



HAL
open science

Dynamique structurale de complexes RCPG - neuropeptides

Guillaume Ferré

► **To cite this version:**

Guillaume Ferré. Dynamique structurale de complexes RCPG - neuropeptides. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30141 . tel-02651269

HAL Id: tel-02651269

<https://theses.hal.science/tel-02651269>

Submitted on 29 May 2020

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Guillaume FERRE

Le 27 septembre 2019

Dynamique structurale de complexes RCPG - neuropeptides

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE**

Unité de recherche :

IPBS - Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale

Thèse dirigée par

Alain MILON et Pascal DEMANGE

Jury

Mme Carine VAN-HEIJENOORT, Rapporteur

M. Guillaume LEBON, Rapporteur

M. Jérôme BOISBOUVIER, Examinateur

Mme Maryelle TROPIS, Examinatrice

M. Alain MILON, Directeur de thèse

M. Pascal DEMANGE, Directeur de thèse

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) reconnaissent un ligand extracellulaire afin de transmettre l'information correspondante à l'intérieur de la cellule. Ils sont des acteurs prépondérants en physiologie ainsi que des cibles pharmacologiques majeures. Nous avons étudié deux RCPG dont les ligands endogènes sont des peptides.

a) Le récepteur κ opioïde (KOP) qui reconnaît la dynorphine. Ce récepteur joue un rôle fondamental dans la régulation de la douleur et des mécanismes de récompense (et donc dans l'addiction). La découverte, la pharmacologie et les relations structure - fonction de la dynorphine sont décrites dans cette thèse sous la forme d'une revue publiée en 2019 dans « Vitamins and Hormones ». L'activité des RCPG est assurée par une dynamique conformationnelle riche et la résonance magnétique nucléaire (RMN) est particulièrement adaptée pour l'étudier. Elle nécessite néanmoins le marquage isotopique de la protéine d'intérêt, or la plupart des études structurales utilisent des RCPG surexprimés en cellules d'insecte. Nous avons mis au point la production de KOP avec une stratégie d'expression chez *E. coli*, outil de choix pour le marquage isotopique. Le récepteur recombinant a été purifié puis renaturé en micelles de détergent et s'est avéré être fonctionnel pour la liaison de son ligand. Ce sera un outil de choix pour des études structurales et dynamiques par RMN.

b) Le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHSR), qui est naturellement activé par la ghréline, une hormone peptidique digestive acylée impliquée dans l'appétit, la sécrétion de l'hormone de croissance et l'homéostasie du glucose. Les interactions peptide – RCPG sont mal connues au niveau structural en raison de la difficulté à cristalliser ces complexes. Utilisant un récepteur GHSR perdeutérié, produit dans *E. coli* et reconstitué en nanodisques lipidiques dans l'équipe de J.L. Banères (IBMM, Montpellier), nous avons utilisé différentes expériences de RMN (relaxation ^{15}N , NOE transféré et STD) pour caractériser finement la structure et la dynamique de la ghréline liée à son récepteur. Nous avons ainsi mis en évidence le mécanisme par lequel la chaîne acyle en position 3 de la ghréline assure une reconnaissance spécifique par GHSR.

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCR) recognize an extracellular ligand in order to transmit the corresponding information inside the cell. They are major players in physiology and predominant pharmacological targets. Here, we studied two GPCR for which the endogenous ligands are peptides.

a) The κ opioid receptor (KOP), which recognizes dynorphin, and which is involved in the regulation of pain and reward mechanism (and thus in addiction). The discovery, pharmacology and structure – activity relationship of dynorphin are described in this manuscript as a review published in “Vitamins and Hormones”. GPCR activity requires a complex conformational dynamics and nuclear magnetic resonance (NMR) is an excellent technique allowing such characterization. However, it requires isotope labeling of the proteins of interest and most of GPCR structural studies used receptors expressed in insect cells. We produced KOP using an *E. coli* expression strategy, which is the tool of choice for isotope labeling. The recombinant receptor was successfully refolded in detergent micelles and was shown to be functional in terms of ligand binding. It offers new possibilities to study its structure and dynamics by NMR.

b) The growth hormone secretagogue receptor (GHSR) is naturally activated by ghrelin, a digestive peptide hormone of 28 amino-acids residues. This hormone – receptor system is involved in a multitude of physiological process such as the regulation of food intake, growth hormone secretion and glucose homeostasis. However, structural information about peptide – GPCR interaction is sparse because of the difficulty in crystallizing such complexes. Using a perdeuterated receptor expressed in *E. coli* and refolded in lipid nanodiscs in the group of J.L. Banères (IBMM, Montpellier), we used several liquid state NMR techniques (^{15}N relaxation, transferred NOE, saturation transfer difference) to characterize the 3D structure and dynamics of ghrelin bound to GHSR. Our work particularly shed the light on the role of a post-translational modification (acylation on Ser 3) on the receptor specific recognition mechanism.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse dans l'équipe de « RMN biologique intégrative » sous la direction de Alain Milon, professeur de l'université de Toulouse III - Paul Sabatier, et de Pascal Demange, directeur de recherche au CNRS. Je tiens à les remercier chaleureusement pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet, pour les précieuses connaissances qu'ils m'ont transmises et pour le soutien qu'ils m'ont apporté au long de ces quatre années.

Je voudrais également adresser mes plus sincères remerciements aux rapporteurs Carine Van-Heijenoort et Guillaume Lebon pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer cette thèse ainsi qu'aux examinateurs Jérôme Boisbouvier et Maryelle Tropis pour avoir accepté de participer au jury de mon doctorat. Je souhaite aussi remercier Lionel Moulédous et Célia Plisson pour avoir suivi mon travail dans le cadre de mon comité de thèse et pour les conseils qu'ils m'ont apportés.

Je tiens aussi à remercier sincèrement l'ensemble des collaborateurs extérieurs à l'IPBS pour leur implication, leur aide et les discussions très enrichissantes que nous avons eues. Je remercie Jean-Louis Banères et les membres de son équipe (IBMM, Montpellier) Maxime Louet, Bartholomé Delort, Céline M'Kadmi, Marjorie Damian, Pedro Renault, Sonia Cantel, Laurent Gavara, Jacky Marie, Jean-Alain Fehrentz et Nicolas Floquet. Le travail que nous avons réalisé ensemble représente une expérience scientifique et humaine très importante à mes yeux. Je remercie aussi Vadim Cherezov, Raymond Stevens et leurs équipes (USC, Los Angeles) pour leur accueil chaleureux dans leur laboratoire et tout ce que j'ai appris à leur côté. Je voudrais en particulier remercier Anna Shiriaeva, Jeffrey Velasquez et Andrii Ishchenko dont l'aide m'a été précieuse.

J'ai bien sûr une pensée particulière pour l'ensemble des membres de l'équipe de RMN de l'IPBS avec qui j'ai eu la chance de travailler et que je remercie chaleureusement. Je suis reconnaissant envers Alain Milon et Olivier Saurel pour les connaissances qu'ils m'ont transmises en RMN et plus généralement en biophysique, Pascal Demange pour tout ce qu'il m'a appris en biochimie et biologie moléculaire, Georges Czaplicki pour m'avoir enseigné le calcul de structure et pour m'avoir initié à la modélisation moléculaire, Isabelle Muller pour m'avoir mis le pied à l'étrier de la pharmacologie moléculaire et de la manipulation de la radioactivité et Virginie Gervais pour son aide avec les expériences d'ITC. J'adresse aussi mes sincères remerciements à Matthieu Chavent, Pascal Ramos, Valérie Réat, Guillaume Nars,

Marie Renault, Hang Yang, Margaux Cescato, Morgane Adélaïde, Grégoire Menchon, Jean-Baptiste Izquierdo, Adrien Schahl, Nathalie Doncescu, Clément Birbes, Justin Teissié, et Nicolas Richet. Merci à chacun d'entre vous pour les instants que nous avons partagés durant ces quatre années et pour tout ce que vous m'avez appris.

Je tiens aussi à remercier sincèrement les enseignants de biochimie de l'université de Toulouse III - Paul Sabatier qui m'ont transmis leur passion pour la science et la recherche fondamentale, notamment Maryelle Tropis, Hugues Chap, Jean-Charles Portais, Georges Czaplicki, Isabelle Muller, Marie Renault, Samuel Tranier, Cécile Bon et Laurent Maveyraud. Je voudrais à ce propos remercier à nouveau Alain Milon pour le rôle majeur qu'il a joué au long de mon parcours universitaire. Son enthousiasme ainsi que la grande confiance et le soutien qu'il m'a accordés depuis la licence jusqu'à la recherche de mon projet post-doctoral sont particulièrement précieux à mes yeux.

Lors de ce doctorat, j'ai également eu l'opportunité d'être moniteur à la faculté de pharmacie de Toulouse. Ce premier contact avec l'enseignement a été une expérience très enrichissante et je voudrais remercier Cécile Bon, Julie Rima et Harold Duruflé avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Enfin, je souhaite adresser mes remerciements à l'université de Toulouse III - Paul Sabatier, à l'agence nationale de la recherche et au CNRS pour le financement de mon doctorat et des projets associés ainsi que l'ensemble des personnels techniques et administratifs du laboratoire et de l'université pour leur soutien.

