pineal research*, 48(3), 263-269.
- Sihra, T. S., Bogonez, E., & Nicholls, D. G. (1992). Localized Ca²⁺ entry preferentially effects protein dephosphorylation, phosphorylation, and glutamate release. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1983-1989.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252(5007), 802-808.
- Simonneaux, V., & Ancel, C. (2012). RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Frontiers in endocrinology*, 3.
- Simonneaux, V., & Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 325-395.
- Singh, V., Raghuvanshi, S. K., Smith, N., Rivers, E. J., & Richardson, R. M. (2014). G Protein-Coupled Receptor Kinase-6 Interacts with Activator of G Protein Signaling-3 To Regulate CXCR2-Mediated Cellular Functions. *The Journal of Immunology*, 1301875.
- Skaper, S. D., Floreani, M., Ceccon, M., Facci, L., & Giusti, P. (1999). Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890(1), 107-118.
- Slessareva, J. E., Routt, S. M., Temple, B., Bankaitis, V. A., & Dohlman, H. G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein α subunit at the endosome. *Cell*, 126(1), 191-203.
- Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L., & Leurs, R. (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 53-87.
- Snider, J., Kittanakom, S., Curak, J., & Stagljar, I. (2010). Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: a powerful tool for identifying protein-protein interactions. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (36).
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., & Stagljar, I. (2010b). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nature protocols*, 5(7), 1281-1293.
- Sorkina, T., Hoover, B. R., Zahniser, N. R., & Sorkin, A. (2005). Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic*, 6(2), 157-170.

- Sorkina, T., Miranda, M., Dionne, K. R., Hoover, B. R., Zahniser, N. R., & Sorkin, A. (2006). RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *The Journal of neuroscience*, 26(31), 8195-8205.
- Sothibundhu, A., Phansuwan-Pujito, P., & Govitrapong, P. (2010). Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *Journal of pineal research*, 49(3), 291-300.
- Srinivasan, V., Ho, K. Y., Acuña-Castroviejo, D., Zakaria, R., Brzezinski, A., & Lauterbach, E. C. (2014). Melatonin and Pain: Therapeutic Applications. In *Melatonin and Melatonergic Drugs in Clinical Practice* (pp. 221-234). Springer India.
- Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D., & Cotecchia, S. (2006). Ezrin directly interacts with the $\alpha 1b$ -adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4354-4363.
- Stanley, E. F. (2003). Syntaxin I modulation of presynaptic calcium channel inactivation revealed by botulinum toxin C1. *European Journal of Neuroscience*, 17(6), 1303-1305.
- Staus, D. P., Wingler, L. M., Strachan, R. T., Rasmussen, S. G., Pardon, E., Ahn, S., ... & Lefkowitz, R. J. (2014). Regulation of $\beta 2$ -Adrenergic Receptor Function by Conformationally Selective Single-Domain Intrabodies. *Molecular pharmacology*, 85(3), 472-481.
- Steffens, F., Zhou, X. B., Sausbier, U., Sailer, C., Motejlek, K., Ruth, P., ... & Wieland, T. (2003). Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity. *Molecular Endocrinology*, 17(10), 2103-2115.
- Stehle, J. H., von Gall, C., & Korf, H. W. (2002). Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell and tissue research*, 309(1), 173-182.
- Stehle, J. H., von Gall, C., Schomerus, C., & Korf, H. W. (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *Journal of biological rhythms*, 16(4), 312-325.
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675-690.
- Sugawara, T., Sieving, P. A., Iuvone, P. M., & Bush, R. A. (1998). The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(12), 2458-2465.
- Sugden, D., McArthur, A. J., Ajpru, S., Duniec, K., & Piggins, H. D. (1999). Expression of mt_{1} melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle. *Molecular brain research*, 72(2), 176-182.
- Sutherland E.W., Rall T.W., Menon T. (1962) Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 237, 1220-1227
- Suzuki KG, Kasai RS, Fujiwara TK, Kusumi. (2013). A.Single-molecule imaging of receptor-receptor interactions. *Methods Cell Biol.* 2013;117:373-90.
- Szabo, Z., Obermair, G. J., Cooper, C. B., Zamponi, G. W., & Flucher, B. E. (2006). Role of the synprint site in presynaptic targeting of the calcium channel $CaV_{2.2}$ in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 24(3), 709-718.
- Szekeres, P. G. (2002). Functional assays for identifying ligands at orphan G protein-coupled receptors. *Receptors and Channels*, 8(5-6), 297-308.