Table des matières

Chapitre I : Introduction	1
I. Les récepteurs couplés aux protéines G : enjeux en biologie structurale.....	3
I.1. Ligands et architecture générale des RCPG	3
I.2. Activité de signalisation	6
I.3. Structures des récepteurs et des complexes de signalisation	9
I.4. Rôle de la dynamique conformationnelle dans la transduction du signal	13
I.5. Enjeux et objectifs de la thèse	18
II. Méthodologie pour l'étude des RCPG et de leurs ligands par RMN en solution	21
II.1. Expression et marquage isotopique des RCPG	21
II.2. Milieux mimant la membrane plasmique pour des études en solution	24
II.3. Stratégie des expériences RMN	26
III. Les systèmes RCPG – neuropeptides étudiés dans cette thèse.....	31
III.1. La ghréline et son récepteur	31
III.2. La dynorphine et son récepteur.....	34
Chapitre II : Publication I : « Structure et dynamique de la dynorphine et de son récepteur »	35
Abstract.....	37
I. Dynorphin: a neuropeptide involved in pain, addiction and mood regulation.....	38
II. The molecular mechanism of action of dynorphin: research and hypotheses prior to KOP cloning	41
III. KOP cloning, site-directed mutagenesis and heterologous expression systems	44
IV. Structure and dynamics of dynorphin and its receptor based on experimental 3D structures.....	46
V. Building 3D models of dynorphin-KOP complexes.....	50
VI. Development of novel KOP ligands based on structural knowledge	52
VII. Conclusions and future perspectives	53
Chapitre III : Production du récepteur κ opioïde humain chez la bactérie	67
I. Contexte	69

II. Expression en corps d'inclusion chez <i>E. coli</i>	69
III. Purification et renaturation <i>in vitro</i>	72
III.1. Premiers essais de purification et renaturation en DDM – CHS	72
III.2. Test RMN d'interaction avec la dynorphine.....	74
III.3. Optimisations préliminaires	76
III.4. Essais avec des micelles LMNG – CHS	77
III.5. Elimination d'IN5 et finalisation du protocole en DDM – CHS	80
IV. Essais de cristallisation de KOP et GHSR produits chez <i>E. coli</i>	82
V. Mise en place d'un test de liaison d'un ligand radioactif en micelles de détergent	86
VI. Conclusions	88
VII. Matériel et méthodes	89

Chapitre IV : Interaction de la ghréline avec son récepteur : implications structurales d'une modification post-traductionnelle essentielle 99

I. Contexte et résumé de la publication II : « Structure and dynamics of GPCR-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain »	101
II. Publication II.....	103
Abstract.....	104
Significance statement and introduction.....	105
Results.....	106
Discussion.....	116
Materials and methods	118
Detailed experimental procedures and supplementary data.....	121
III. Complément de la publication II : perspectives de modélisation tout-atome du complexe ghréline – GHSR.....	155

Chapitre V : Vers l'étude des neuropeptides au sein de complexes de haute affinité... 159

I. Contexte	161
II. Etude de la dynorphine liée à KOP activé par Nb39	162
II.1. Production de Nb39, mimétique de la protéine G _i pour KOP.....	162
II.2. Production de KOP-BRIL pour les expériences de RMN	164
II.3. Résultats des expériences de RMN	166
III. Conclusions	168

IV. Matériel et méthodes	169
Conclusions et perspectives	173
Annexes	183
Analyse des données RMN de relaxation du ^{15}N et de NOE transféré ^1H - ^1H	185
Stratégie de clonage pour l'expression de KOP chez <i>E. coli</i>	195
Séquence des protéines produites dans cette thèse	197
Production de KOP chez <i>E. coli</i>	203
Production de KOP à partir de membranes de cellules SF9	209
Production du nanobody 39	212
Conditions de cristallisation en LCP	214
Références	215

Abréviations

7TM : domaine à sept hélices α transmembranaires
A_{2A}AR : récepteur A_{2A} à l'adénosine
APJR : récepteur à l'apéline
ATP : adénosine triphosphate
 β_1 AR : récepteur β_1 adrénergique
 β_2 AR : récepteur β_2 adrénergique
BLT2 : récepteur au leucotriène B₄
BMRB : biological magnetic resonance data bank
BRET : bioluminescence resonance energy transfer
BRIL : apocytochrome b₅₆₂
cAMP : adénosine monophosphate cyclique
CG-REMD : coarse-grain replica exchange molecular dynamics
CMC : concentration micellaire critique
CHS : cholestéryl hémisuccinate
CPMG : séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DAG : diacylglycérol
DDM : n-dodécyl β -D-maltoside
DEER : double electron-electron resonance
DMSO : diméthylsulfoxyde
DO : densité optique
DOP : δ opioid receptor protein
DSS : acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
ERK : extracellular signal-regulated kinases
ESI : electrospray ionization
ETB : récepteur à l'endothéline
FRAP : fluorescence recovery after photobleaching
FRET : Förster resonance energy transfer
FSH : follicle-stimulating hormone
FT-IR : Fourier transform infra-red spectroscopy
GABA : acide gamma-aminobutyrique

GDP : guanosine diphosphate
GHSR : growth hormone secretagogue receptor
GLP-1R : glucagon-like peptide 1 receptor
GOAT : ghrelin O-acyl-transferase
GRK : G protein-coupled receptor kinases
GST : glutathion S-transférase
GTP : guanosine triphosphate
HA : human influenza hemagglutinin
HEK : lignée de cellule cancéreuses « human embryonic kidney »
HMQC : heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC : heteronuclear single quantum correlation
IGF-1 : insulin-like growth factor-1
IN5 : intégrine 5 α
ITC : isothermal titration calorimetry
IP₁ : inositol monophosphate
IP₃ : inositol triphosphate
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JNK : c-Jun N-terminal kinases
KOP : κ opioid receptor protein
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
LB : lysogeny broth
LC : liquid chromatography
LCP : lipidic cubic phase
LH : luteinizing hormone
LMNG : lauryl maltose néopentyl glycol
LRET : lanthanide resonance energy transfer
MALDI : matrix assisted laser desorption ionization
MAPK : mitogen activated kinase
MD : molecular dynamics
MES : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
mGlu5 : récepteur métabotrope au glutamate
MOP : μ opioid receptor protein
MS : mass spectrometry
MSP : membrane scaffolding protein

Nb : nanobody

NOE : effet overhauser nucléaire (trNOE désigne l'effet overhauser nucléaire transféré)

NOESY : expérience 2D avec transfert NOE

NOP : nociceptin opioid receptor protein

NTSR1 : récepteur à la neurotensine

OmpA (KpOmpA) : « outer membrane protein A » (de *Klebsiella pneumoniae*), domaine N-terminal membranaire noté NKp

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : phosphate buffer saline

PC2 : prohormone convertase 2

PDB : protein data bank

PEG : polyéthylène glycol

PIP₂ : phosphatidylinositol bisphosphate

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

POPG : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol

Protéase 3C : protéase dérivée du rhinovirus humain B14 aussi appelée PreScission

RCPG (ou GPCR) : récepteurs couplés aux protéines G (ou G protein-coupled receptor)

RGS : regulator of G-protein signaling

RMN (ou NMR) : resonance magnétique nucléaire (ou nuclear magnetic resonance)

RMSD : root mean square deviation

RMSF : root mean square fluctuation

RPE : résonance paramagnétique électronique

RP-HPLC : reverse phase high performance liquid chromatography

SDS : sodium dodécyl sulfate

SF9 : cellules d'insecte issues de *Spodoptera frugiperda*

SONICC : second order nonlinear imaging of chiral crystals

SPA : scintillation proximity assay

STD : saturation transfer difference

T4L : lysozyme du phage T4

TEV : protéase du « tobacco etch virus »

TFA : acide trifluoroacétique

TIS : triisopropylsilane

TM : hélice α transmembranaire (numérotée entre 1 et 7)

TOCSY : total correlated spectroscopy

TROSY : transverse relaxation optimized spectroscopy

TSH : thyroid-stimulating hormone

XFEL : X-ray free electron laser

Chapitre I
Introduction

I. Les récepteurs couplés aux protéines G : enjeux en biologie structurale.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires chez l'homme (1), avec environ 800 gènes identifiés comme codant pour un RCPG (et potentiellement plus de 1000, <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/GPCR-HGmod/>). Ces protéines participent à la communication cellulaire en reconnaissent un signal extracellulaire afin de transmettre l'information correspondante à l'intérieur de la cellule (2) (chap. 15, p. 852-870).

Ce signal est généralement une molécule diffusant dans le milieu extracellulaire, qui peut être un ligand endogène (235 récepteurs identifiés) comme un neurotransmetteur ou une hormone ou un ligand exogène comme avec les récepteurs olfactifs et gustatifs (423 récepteurs identifiés). Dans le cas de la rhodopsine, ce signal est un photon qui induit l'isomérisation d'un groupement prosthétique appelé rétinol. A ces récepteurs, s'ajoutent les RCPG dit « orphelins » dont le ligand n'a pas été identifié à ce jour (121 récepteurs). Au niveau intracellulaire, l'activité des RCPG consiste en l'induction d'une ou plusieurs cascades de signalisation qui peuvent être dépendantes ou indépendantes des protéines G. Elles aboutissent *in fine* à la modification des fonctions cellulaires. Cette activité étant stimulée ou inhibée par la liaison de leurs ligands extracellulaires, les RCPG assurent ainsi une fonction de transduction du signal au travers de la membrane plasmique.

Le rôle des RCPG dans la communication cellulaire en fait des acteurs prépondérants de la physiologie humaine ainsi que des cibles pharmacologiques particulièrement importantes (3). On estime en effet qu'environ 30% des drogues approuvées par l'agence américaine « food and drug administration » (FDA) agissent sur un RCPG. Aussi, environ 20% des molécules actuellement en essai clinique serait dirigées contre un nouvel RCPG cible. La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'activité des RCPG constitue donc un enjeu important de la biologie (et en particulier de la biologie structurale) qui est abordé dans ce manuscrit de thèse.

I.1. Ligands et architecture générale des RCPG.

Les RCPG sont des protéines membranaires intrinsèques qui possèdent une architecture commune constituée de sept hélices α transmembranaires (7TM) reliées par des boucles extracellulaires et intracellulaires (**figure 1a**) (4, 5). Plusieurs classes de RCPG ont été

identifiées et elles ne partagent qu'une très faible similarité de séquence entre elles (6). Chez l'homme, on distingue ainsi (1, 7) les RCPG de la famille de la rhodopsine (classe A), du récepteur à la sécrétine (classe B1), des récepteurs d'adhésion (classe B2), des récepteurs métabotropiques au glutamate (classe C) et des récepteurs « frizzled » et gustatifs 2 (classe F).

Il y a une importante diversité dans les modes de liaison des ligands extracellulaires entre ces classes (**figure 1a**) (4, 8). Par exemple pour le récepteur mGlu5, représentant de la classe C, le site d'interaction du glutamate est situé exclusivement sur un domaine extracellulaire structuré en position N-terminale du domaine 7TM (9, 10). Ce site de liaison de la molécule extracellulaire « signal » est qualifié d'orthostérique par opposition aux sites allostériques où peuvent interagir des modulateurs de l'activité de transduction du signal. Chez mGlu5, un site allostérique est localisé au sein du domaine 7TM. Au contraire, dans le cas du récepteur GLP-1R (classe B1), le glucagon-like peptide 1 possède un site orthostérique formé à la fois par le domaine 7TM, les boucles extracellulaires et un domaine extracellulaire N-terminal (11). Cette diversité de mode de liaison est aussi valable au sein de la classe A (4, 8), qui est de loin celle qui compte le plus grand nombre de RCPG (1) (719 au total, 197 si on ne compte pas les récepteurs orphelins et ceux reconnaissant des signaux exogènes). Pour cette classe, le site orthostérique est généralement situé dans le domaine 7TM (5). Il peut cependant impliquer les boucles extracellulaires et/ou la partie N-terminale comme dans le cas des récepteurs aux chimiokines ou ceux des hormones glycoprotéiques (TSH, LH, FSH) (12-14).

Entre les récepteurs de classe A, il y a une variabilité importante de la nature chimique des ligands endogènes (**figure 1b**) (15). Un groupe particulièrement important est celui des RCPG qui reconnaissent des peptides, avec plus d'une centaine de membres identifiés à l'heure actuelle. Ces récepteurs sont distribués dans les différents sous-groupes phylogéniques de la classe A (notés α , β , γ et δ) ainsi que dans la classe B1 (16) comme par exemple les récepteurs au glucagon ou à l'hormone parathyroïde. Leurs ligands peptidiques endogènes ont des tailles allant de 5 résidus d'acide aminé jusqu'à des tailles de protéines et peuvent être structurés ou désordonnés en solution. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement à deux neuropeptides dont les récepteurs appartiennent à la classe A : la ghréline, une hormone digestive qui interagit avec le récepteur sécrétagogue à l'hormone de croissance (GHSR), et la dynorphine qui appartient au groupe des peptides opioïdes endogènes et interagit préférentiellement avec le récepteur κ opioïde (KOP).

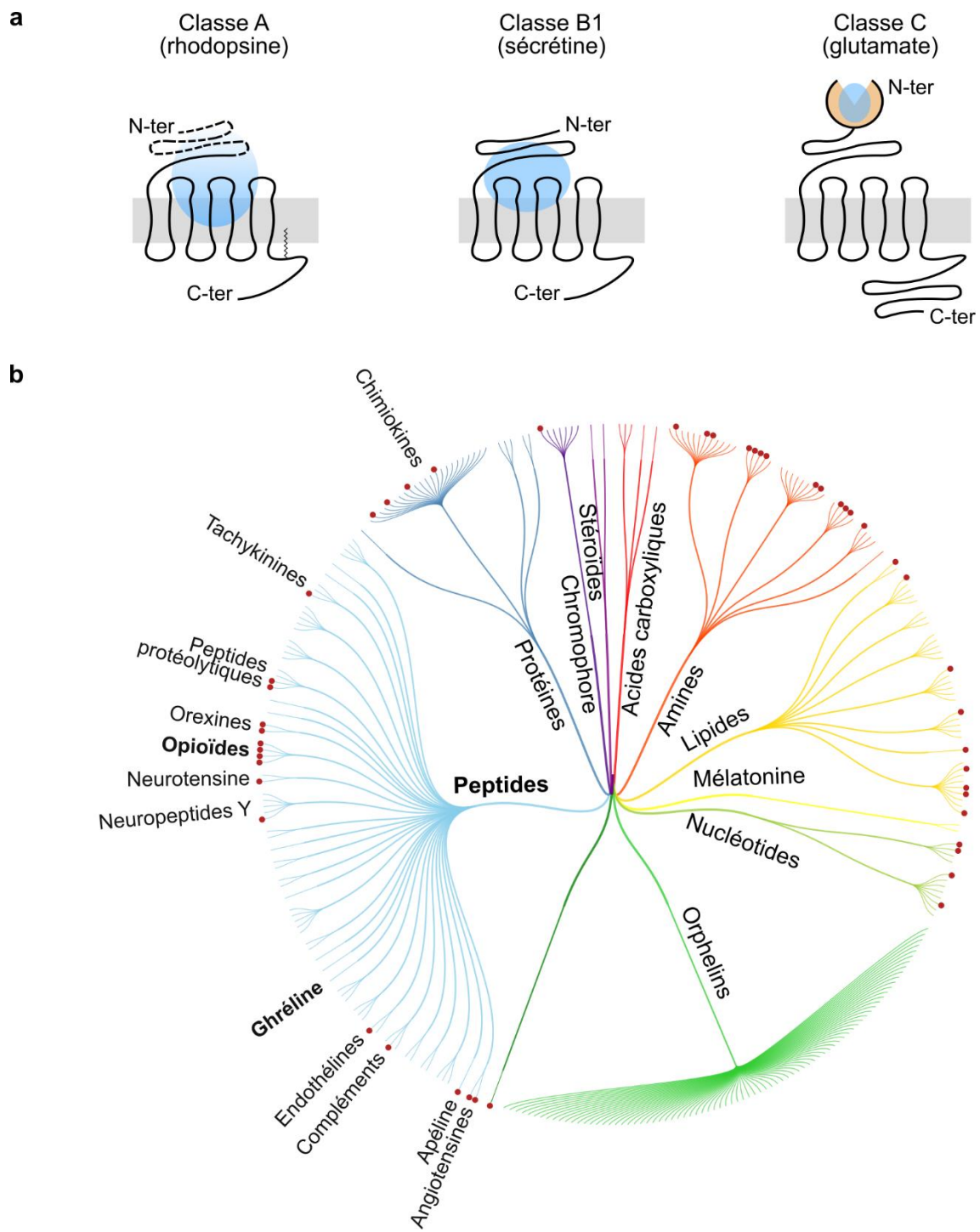


Figure 1. (a) Schéma de l'architecture de différentes classes de RCPG adapté de (4). Les classifications selon (6) et (7) sont indiqués ainsi que le positionnement des ligands orthostériques symbolisé en bleu. Pour la classe A, les pointillés indiquent l'importante variabilité de longueur de la région N-terminale. **(b)** Arbre regroupant les RCPG de classe A non-olfactifs par la nature chimique de leur ligand endogène ; adapté de GPCRdb (15). Les points rouges indiquent les récepteurs pour lesquels une structure 3D a été résolue et des exemples de ligands endogènes peptidiques ou protéiques sont présentés.

I.2. **Activité de signalisation.**

Si les ligands des RCPG et leurs modes de liaison sont extrêmement divers, l'activité de signalisation intracellulaire et les partenaires protéiques impliqués sont plus conservés (8, 17). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la variabilité de séquence des RCPG est supérieure dans la moitié extracellulaire du domaine 7TM que dans sa moitié intracellulaire (18).

La principale voie de signalisation est celle des protéines G hétéro-trimériques (**figure 2a**) (17, 19). Cette voie est la première à avoir été découverte ce qui a abouti au nom de cette famille de récepteurs (20). Ces protéines G sont constituées de trois sous-unités (α , β et γ) reliées au feuillet interne de la membrane plasmique par des ancres lipidiques sur les sous-unités α et γ (21). Dans son état lié au GDP, la sous-unité α forme un complexe inactif avec le dimère indissociable $\beta\gamma$. Suite à l'activation d'un RCPG, son interaction avec une protéine G catalyse l'échange du GDP par du GTP, ce qui entraîne la dissociation de la sous-unité α . Sous cette forme, la sous-unité α et l'hétéro-dimère $\beta\gamma$ interagissent avec différents effecteurs secondaires dont ils régulent l'activité (19, 22). Il existe différentes protéines G qui stimulent ou inhibent des effecteurs spécifiques comme l'adénylate cyclase ou certains canaux ioniques (**figure 2b**). L'effet cellulaire de l'activation d'un RCPG dépendra donc du type de protéine G avec laquelle il est spécifiquement couplé. L'activité de signalisation prend ensuite fin car la sous-unité α de la protéine G possède une activité d'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui permet au système de revenir à l'état initial. Cette activité GTPasique est modulée par des protéines appartenant à la famille des régulateurs de la signalisation par les protéines G (RGS).

Suite à leur activation, les RCPG peuvent également être phosphorylés au niveau de leur extrémité C-terminale et/ou de leurs boucles intracellulaires par des kinases (en particulier les G protein-coupled receptor kinases, GRK) (23), ce qui favorise leur interaction avec des protéines cytosoliques, les arrestines (**figure 2a**) (17, 24, 25). Cela a pour conséquence de découpler les RCPG de leur protéine G et provoque l'internalisation des récepteurs. Après internalisation, le récepteur pourra être soit dégradé soit ré-adressé à la membrane plasmique. Au-delà de cette fonction d'arrêt de la signalisation via les protéines G, les interactions RCPG – arrestines sont impliquées dans des voies de signalisation à part entière et ceux, indépendamment des protéines G. Ces voies de signalisation impliquent en particulier des « mitogen activated kinase » (MAPK) telles que ERK, JNK et p38 dont les effecteurs en aval contrôlent par exemple la transcription de gènes ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire (26).