- Szereszewski, J. M., Pampillo, M., Ahow, M. R., Offermanns, S., Bhattacharya, M., & Babwah, A. V. (2010). GPR54 regulates ERK1/2 activity and hypothalamic gene expression in a $G\alpha q/11$ and β -arrestin-dependent manner. *PLoS one*, 5(9), e12964.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L., & De Camilli, P. (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *The Journal of cell biology*, 133(6), 1237-1250.
- Tamarkin, L., Baird, C. J., & Almeida, O. F. (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science*, 227(4688), 714-720.

- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., ... & Kuner, R. (2007). A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *The Journal of neuroscience*, 27(15), 4165-4177.
- Taylor, J. M., Jacob-Mosier, G. G., Lawton, R. G., Remmers, A. E., & Neubig, R. R. (1994). Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27618-27624.
- Taymans, J. M., Cruz, C., Lesage, A., Leysen, J. E., & Langlois, X. (2005). MK-801 alters RGS2 levels and adenylyl cyclase sensitivity in the rat striatum. *Neuroreport*, 16(2), 159-162.
- Tedford, H. W., & Zamponi, G. W. (2006). Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacological reviews*, 58(4), 837-862.
- Teis, D., Wunderlich, W., & Huber, L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental cell*, 3(6), 803-814.
- Thapliyal, A., Bannister, R. A., Hanks, C., & Adams, B. A. (2008). The monomeric G proteins AGS1 and Rhes selectively influence Gai-dependent signaling to modulate N-type (CaV2. 2) calcium channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(5), C1417-C1426.
- Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y., & Hay, J. C. (2010). α -Synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Molecular biology of the cell*, 21(11), 1850-1863.
- Thomsen, W., Frazer, J., & Unett, D. (2005). Functional assays for screening GPCR targets. *Current opinion in biotechnology*, 16(6), 655-665.
- Thomson, P. A., Wray, N. R., Thomson, A. M., Dunbar, D. R., Grassie, M. A., Condie, A., ... & Porteous, D. J. (2005). Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Molecular psychiatry*, 10(5), 470-478.
- Tian, J. H., Wu, Z. X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., ... & Sheng, Z. H. (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience*, 25(45), 10546-10555.
- Tishchenko, S., Gabdulkhakov, A., Tin, U., Kostareva, O., Lin, C., & Katanaev, V. L. (2012). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of Drosophila melanogaster Go-subunit of heterotrimeric G protein in complex with the RGS domain of CG5036. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(1), 61-64.
- Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., ... & Luttrell, L. M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor- β -arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6258-6267.
- Tordjman, S., Najjar, I., Bellissant, E., Anderson, G. M., Barburroth, M., Cohen, D., ... & Vernay-Leconte, J. (2013). Advances in the Research of Melatonin in Autism Spectrum Disorders: Literature Review and New Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20508-20542.
- Torres-Farfan, C., Richter, H. G., Rojas-García, P., Vergara, M., Forcelledo, M. L., Valladares, L. E., ... & Serón-Ferré, M. (2003). mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 450-458.
- Torres-Farfan, C., Serón-Ferré, M., Dinet, V., & Korf, H. W. (2006). Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *Journal of pineal research*, 40(1), 64-70.
- Tosini, G., & Dirden, J. C. (2000). Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neuroscience letters*, 286(2), 119-122.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1998). The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain research*, 789(2), 221-228.
- Traynor, J. R., & Neubig, R. R. (2005). Regulators of G protein signaling & drugs of abuse. *Molecular interventions*, 5(1), 30.
- Tricoire, H., Møller, M., Chemineau, P., & Malpoux, B. (2002). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 61, 311-321.

- Trifilieff, P., Rives, M. L., Urizar, E., Piskorowski, R. A., Vishwasrao, H. D., Castrillon, J., ... & Javitch, J. A. (2011). Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *BioTechniques*, 51(2), 111.
- Trombetta, E. S., & Parodi, A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), 649-676.
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., & Filipek, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs-theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry*, 19(8), 1090.
- Tse, M. K., & Wong, Y. H. (2012). Neuronal Functions of Activators of G Protein Signaling. *Neurosignals*, 21(3-4), 259-271.
- Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., & Kriegsfeld, L. J. (2013). Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Frontiers in neuroscience*, 7.
- Uchida, K., Samejima, M., Okabe, A., & Fukuda, A. (2004). Neuroprotective effects of melatonin against anoxia/aglycemia stress, as assessed by synaptic potentials and superoxide production in rat hippocampal slices. *Journal of pineal research*, 37(4), 215-222.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A., & Lübbert, H. (1998). Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS letters*, 424(1), 63-68.
- Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., Akhisaroglu, M., Dwivedi, Y., ... & Manev, H. (2005). The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Molecular brain research*, 136(1), 45-53.
- Valiquette, M., Bonin, H., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & BouVIER, M. I. C. H. E. L. (1990). Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5089-5093.
- Valtcheva, N., Primorac, A., Jurisic, G., Hollmén, M., & Detmar, M. (2013). The Orphan Adhesion G Protein-coupled Receptor GPR97 Regulates Migration of Lymphatic Endothelial Cells via the Small GTPases RhoA and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35736-35748.
- Van Craenenbroeck, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Skieterska, K., Rondou, P., Lintermans, B., ... & Haegeman, G. (2011). Dopamine D4 receptor oligomerization—contribution to receptor biogenesis. *FEBS Journal*, 278(8), 1333-1344.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., ... & Gaitanaris, G. A. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4903-4908.
- Venegas, C., García, J. A., Doerrier, C., Volt, H., Escames, G., López, L. C., ... & Acuña-Castroviejo, D. (2013). Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *Journal of pineal research*, 54(3), 313-321.
- Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185-194.
- Venkatesan, S., Petrovic, A., Locati, M., Kim, Y. O., Weissman, D., & Murphy, P. M. (2001). A membrane-proximal basic domain and cysteine cluster in the C-terminal tail of CCR5 constitute a bipartite motif critical for cell surface expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 40133-40145.
- Verhage, M., McMahon, H. T., Ghijsen, W. E., Boomsma, F., Scholten, G., Wiegant, V. M., & Nicholls, D. G. (1991). Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, 6(4), 517-524.
- Verma, V., Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2010). Dopamine D1-D2 Receptor Heteromer-mediated Calcium Release Is Desensitized by D1 Receptor Occupancy with or without Signal Activation DUAL FUNCTIONAL REGULATION BY G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASE 2. *Journal of biological chemistry*, 285(45), 35092-35103.

- Verzijl, D., Pardo, L., van Dijk, M., Gruijthuisen, Y. K., Jongejan, A., Timmerman, H., ... & Smit, M. J. (2006). Helix 8 of the viral chemokine receptor ORF74 directs chemokine binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35327-35335.
- Vigano, D., Lissoni, P., Rovelli, F., Roselli, M. G., Malugani, F., Gavazzeni, C., ... & Maestroni, G. (2001). A study of light/dark rhythm of melatonin in relation to cortisol and prolactin secretion in schizophrenia. *Neuroendocrinology Letters*, 22(2), 137-141.
- Vilardaga, J. P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M., & Lohse, M. J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature biotechnology*, 21(7), 807-812.
- Vishwas, D. K., & Haldar, C. (2013). Photoperiodic induced melatonin regulates immunity and expression pattern of melatonin receptor MT₁ in spleen and bone marrow mononuclear cells of male golden hamster. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 107-114.
- Vistein, R., & Puthenveedu, M. A. (2013). Reprogramming of G protein-coupled receptor recycling and signaling by a kinase switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15289-15294.
- Volkandt, W., & Karas, M. (2012). Proteomic analysis of the presynaptic active zone. *Experimental brain research*, 217(3-4), 449-461.
- Vuong, T. M., Chabre, M., & Stryer, L. (1984). Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision.
- Wan, Q., Man, H. Y., Liu, F., Braunton, J., Niznik, H. B., Pang, S. F., ... & Wang, Y. T. (1999). Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. *Nature neuroscience*, 2(5), 401-403.
- Wang, F., Chen, X., Zhang, X., & Ma, L. (2008). Phosphorylation state of μ -opioid receptor determines the alternative recycling of receptor via Rab4 or Rab11 pathway. *Molecular endocrinology*, 22(8), 1881-1892.
- Wang, G., & Wu, G. (2012). Small GTPase regulation of GPCR anterograde trafficking. *Trends in pharmacological sciences*, 33(1), 28-34.
- Wang, H. Y., Liu, T. & Malbon, C. C. (2006) Structure-function analysis of Frizzleds
- Wang, L. M., Suthana, N. A., Chaudhury, D., Weaver, D. R., & Colwell, C. S. (2005). Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2231-2237.