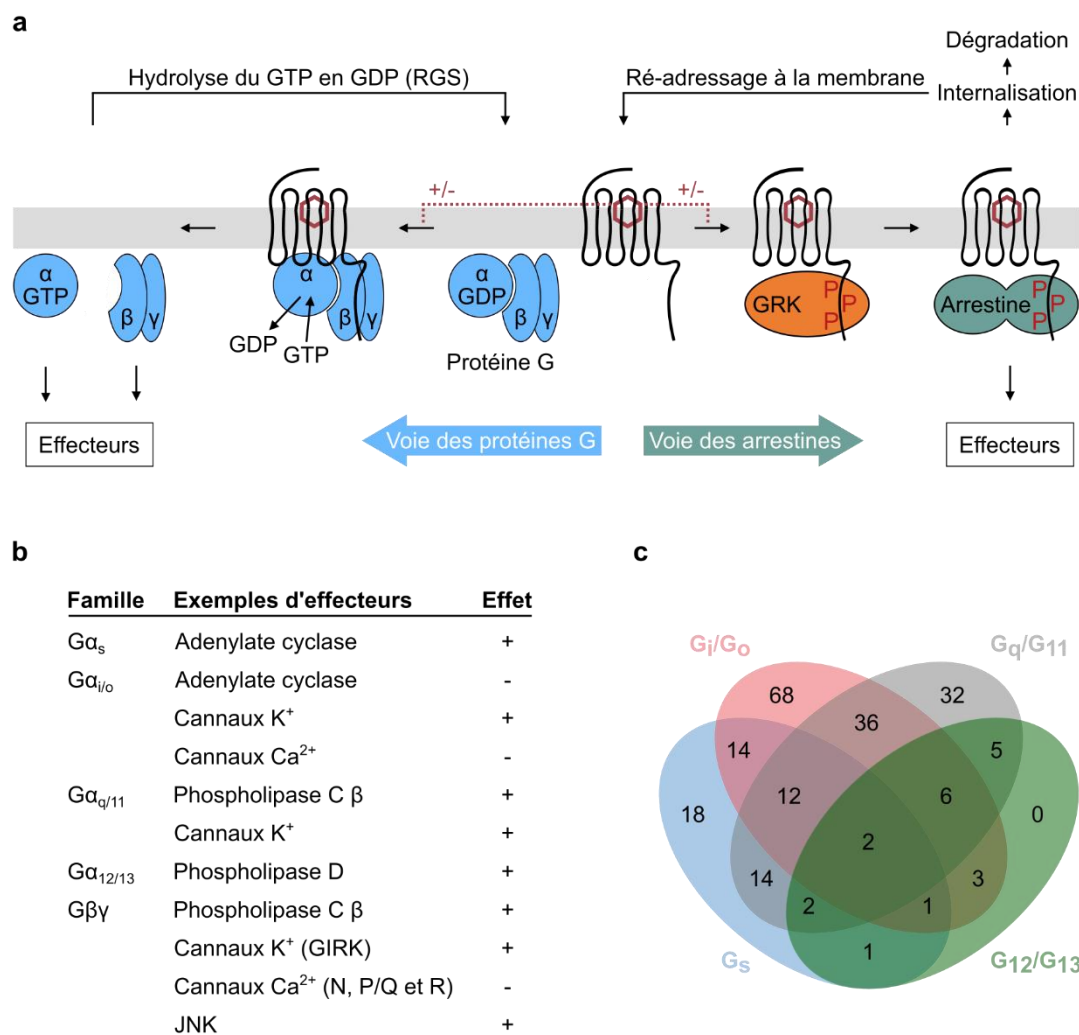


Figure 2. (a) Schéma de la signalisation intracellulaire des RCPG représentant les voies des protéines G et des arrestines. Un ligand orthostérique modulant cette activité de signalisation est représenté par un hexagone rouge. (b) Tableau présentant des exemples d'effecteurs de différentes familles de protéines G. L'effet activateur (+) ou inhibiteur (-) de ces dernières est indiqué ; d'après (19). (c) Diagramme de Venn montrant le nombre de RCPG de classe A couplant un ou plusieurs type de protéine G ; d'après GPCRdb (15).

Bien que relativement conservée, l'activité de signalisation intracellulaire des RCPG n'en est pas moins complexe et dépendante du contexte cellulaire (8). Une raison à cela est la capacité de certains RCPG à coupler plusieurs types de protéines G (**figure 2c**) via des interactions de plus ou moins forte affinité (27). La réponse cellulaire sera également affectée par le niveau d'expression des partenaires de signalisation (protéines G, RGS, GRK, arrestines et effecteurs secondaires) (28) ainsi que la régulation de leurs activités et l'interconnexion de ce système avec d'autres voies de signalisation comme celles des récepteurs tyrosine kinase (29). De plus, le trafic intracellulaire des RCPG est un phénomène complexe et ces récepteurs sont retrouvés au niveau de différentes membranes intracellulaires (comme par exemple la membrane nucléaire) où ils peuvent avoir une activité de signalisation (30). Cette activité serait aussi dépendante de l'organisation latérale des récepteurs, de leurs partenaires de signalisation et des lipides au sein des membranes (31). Enfin, il est important de noter que les RCPG possèdent généralement une activité de signalisation dite constitutive (28). Il s'agit d'un niveau d'activité partiel observé en l'absence de stimulation par un signal extracellulaire et qui est modulé par les ligands orthostériques de différentes manières (**figure 3**) (32). Les ligands dits agonistes pleins stimulent l'activité jusqu'à son niveau maximum, les agonistes partiels le font jusqu'à un niveau intermédiaire et les agonistes inverses l'inhibent. Il existe également des antagonistes qui se lient au site orthostérique mais ne modifient pas l'activité constitutive. Aussi, certains ligands peuvent être « biaisés » et moduler différenciellement une voie de signalisation par rapport à une autre (33). Cette propriété a par exemple été exploitée dans la découverte d'analgésiques opioïdes avec des effets indésirables diminués (34). Ces molécules sont des agonistes biaisés du récepteur μ opioïde MOP qui stimulent la signalisation via la protéine G_i qui produit l'analgésie mais pas celle via les arrestines qui produit détresse respiratoire et constipation.

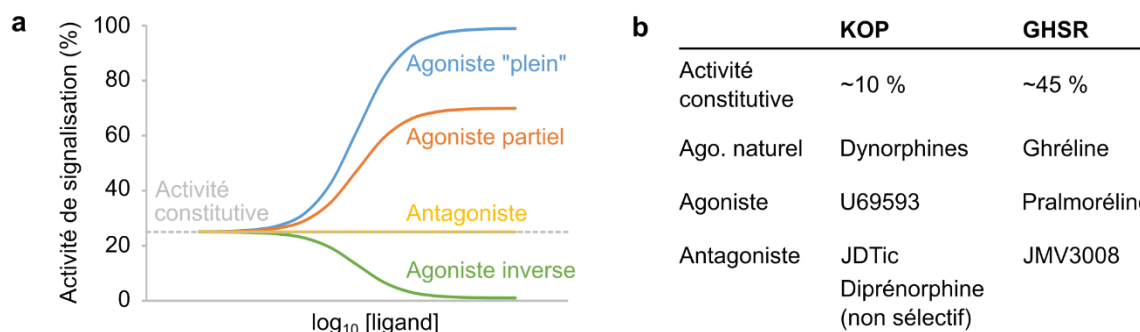


Figure 3. (a) Schéma de l'effet de différents types de ligand sur l'activité de signalisation d'un RCPG. (b) Exemples de ligands des récepteurs κ opioïde (KOP) et à la ghréline (GHSR) (1, 35, 36). Les ligands de KOP peuvent être spécifiques de ce récepteur ou posséder une affinité comparable pour d'autres récepteurs opioïdes (μ et δ dans le cas de la diprénorphine) (voir chapitre II (35)).

I.3. Structures des récepteurs et des complexes de signalisation.

De nombreuses études structurales ont été menées dans le but de décrire l'activité des RCPG au niveau moléculaire (5, 18, 32). La détermination structurale des RCPG n'a cependant pas été aisée et a mobilisé la communauté scientifique pendant plusieurs années. Ce sont tout d'abord des protéines membranaires, difficiles à purifier et à surexprimer de façon fonctionnelle. Ces protéines possèdent en outre un espace conformationnel complexe. L'obtention de cristaux qui diffractent à haute résolution nécessite donc de piéger le récepteur dans une conformation unique. Les RCPG sont aussi d'une taille « intermédiaire » (40 à 100 kDa selon le modèle membranaire utilisé) qui limite à la fois les possibilités d'expériences de RMN en solution et l'obtention d'un contraste suffisant en cryo-microscopie électronique. Cependant, d'importants développements méthodologiques réalisés depuis le début des années 2000 (37) ont conduit à la résolution de 321 structures pour 62 récepteurs (15) à partir de 2007 (sans compter la structure de rhodopsine publiée en 2000 qui est un cas particulier car purifiée à partir d'une source naturelle abondante (38)). La plupart d'entre elles ont été obtenues par cristallographie et concernent des RCPG de classe A (285 structures, 52 récepteurs), généralement dans un état « inactivé » (en présence d'un antagoniste ou d'un agoniste inverse) et découplé d'une protéine de signalisation. Certaines structures ont également été obtenues en stabilisant une conformation « activée » en présence d'agoniste et de protéine G ou de mimétiques (32). Ces travaux ont conduit à l'attribution du prix Nobel de chimie en 2012 à R. Lefkowitz et B. Kobilka. Plus récemment, des structures de RCPG d'autres classes ont été résolues, en particulier de récepteurs de classe B (15, 39).

Les RCPG étant des protéines membranaires insolubles, ils sont purifiés en micelles de détergent où leur stabilité est limitée. L'utilisation de ligands de haute affinité au cours de la purification et de la cristallisation permet à la fois de favoriser une conformation unique du récepteur (32) (voir chapitre I.1.4) et de stabiliser ce dernier (40, 41). Des mutations ponctuelles peuvent également être utilisées dans le but d'augmenter cette stabilité, et permettent ainsi la cristallisation en détergent (42). Néanmoins, la plupart des structures cristallographiques ont été obtenues par reconstitution en phase cubique lipidique (LCP) (43, 44). Il s'agit d'une organisation de lipides en un réseau isotrope de bicouches dans lequel la stabilité des RCPG est améliorée. Les LCP permettent aussi la diffusion 3D des protéines membranaires et donc leur cristallisation. Des fusions protéiques (généralement dans la boucle intracellulaire 3 ou en N-terminal) sont également utilisées afin de générer des contacts intermoléculaires cristallins (45) (46) et les régions désordonnées N- et C-terminales sont généralement tronquées. Enfin, la

cristallographie des RCPG a bénéficié d'améliorations technologiques concernant les faisceaux de rayon X et l'acquisition des données de diffraction (37, 47).

Ces structures à haute résolution de complexes RCPG – ligands permettent en premier lieu une description détaillée des sites orthostériques et participent à la compréhension des mécanismes moléculaires de reconnaissance des ligands extracellulaires (5, 18). Ces structures fournissent des informations précieuses sur la spécificité de liaison pour un récepteur particulier, y compris au sein de certains groupes de RCPG. Un exemple de cela est le groupe des récepteurs aux opioïdes pour lesquels la structure inactivée a été résolue pour chacun des 4 sous-types (MOP, KOP, DOP et NOP) (48-51), ainsi que la structure activée pour MOP (52, 53) et KOP (54) (chapitre II (35)). L'organisation spatiale des sites de liaison explique notamment la sélectivité du récepteur à la nociceptine NOP pour des ligands distincts de ceux des autres récepteurs opioïdes avec lesquels il partage pourtant une similarité de séquence élevée (~60%). Ces informations peuvent notamment être exploitées pour la conception de nouveaux ligands de RCPG, par exemple via l'utilisation de criblages virtuels (34, 55, 56).