- Wang, S. J., Liu, W. J., Wu, C. J., Ma, F. H., Ahmad, S., Liu, B. R., ... & Yang, L. G. (2012). Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). *Theriogenology*, 78(7), 1517-1526.
- Wayment, H. K., Schenk, J. O., & Sorg, B. A. (2001). Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), 35-44.
- Wehr, T. A., Aeschbach, D., & Duncan, W. C. (2001). Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system. *The Journal of physiology*, 535(3), 937-951.
- Weingarten, J., Laßek, M., Mueller, B. F., Rohmer, M., Lunger, I., Baeumlisberger, D., ... & Volkandt, W. (2014). The proteome of the presynaptic active zone from mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 59, 106-118.
- Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W., & Kenakin, T. P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model III. Resurrecting efficacy. *Journal of theoretical biology*, 181(4), 381-397.
- Weiss, N., Sandoval, A., Kyonaka, S., Felix, R., Mori, Y., & De Waard, M. (2011). Rim1 modulates direct G-protein regulation of CaV2. 2 channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 461(4), 447-459.
- Werthmann, R. C., Volpe, S., Lohse, M. J., & Calebiro, D. (2012). Persistent cAMP signaling by internalized TSH receptors occurs in thyroid but not in HEK293 cells. *The FASEB Journal*, 26(5), 2043-2048.
- Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., & Catterall, W. A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Neuron*, 9(6), 1099-1115.
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., ... & von Zastrow, M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, 297(5581), 615-620.

- White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., ... & Grisshammer, R. (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*.
- White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., ... & Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor. *Nature*, 396(6712), 679-682.
- White, S. H., & von Heijne, G. (2008). How translocons select transmembrane helices. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 23-42.
- Wiechmann, A. F., & O'Steen, W. K. (1992). Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(6), 1894-1902.
- Wiechmann, A. F., & Summers, J. A. (2008). Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Progress in retinal and eye research*, 27(2), 137-160.
- Wieland, K., Zuurmond, H. M., Krasel, C., Ijzerman, A. P., & Lohse, M. J. (1996). Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9276-9281.
- Willoughby, D., Wong, W., Schaack, J., Scott, J. D., & Cooper, D. M. (2006). An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics. *The EMBO journal*, 25(10), 2051-2061.
- Witt-Enderby, P. A., Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (1998). Physiological Exposure to Melatonin Supersensitizes the Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Dependent Signal Transduction Cascade in Chinese Hamster Ovary Cells Expressing the Human mt1 Melatonin Receptor 1. *Endocrinology*, 139(7), 3064-3071.
- Wojcikiewicz, R. J. (2004). Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends in pharmacological sciences*, 25(1), 35-41.
- Wolfe, M. S., Lee, N. R., & Zatz, M. (1995). Properties of clock-controlled and constitutive< i> N</i>-acetyltransferases from chick pineal cells. *Brain research*, 669(1), 100-106.
- Wong, F. K., & Stanley, E. F. (2010). Rab3a interacting molecule (RIM) and the tethering of pre-synaptic transmitter release site-associated CaV2. 2 calcium channels. *Journal of neurochemistry*, 112(2), 463-473.
- Wong, F. K., Nath, A. R., Chen, R. H., Gardezi, S. R., Li, Q., & Stanley, E. F. (2014). Synaptic vesicle tethering and the CaV2. 2 distal C-terminal. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8.
- Wong, S. F. (2003). G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals*, 12(1), 1-12.
- Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., ... & Stevens, R. C. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330(6007), 1066-1071.
- Wu, G., Yi, J., Liu, L., Wang, P., Zhang, Z., & Li, Z. (2013). Pseudoginsenoside F11, a Novel Partial PPAR γ Agonist, Promotes Adiponectin Oligomerization and Secretion in 3T3-L1 Adipocytes. *PPAR research*, 2013.
- Xiang, Y., Devic, E., & Kobilka, B. (2002). The PDZ binding motif of the β 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33783-33790.
- Xie, C., Li, J., Guo, T., Yan, Y., Tang, C., Wang, Y., ... & Liang, S. (2014). Rab3A is a new interacting partner of synaptotagmin I and may modulate synaptic membrane fusion through a competitive mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*.
- Xie, Z., & Miller, G. M. (2007). Trace amine-associated receptor 1 is a modulator of the dopamine transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1), 128-136.
- Xu, Y., Piston, D. W., & Johnson, C. H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 151-156.