Concernant les récepteurs ayant un peptide pour ligand endogène, la structure de 22 d'entre eux a été résolue à l'heure actuelle (15). Cependant, ces structures ont été obtenus dans la majorité des cas en complexe avec une petite molécule organique car la co-cristallisation avec un peptide se révèle souvent difficile (16). Une raison probable est une certaine flexibilité des peptides nuisant au processus de cristallisation. Des structures de RCPG ont néanmoins été obtenues en complexe avec leur ligand peptidique endogène ou une molécule analogue (**figure 4a**) et révèlent les détails de ces interactions. Les modes de liaison observés sont assez variés que ce soit concernant la zone du récepteur engagée dans l'interaction ou la conformation que le ligand adopte.

Certaines structures de RCPG activés ont été obtenues en présence d'agoniste et en complexe avec une protéine G (sept structures) (15, 32). Pour d'autres, des mimétiques de protéine G ont été utilisés tels que des anticorps de camélidés appelés nanobodies (Nb). Récemment, la cryo-microscopie électronique a aussi contribué de façon significative à l'obtention de structures de RCPG activés (six depuis Mai 2017 (15)). En effet, certains développements méthodologiques (57) (dont l'utilisation de méthodes de contraste de phase avancées) ont permis l'étude de complexes avec une protéine G qui sont d'une taille suffisamment élevée. La comparaison des structures activées et inactivées a fourni des informations cruciales concernant le mécanisme d'activation des RCPG et leur interaction avec les protéines G. Notamment, le récepteur β_2

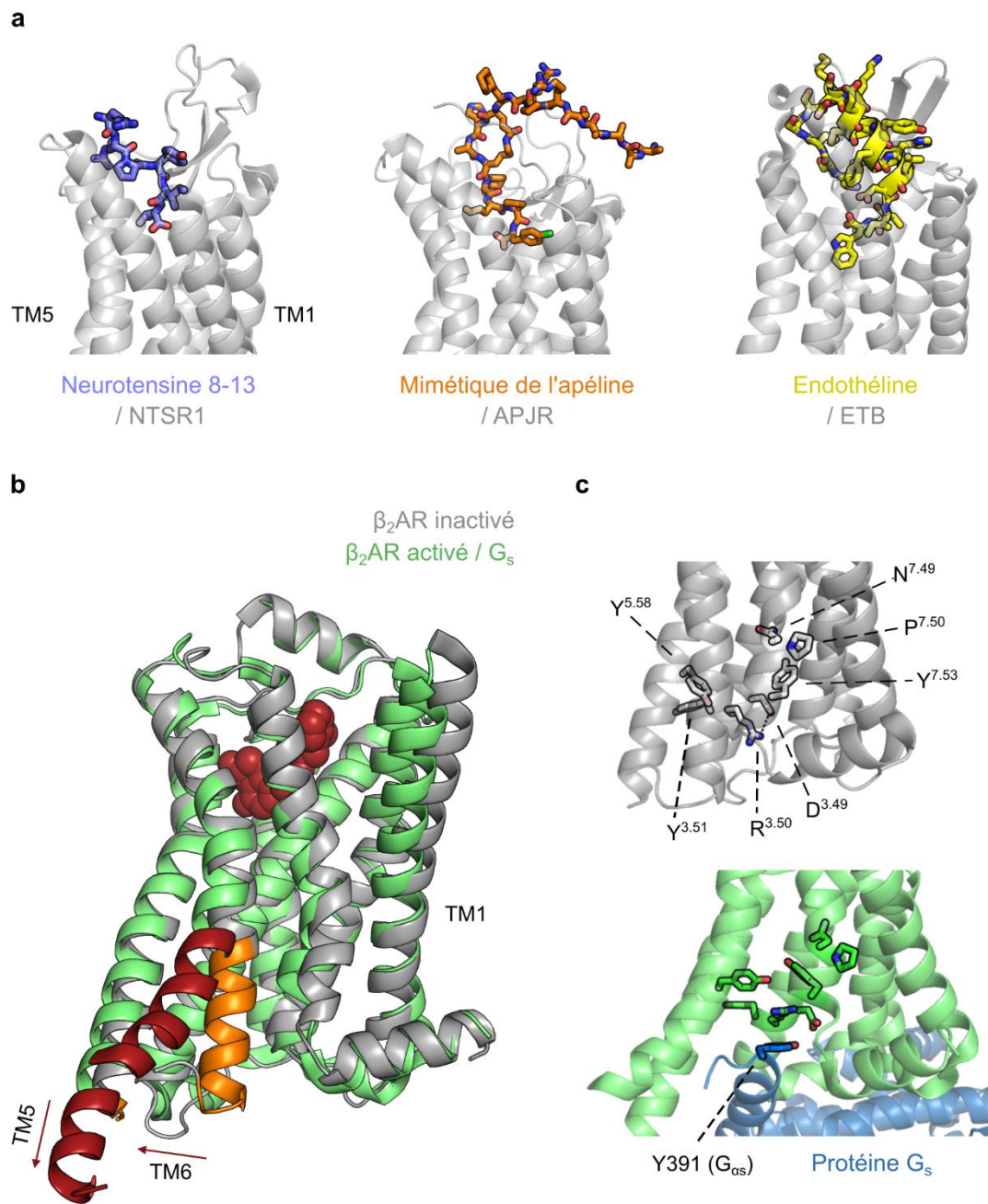


Figure 4. (a) Structures révélant l'interaction entre un RCPG et son ligand peptidique endogène ou une molécule mimétique. Complexes neurotensine 8-13 avec NTSR1, PDB 4GRV (58) ; analogue contraint de l'apéline avec APJR, PDB 5VBL (59) ; endothéline avec ETB PDB 5GLH (60). (b) Superposition de structures de β_2 AR. En gris : récepteur inactivé lié à un agoniste inverse, PDB 2RH1 (61). En vert : récepteur activé lié à un agoniste et à la protéine G_s , PDB 3SN6 (62). L'agoniste est représenté par des sphères rouges et les extrémités de TM5 et TM6 qui subissent des changements conformationnels importants sont colorés en orange pour la structure inactivée et en rouge pour la structure activée. (c) Réorganisation des motifs conservés D/ERY et NPxxY lors de l'interaction de β_2 AR avec la protéine G_s . Les résidus d'acide aminés du récepteur sont numérotés selon la nomenclature de Ballesteros-Weinstein (63).

adrénergique (β_2 AR) est une référence pour laquelle plusieurs structures ont été obtenues à haute résolution dont celle de son état inactivé lié à un agoniste inverse (61) (structure cristallographique à 2.4 Å de résolution) et de son état activé en complexe avec un agoniste et la protéine G_s (62) (structure cristallographique à 3.2 Å de résolution) (**figure 4b**).

En relation avec la multiplicité des ligands des RCPG et la similarité de leurs activités de signalisation, on observe une diversité de réarrangements structuraux qui convergent au niveau du site de liaison des partenaires intracellulaires (64). Le processus d'activation implique d'importants changements conformationnels dans la partie intracellulaire des RCPG, en particulier de larges mouvements des hélices transmembranaires 5 et 6 (TM5 et TM6) (5, 32). Ces modifications « ouvrent » le récepteur pour former le site de liaison pour la protéine G, et constitueraient une propriété commune des RCPG (y compris hors de la classe A (11, 57)). Elles sont accompagnées de la réorganisation de motifs hautement conservés tels que D/E^{3.49}-R^{3.50}-Y^{3.51} et N^{7.49}-P^{7.50}-X-X-Y^{7.53} (**figure 4c**) (numérotation selon la nomenclature de Ballesteros-Weinstein (63) où le premier nombre indique le numéro de l'hélice transmembranaire). Au niveau des sites de liaison des ligands extracellulaires, les changements structuraux entre les conformations activées et inactivées sont beaucoup plus subtils. La géométrie de ces sites est par contre assez variable d'un récepteur à l'autre ainsi que les changements structuraux ayant lieu lors de l'activation (5, 32). Plusieurs exemples (53, 54, 62, 65) indiquent cependant qu'une légère contraction de ces sites serait une propriété conservée, accompagnant « l'ouverture » de la face extracellulaire du récepteur. Enfin, différentes réorganisations d'interactions intra-récepteur plus ou moins conservées (5, 32) (par exemple la réorientation du résidu W^{6.48} ou la réorganisation d'un réseau polaire impliquant des molécules d'eau (53)) permettraient de coupler les sites de liaison du ligand et de la protéine G.

Au-delà de l'activation des récepteurs, les études structurales réalisées et à venir visent à décrire le fonctionnement des complexes de signalisation responsables de l'activité des RCPG (17). Concernant la signalisation via les protéines G, des questions importantes demeurent : comment un ligand orthostérique du récepteur catalyse l'échange de GDP par du GTP et quels sont les déterminants de la spécificité pour un ou plusieurs sous-types de protéine G (G_s , G_i , G_q , *etc.*). Enfin, une autre problématique cruciale est la caractérisation structurale de l'interaction avec les GRK et les arrestines (66, 67). En effet, la description de ces interactions, qui sont les événements initiaux des activités de signalisation indépendantes des protéines G, devrait permettre de mieux comprendre l'action des ligands biaisés qui présentent un fort intérêt pharmacologique.

I.4. Rôle de la dynamique conformationnelle dans la transduction du signal.

Différents modèles d'activation des RCPG ont été proposés sur la base des premières données pharmacologiques. L'observation de deux populations de récepteur de basse et haute affinité pour un même ligand (en fonction de l'état de couplage à un partenaire de signalisation intracellulaire) a d'abord conduit à formuler le « modèle du complexe ternaire » (**figure 5a**) (68). Le ligand orthostérique (L) est en équilibre de liaison avec le récepteur (R) découplé (état de basse affinité) ou couplé (état de haute affinité) à la protéine G (G) ; ces deux états étant également en équilibre entre eux. Ce modèle a ensuite été enrichi par l'ajout d'un équilibre conformationnel entre deux formes inactivée (R) et activée (R*) du RCPG (« modèle ternaire étendu ») (**figure 5b**) (69). Cet équilibre peut être déplacé par le ligand, ce qui aboutit à la stimulation ou l'inhibition de l'activité de signalisation du récepteur. La possibilité de formation de complexes inactifs avec la protéine G a alors été intégrée dans le « modèle ternaire cubique » (**figure 5c**) (70).

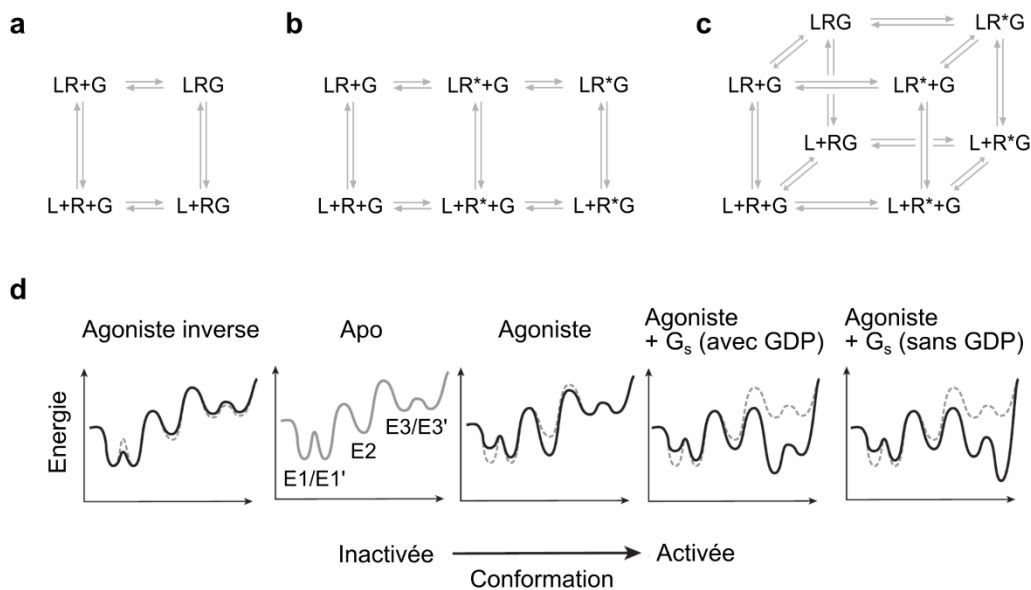


Figure 5. (a) Modèle du complexe ternaire (68), (b) modèle ternaire étendu (69) et (c) modèle ternaire cubique (70) d'activation des RCPG. L désigne le ligand orthostérique, R le récepteur et G la protéine G. Pour (b) et (c), R et R* désignent respectivement le récepteur inactivé et activé. (d) Schéma du « paysage » énergétique de β_2 AR en interaction avec différents partenaires adapté de (32).

Les études plus récentes ont ensuite montré que les RCPG sont des protéines extrêmement flexibles qui explorent en réalité un nombre important de conformations, au-delà des états inactivé et activé proposés par le modèle ternaire étendu et dont les propriétés structurales sont décrites dans la partie précédente (17, 55). L'objectif est donc de caractériser le « paysage énergétique » particulièrement complexe des RCPG (**figure 5d**) et la façon dont il est modifié lors de l'interaction avec leurs différents partenaires (32). Dans ce paysage, les structures obtenues par cristallographie et cryo-microscopie électronique correspondent à des puits de plus ou moins basses énergies (*i.e.* plus ou moins peuplés). Ces conformations sont en équilibre entre elles et la cinétique d'échange entre ces états dépend des barrières énergétiques qui les séparent.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a largement contribué à l'étude de la dynamique des RCPG (17, 32, 71). La masse moléculaire de ces récepteurs est relativement élevée et limite les expériences de RMN en solution que l'on peut appliquer. D'autant que ces études sont faites avec des récepteurs en micelles de détergent ou en nanodisques. A ce jour, aucune structure de RCPG n'a ainsi été obtenue par RMN en solution (15). Certaines méthodes (discutées dans la partie II de ce chapitre) permettent néanmoins d'étudier leurs échanges conformationnels et les interactions des RCPG avec leurs ligands (71). Des isotopes observables en RMN (^{19}F , ^{13}C ou ^{15}N) peuvent être introduits spécifiquement le long de la séquence d'un récepteur. Ce marquage peut être réalisé lors de l'expression et ne modifie pas l'activité de la protéine (par exemple avec l'incorporation de $^{13}\text{C}_\epsilon$ -méthionines) ou chimiquement (par exemple par réaction de trifluoroethanethiol ^{19}F sur des cystéines libres). Ces isotopes sont utilisés comme rapporteurs de leur environnement chimique local. Cela permet entre autres de mettre en évidence l'existence de différentes conformations, ainsi que leur populations respectives et d'estimer les vitesses d'échange entre ces états (71). De plus, des modifications structurales de très faible amplitude peuvent être détectées (72). On peut ainsi étudier de larges changements conformationnels comme ceux de l'hélice 6 mais aussi des modifications plus subtiles comme celles à proximité du site orthostérique (32).

L'étude de la dynamique conformationnelle des RCPG a également bénéficié de techniques autres que la RMN (17, 32). La spectroscopie de fluorescence a notamment fourni un certain nombre d'informations sur les RCPG et leurs partenaires de signalisation. Par exemple, des expériences de transfert d'énergie par résonance Förster (FRET en anglais) (73) et sa variante LRET (« lanthanide resonance energy transfer ») (74) ont permis de suivre des changements de distance entre deux sondes greffées sur un récepteur et/ou sa protéine G. Des expériences de BRET (« bioluminescence resonance energy transfer ») ont également été utilisées pour suivre

la dynamique de protéines G et d'arrestines (17). La résonance paramagnétique électronique (RPE) et notamment les expériences de double résonance électron-électron (DEER en anglais) (75, 76) ont également permis la détermination de distributions de distance entre deux sondes paramagnétiques fixées sur un récepteur. L'avantage de ces techniques est leur sensibilité ainsi que la possibilité de les appliquer à des analytes de masse moléculaire relativement importante comme un complexe RCPG – protéine G. En revanche, elles sont assez peu sensibles à des changements structuraux de faible amplitude.

Les techniques « structurales » peuvent également procurer des informations dynamiques (47). Bien que l'application aux RCPG soit actuellement limitée, cela ouvre des perspectives prometteuses. La microscopie électronique a par exemple permis de mettre en évidence de larges mouvements de domaines au sein des protéines G (57, 77), qui sont impliqués dans l'échange du GDP par le GTP. Ces expériences peuvent aboutir à la détermination structurale des conformères observés (78-80) bien que cette multiplicité conformationnelle ne facilite pas l'obtention de structures à haute résolution. L'utilisation d'accélérateurs linéaires d'électrons pour générer des faisceaux de rayons X extrêmement intenses (XFEL pour X-ray free electron laser) offre également de nouvelles opportunités pour la cristallographie résolue dans le temps (47). Pour des systèmes où il est possible de déclencher des changements conformationnels au sein d'un cristal, ces expériences peuvent fournir des cinématiques extrêmement précises de ces modifications structurales. Cela a pu être appliqué à la bactériorhodopsine (81), une protéine à sept hélices α transmembranaires qui n'est pas couplée aux protéines G.

Ici aussi, le β_2 AR a été le récepteur le plus étudié et fait office de référence (32, 71). Des expériences ont permis de sonder la dynamique du site de liaison de la protéine G (76, 82-86) (en particulier avec des rapporteurs de la conformation de l'hélice 6) et d'autres au niveau de la région reliant le site orthostérique et celui de la protéine G (87-89). Ces travaux ont révélé une multitude de conformations impliquées dans la signalisation via les protéines G (**figure 5d**) avec des états inactivés (notés E1 et E1'), un (ou des) état(s) intermédiaire(s) (E2) et des états activés (E3 et E3'). Ce paysage énergétique est modifié lors de l'interaction avec les différents partenaires. Ainsi, un agoniste favorise la signalisation via les protéines G en stabilisant l'état intermédiaire E2. L'état pleinement activé E3 n'est lui stabilisé qu'en présence à la fois de l'agoniste et de la protéine G. Un point particulièrement important est que l'on observe un couplage « faible » entre le site orthostérique et celui de la protéine G. En effet, la seule présence d'un agoniste stabilise une conformation intermédiaire distincte de celle de l'état pleinement activé. Aussi, la transition entre ces états d'activation n'est pas systématiquement

accompagnée de changements conformationnels dans la région reliant le site orthostérique et celui de la protéine G. Selon la position considérée dans cette région, des vitesses d'échange conformationnel différentes ont également été observées (71).

La **figure 6a**, illustre les résultats issus de l'une de ces études avec des spectres RMN de $^{13}\text{C}_\alpha$ -méthionines à différentes positions du récepteur $\beta_2\text{AR}$ (voir **figure 6b**) (87). Pour chaque méthionine, un pic rapporte une conformation en échange « lent » avec les autres conformations (*i.e.* avec un temps caractéristique supérieur à ~ 10 ms). La position du pic dépend de l'environnement chimique de la méthionine considérée dans cette conformation. M82^{2.53} (proche du site orthostérique) rapporte deux conformations inactivées en l'absence de ligand. En présence d'agoniste, ces conformations disparaissent au profit d'une conformation intermédiaire. L'environnement chimique de M82^{2.53} dans cette conformation intermédiaire est très similaire à celui dans la conformation activée obtenue en présence d'agoniste et d'un mimétique de la protéine G. Au contraire, l'environnement chimique de M215^{5.54} (plus proche du site de la protéine G) est distinct entre ces états intermédiaire et activé. Aussi, M215^{5.54} ne rapporte qu'une conformation pour l'état inactivé (du moins pour ce qui est d'un échange lent). Enfin, l'analyse de l'intensité des différents signaux obtenus dans cette étude suggère une certaine hétérogénéité structurale des états inactifs et intermédiaires avec de multiples sous-états en échange sur une échelle de temps « intermédiaire » (*i.e.* autour de 1 ms). Au contraire, l'état activé serait plus homogène.