- Yamashita, T., Terakita, A., & Shichida, Y. (2000). Distinct roles of the second and third cytoplasmic loops of bovine rhodopsin in G protein activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34272-34279.
- Yamashita, T., Terakita, A., & Shichida, Y. (2001). The second cytoplasmic loop of metabotropic glutamate receptor functions at the third loop position of rhodopsin. *Journal of Biochemistry*, 130(1), 149-155.
- Yang, S. N., & Berggren, P. O. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic β -cell physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 27(6), 621-676.

- Yoon, E. J., Gerachshenko, T., Spiegelberg, B. D., Alford, S., & Hamm, H. E. (2007). G $\beta\gamma$ interferes with Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex. *Molecular pharmacology*, 72(5), 1210-1219.
- Yoshimura, Y., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Donai, H., Takahashi, N., ... & Yamauchi, T. (2004). Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of neurochemistry*, 88(3), 759-768.
- Yu, M. Y., Ho, M. K., Liu, A. M., & Wong, Y. H. (2008). Mutations on the Switch III region and the alpha3 helix of Galpha. *Journal of molecular signaling*, 3, 17.
- Yu, S. C., Klosterman, S. M., Martin, A. A., Gracheva, E. O., & Richmond, J. E. (2013). Differential Roles for Snapin and Synaptotagmin in the Synaptic Vesicle Cycle. *PloS one*, 8(2), e57842.
- Yuan, C., Sato, M., Lanier, S. M., & Smrcka, A. V. (2007). Signaling by a non-dissociated complex of G protein $\beta\gamma$ and α subunits stimulated by a receptor-independent activator of G protein signaling, AGS8. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19938-19947.
- Yudowski, G. A., Puthenveedu, M. A., Henry, A. G., & von Zastrow, M. (2009). Cargo-mediated regulation of a rapid Rab4-dependent recycling pathway. *Molecular biology of the cell*, 20(11), 2774-2784.
- Zamponi, G. W., Lewis, R. J., Todorovic, S. M., Arneric, S. P., & Snutch, T. P. (2009). Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain research reviews*, 60(1), 84-89.
- Zapata, A., Kivell, B., Han, Y., Javitch, J. A., Bolan, E. A., Kuraguntla, D., ... & Shippenberg, T. S. (2007). Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *Journal of biological chemistry*, 282(49), 35842-35854.
- Zemoura, K., Schenkel, M., Acuña, M. A., Yévenes, G. E., Zeilhofer, H. U., & Benke, D. (2013). Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Controls Cell Surface Expression of γ -Aminobutyric Acid, Type B Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34897-34905.
- Zhan, X., Gimenez, L. E., Gurevich, V. V., & Spiller, B. W. (2011). Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *Journal of molecular biology*, 406(3), 467-478.
- Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y., ... & Kobilka, B. K. (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, 492(7429), 387-392.
- Zhang, P., & Mende, U. (2011). Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circulation research*, 109(3), 320-333.
- Zhang, Z., Austin, S. C., & Smyth, E. M. (2001). Glycosylation of the human prostacyclin receptor: role in ligand binding and signal transduction. *Molecular pharmacology*, 60(3), 480-487.
- Zhou, H., Chisari, M., Raehal, K. M., Kaltenbronn, K. M., Bohn, L. M., Mennerick, S. J., & Blumer, K. J. (2012). GIRK channel modulation by assembly with allosterically regulated RGS proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 19977-19982.
- Zisapel, N., & Laudon, M. (1982b). Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus invitro: Inhibition by melatonin. *Biochemical and biophysical research communications*, 104(4), 1610-1616.
- Zisapel, N., & Laudon, M. (1983). Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain research*, 272(2), 378-381.
- Zisapel, N., Egozi, Y., & Laudon, M. (1982). Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain research*, 246(1), 161-163.
- Zisapel, N., Nir, I., & Laudon, M. (1988). Circadian variations in melatonin-binding sites in discrete areas of the male rat brain. *FEBS letters*, 232(1), 172-176.
- Zlotos, D. P., Jockers, R., Cecon, E., Rivara, S., & Witt-Enderby, P. A. (2013). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *Journal of medicinal chemistry*.

- Zoe, B., Louise, D., Derek, N. R., Melanie, S. J., Pamela, J. H., Roberta, R., ... & Rory, M. (2011). 5-HT_{2A} receptor signalling through phospholipase D1 associated with its C-terminal tail. *Biochemical Journal*, 436(3), 651-660.