La dynamique d'autres RCPG a également été examinée dont $\beta_1\text{AR}$ (72, 90), le récepteur au leucotriène BLT2 (91), celui à l'adénosine $\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ (92-95), et le récepteur μ opioïde MOP (96, 97) qui ont été étudiés par RMN en solution. Ces travaux indiquent que les propriétés dynamiques de $\beta_2\text{AR}$ sont conservées chez les autres RCPG. En effet, les autres récepteurs étudiés sont également présents sous de multiples conformations en équilibre entre elles, certaines étant des états intermédiaires dans le processus d'activation. Le couplage faible entre le site orthostérique et celui de la protéine G serait aussi un élément conservé. Certaines structures cristallographiques obtenues en l'absence de protéine G ou de mimétique vont également dans ce sens. En effet, ces structures partagent des caractéristiques des états inactivé et activé décrits dans la partie précédente (32). Par exemple, des structures de $\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ lié à des agonistes (98, 99) montrent le récepteur avec une organisation de la région de couplage correspondant à l'état activé mais avec une position de l'hélice 6 distincte de celle observée dans cet état. L'étude de la dynamique de récepteurs autres que $\beta_2\text{AR}$ a néanmoins révélé des

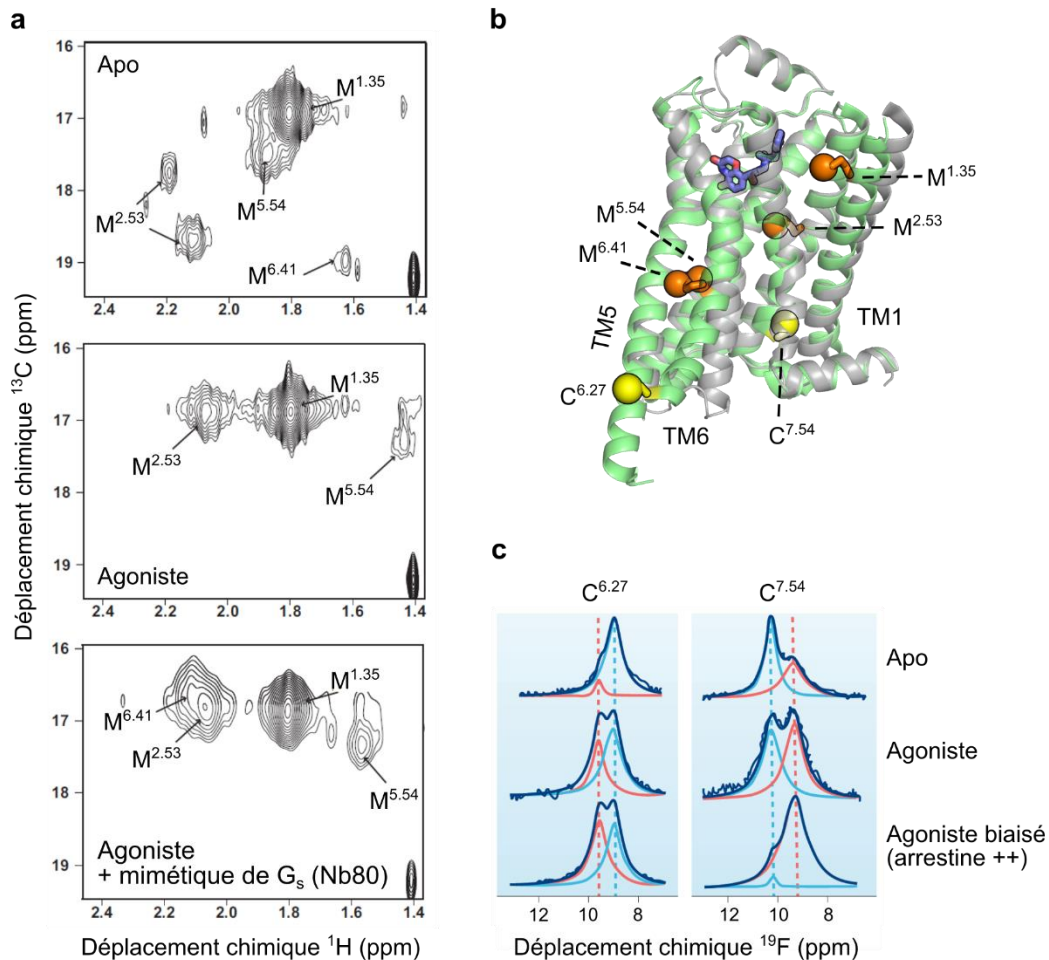


Figure 6. (a) Spectres ^1H - ^{13}C HSQC de $\beta_2\text{AR}$ marqué par des $^{13}\text{C}_\varepsilon$ -méthionines adaptés de (87). Le premier spectre correspond au récepteur seul, le deuxième a été enregistré en présence de l'agoniste BI-167107 et le troisième en présence de cet agoniste et du nanobody 80, mimétique de la protéine G_s . (b) Position des méthionines de (a) (en orange) et des cystéines marquées de (c) (en jaune) sur la structure activée de $\beta_2\text{AR}$ (en vert, PDB 3SN6 (62)) où le ligand est représenté en violet. La structure inactivée est présentée pour référence (en gris, PDB 2RH1 (61)). (c) Spectres de cystéines sur les hélices 6 et 7 de $\beta_2\text{AR}$ après marquage par modification chimique au ^{19}F adaptés de (71, 85). Les spectres ont été enregistrés en l'absence de ligand, en présence d'isoprotérénol (agoniste non-biaisé) ou d'isoétharine (agoniste biaisé vers la voie des arrestines). Les spectres expérimentaux sont en bleu foncé et ont été déconvolués par les spectres bleu clair et rouge. On peut noter que dans cette expérience, les états inactifs E1 et E1' schématisés dans la figure 5d ne sont pas dissociables.

paysages énergétiques divers. On observe en effet des différences de nombres d'états, de populations respectives ainsi que de vitesses d'échange.

Cette dynamique conformationnelle ne se limite pas à la formation du complexe RCPG – protéine G. En effet, le couplage entre le site orthostérique et celui de la protéine G se prolongerait au travers du complexe de signalisation jusqu'au site de liaison du GDP / GTP sur la protéine G (17). En plus d'initier l'activation du β_2 AR, ses ligands orthostériques régulent ainsi l'échange de GDP par du GTP par des modifications d'affinité pour la protéine G (73). Ceci est en relation avec l'observation de deux états activés de β_2 AR au sein du complexe avec la protéine G (notés E3 et E3' sur la **figure 5d**). Les protéines G possèdent elles-mêmes une dynamique conformationnelle propre impliquée dans le processus de signalisation (17, 100-102).

Enfin, la description du paysage énergétique des RCPG est aussi enrichie par des expériences qui ont portées sur la signalisation indépendante des protéines G. Par exemple, la **figure 6c** présente des spectres de sondes ^{19}F rapportant l'environnement chimique des extrémités intracellulaires des hélices 6 et 7 (85) (voir **figure 6b**). Cette étude s'est intéressée à l'effet de différents ligands orthostériques et a révélé des différences entre agonistes non-biaisé et biaisé. L'isoprotérénol (non-biaisé) induit la stabilisation de conformations des hélices 6 et 7 différentes de celles de l'état inactivé. Ces conformations stabilisées correspondent à un état intermédiaire. Avec l'isoprotérénol, on obtient des populations équivalentes pour les deux conformations observées. Avec l'isoétharine, qui stimule préférentiellement la signalisation via les arrestines, on observe un effet équivalent pour l'hélice 6 mais l'hélice 7 est entièrement stabilisée dans sa conformation « intermédiaire ». Ce travail ainsi qu'une étude du récepteur μ opioïde MOP (96) suggèrent qu'un équilibre entre de multiples conformations de la partie intracellulaire des RCPG est responsable de l'initiation des différentes voies de signalisation possibles. Des recherches sont aussi menées pour mieux comprendre l'effet de la phosphorylation par les GRK et l'interaction avec les arrestines (17, 103).

I.5. Enjeux et objectifs de la thèse.

Comme nous l'avons vu précédemment, la détermination de la structure de complexes entre les RCPG et leurs partenaires fournit de précieuses informations sur le mécanisme de reconnaissance des divers ligands ainsi que sur l'activité de transduction du signal au travers de la membrane plasmique. Les RCPG sont néanmoins des protéines flexibles et l'étude de leur dynamique interne est également essentielle à la compréhension de l'activité de ces récepteurs.

La description du fonctionnement des RCPG au niveau moléculaire nécessite donc la combinaison de différentes techniques de biologie structurale et de biophysique. Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé à l'application de la RMN en solution selon deux axes : **1.** la production d'un RCPG chez la bactérie pour son marquage isotopique et l'étude de sa dynamique par RMN et **2.** l'étude d'agonistes peptidiques liés à leur récepteur.

Axe 1. Nous avons vu que l'activation des RCPG passe par la modulation d'un paysage énergétique complexe. Les échanges conformationnels discutés dans la partie I.4. concernent principalement une dynamique « lente » (*i.e.* avec des temps caractéristiques supérieurs à 10 ms) mais la dynamique structurale des protéines a lieu sur une échelle de temps plus vaste allant de la picoseconde à l'heure (voir partie II. 3.). La description de cette dynamique « complète » est reliée à la thermodynamique des protéines. En effet, l'agitation « rapide » des protéines (*i.e.* inférieure à $\sim 1 \mu\text{s}$) autour d'une conformation moyenne donne lieu à une composante conformationnelle de leur entropie (la « largeur » des puits d'un paysage énergétique). Cette dernière a été reliée aux fonctions de couplage allostérique et d'interactions des protéines (104-107) et des études sur les RCPG indiquent que cette agitation est impliquée dans la formation des intermédiaires d'activation (82, 84, 92). Une des forces de la RMN est justement sa capacité à sonder des dynamiques sur cette vaste échelle de temps (voir partie II. 3.) (108, 109). Aussi, nous avons vu que la richesse du mécanisme d'activation des RCPG passe par les différences de dynamique des diverses régions de ces récepteurs. Multiplier les sites auxquels on peut sonder cette dynamique permet donc une meilleure description du fonctionnement de l'activité de signalisation (72, 95, 110).

Les expériences de RMN permettant d'étudier la dynamique à différentes échelles de temps et en un maximum de positions du récepteur nécessitent la production de RCPG avec différents marquages isotopiques (en particulier un marquage uniforme au ^2H). Nous avons donc appliqué au récepteur κ opioïde humain (chapitre III), une stratégie de production chez la bactérie établie par l'équipe de notre collaborateur Jean-Louis Banères (Institut des biomolécules Max Mousseron, Montpellier) (74, 91, 111). Nous avons choisi cette stratégie en raison des nombreuses possibilités de marquage isotopique qu'offre l'expression bactérienne (112).

Axe 2. Nous avons vu qu'un nombre important de RCPG avait pour ligand endogène un peptide. S'il est crucial de comprendre les mécanismes moléculaires de reconnaissance des ligands endogènes, les données structurales sur l'interaction peptide – récepteur sont à ce jour limitées. Cela est dû à la difficulté de cristalliser ces complexes, potentiellement en raison de la flexibilité des peptides. Les récents développements de la cryo-microscopie électronique offrent

de nouvelles possibilités pour la détermination de complexes ternaires peptide – RCPG – protéine G (52). De façon complémentaire, la RMN en solution est un outil de choix pour étudier les interactions peptide – RCPG (avec ou sans protéine G). Elle permet en effet de caractériser à la fois la structure et la dynamique des agonistes peptidiques endogènes dans l'état lié (16, 71, 113) (chapitre II (35)).

Nous avons utilisé cette méthode pour étudier la liaison de la ghréline sur son récepteur (chapitre IV : publication II (114)). Notre travail sur cette hormone peptidique a en particulier mis en lumière le rôle d'une modification post-traductionnelle essentielle dans la stabilisation de la conformation liée de ce peptide. Suite à un travail précédent réalisé par l'équipe sur l'interaction entre la dynorphine et le récepteur κ opioïde (113), nous avons également mené une étude préliminaire sur l'éventuelle modulation de la structure et de la dynamique du ligand lié par l'état d'activation du récepteur (chapitre V). Ce travail a été mené en collaboration avec le groupe de Vadim Cherezov (University of Southern California, Los Angeles).

II. Méthodologie pour l'étude des RCPG et de leurs ligands par RMN en solution.

II.1. Expression et marquage isotopique des RCPG.

De nombreux systèmes ont été employés pour l'expression des RCPG (115, 116), et nous nous concentrerons ici sur ceux ayant permis leur caractérisation par RMN en solution (**table 1**) (71). La grande majorité des études de biologie structurale des RCPG a été réalisée en exprimant le récepteur en cellules d'insecte sous forme fonctionnelle à l'aide de vecteurs dérivés des baculovirus, les cellules les plus utilisées étant les cellules « SF9 » issues de *Spodoptera frugiperda* (71, 115, 116). Les modifications post-traductionnelles et la composition de la membrane plasmique n'y sont pas identiques aux cellules de mammifère* (117). La membrane contient cependant une faible concentration de cholestérol (connu pour stabiliser certains RCPG) et ces cellules permettent des rendements de production suffisant. De plus, les RCPG sont généralement fonctionnels dans les membranes des cellules d'insecte, à la fois en terme de liaison des ligands et d'activation des protéines G. Si les cellules de mammifère constituent en principe le système d'expression idéal, les cellules d'insecte sont préférées pour la biologie structurale, principalement en raison des quantités importantes de protéine requises (115).

L'expression des RCPG en cellule d'insecte est l'un des développements méthodologiques qui a abouti au nombre important de structures cristallographiques déterminées (15). Pour l'étude de la dynamique des RCPG par RMN, ce système a aussi été majoritairement utilisé (**table 1**) (71). Il présente néanmoins l'inconvénient que le marquage isotopique y est difficile et coûteux. En effet, les cellules d'insecte sont cultivées en milieu riche où les sources d'azote et de carbone sont multiples. Une des stratégies utilisées consiste à effectuer un marquage isotopique par modification chimique après purification du RCPG. Cela a permis d'incorporer des sondes $^{13}\text{CH}_3$ par méthylation réductive de lysines, ou des sondes portant un ^{19}F par oxydation de cystéines libres (71). Les inconvénients de ces modifications chimiques sont que le nombre de région du récepteur dont on peut sonder la dynamique est limité et que la modification introduite sur la protéine peut aussi influencer son activité. Une autre stratégie, qui a récemment connue des développements importants, est d'utiliser un milieu de culture déficient en certains acides aminés (ou tous) et d'introduire des acides aminés marqués. On peut alors réaliser des marquages uniformes (118) ou spécifiques de certains acides aminés (par exemple avec des $^{13}\text{C}_\epsilon$ -méthionines) (71).

* Il convient ici de noter que les RCPG ne sont pas uniquement présents chez les mammifères, c'est cependant ce groupe de récepteur qui est de loin le plus étudié.

Récepteur	Hôte d'expression	Marquage isotopique observable	Deutériation	Références
β₂AR	Cellules d'insecte	¹⁹ F, cystéines modifiées	Non	(18, 76, 82, 85, 119, 120)
		¹³ CH ₃ , lysines modifiées	Non	(121)
		¹³ CH ₃ -méthionines	Non	(87, 88)
		¹³ CH ₃ -méthionines	Oui, certains acides aminés	(89, 103)
β₁AR	Cellules d'insecte	¹⁵ N-valines	Non	(72)
		¹³ CH ₃ -méthionines	Non	(90)
MOP	Cellules d'insecte	¹³ CH ₃ , lysines modifiées	Non	(97)
		¹³ CH ₃ -méthionines	Oui, certains acides aminés	(96)
A_{2A}AR	<i>P. pastoris</i>	¹⁹ F, cystéines modifiées	Non	(93, 94)
		¹³ CH ₃ -isoleucines	Oui	(92)
		Uniforme ¹⁵ N	Oui	(95)
BLT2	<i>E. coli</i>	¹³ CH ₃ -isoleucine et ¹³ CH ₃ -méthionines	Oui	(91)

Table 1. Expression et marquage isotopiques des RCPG dont la dynamique a été étudiée par RMN en solution. Adapté de (71) avec les informations issues des références indiquées dans le tableau.

La taille importante des RCPG rend aussi particulièrement profitable la deutériation des sites que l'on ne souhaite pas observer (voir partie II. 3.) (71). S'il est difficile de réaliser un marquage uniforme au ²H en cellules d'insecte, certains travaux constituent cependant d'importantes avancées. Il s'agit d'ajouter des acides aminés deutériés à un milieu de culture déficient (89, 96, 103). Ces acides aminés peuvent être obtenus à partir de biomasse de levures elles-mêmes préalablement cultivées en milieu marqué ²H et/ou ¹⁵N et/ou ¹³C (122, 123). Cela permet actuellement un marquage uniforme à 90% pour ¹³C et ¹⁵N et >60% pour ²H.

L'expression chez la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* a pu être appliquée au récepteur A_{2A}AR dans plusieurs études par RMN en solution (**table 1**) (71). Ici aussi, la composition de la membrane et les modifications post-traductionnelles ne sont pas identiques à celles des cellules de mammifère (115, 116). La membrane ne contient pas de cholestérol mais un dérivé, l'ergostérol. Le repliement des RCPG peut ne pas être assuré et leur stabilité n'est pas toujours

optimale dans ces membranes. Les taux d'expression peuvent aussi ne pas être suffisants. L'expression de la protéine d'intérêt nécessite de plus l'intégration du gène correspondant au génome de la levure et une étape de rupture de la paroi doit être intégrée à la purification (116). Ce système est néanmoins performant pour le marquage isotopique grâce à des cultures en milieu minimum où l'on maîtrise les sources de carbone (glycérol puis méthanol lors de l'expression) et d'azote (sulfate d'ammonium). On peut ainsi réaliser des marquages uniformes ^{13}C et ^{15}N (95), ainsi que des marquages spécifiques par ajout d'acides aminés marqués ou de précurseurs métaboliques (92). De plus, à la différence des cellules d'insecte, la culture peut être effectuée en $^2\text{H}_2\text{O}$ pour maximiser la deutériation du récepteur et améliorer la qualité des spectres RMN obtenus (92, 95). L'expression chez *Pichia pastoris* est une piste qui a été largement explorée par l'équipe de « RMN biologique intégrative » avec les récepteurs opioïdes entre 1996 et 2010 (124-129). En particulier, il a pu être montré que le récepteur MOP perdeutérié produit chez la levure est parfaitement fonctionnel du point de vue de la liaison des ligands (129). En l'absence d'étape de dénaturation – renaturation, il y a cependant un inconvénient à la deutériation dans ce système (c'est aussi valable pour l'expression fonctionnelle de récepteurs deutériés chez *E. coli* discutée ci-après) : si on veut observer des groupements amides ^{15}N - ^1H , le ^1H est obtenu par re-protonation par échange chimique avec $^1\text{H}_2\text{O}$ durant la purification, qui peut être incomplet pour les sites au cœur de la protéine (71, 95).

D'une façon générale, le système d'expression de choix pour la production de protéines marquées pour la RMN est la bactérie *Escherichia coli* (115, 116). En effet, elle présente de nombreux avantages dont la facilité de sa manipulation (en particulier grâce à l'utilisation de plasmides d'expression ne nécessitant pas d'intégration génomique), sa vitesse de croissance élevée et les rendements de production souvent importants. Ce système permet de réaliser facilement des marquages uniformes par culture en milieu minimum avec une source unique de carbone (ici le glucose) et d'azote (sulfate d'ammonium) et en $^1\text{H}_2\text{O}$ ou en $^2\text{H}_2\text{O}$. On peut ici aussi effectuer des marquages spécifiques par ajout d'acides aminés ou de précurseurs (91). L'application aux RCPG présente cependant certaines difficultés. *Escherichia coli* présente des différences marquées par rapport aux cellules de mammifère, en particulier concernant la composition de la membrane plasmique (116). Il n'y a pas de cholestérol dans ces membranes, et leur cytoplasme constitue un milieu réducteur prévenant la formation de ponts disulfures qui stabilisent la structure de nombreux RCPG. Ainsi les récepteurs produits ne sont pas toujours correctement repliés, leur fonctionnalité peut être altérée et leur expression est souvent toxique

pour la bactérie. Les taux d'expression ne sont pas non plus toujours très élevés et différentes protéines de fusion ont donc été utilisées afin de les augmenter en modifiant l'adressage des récepteurs (115, 116). Il peut également être nécessaire d'optimiser les codons du gène de la protéine d'intérêt par ceux qui sont le plus fréquemment utilisés par *Escherichia coli* dans la traduction d'un acide aminé donné.

Afin de profiter des avantages de l'expression chez *Escherichia coli*, une stratégie particulière a été développée par le groupe de notre collaborateur Jean-Louis Banères. Cette stratégie a permis de produire plusieurs RCPG pour des études de biophysique (74, 91, 111), en particulier le récepteur au leucotriène B4 (BLT2) dont la dynamique a ainsi pu être étudiée par RMN (**table 1**). Elle a aussi permis la production du récepteur à la ghréline GHSR que nous avons utilisé pour étudier la ghréline à l'état lié (chapitre IV : publication II (114)). Ces travaux ont bénéficié d'une deutériation efficace des récepteurs (112). Cette stratégie consiste à favoriser l'expression des RCPG en corps d'inclusion grâce à des protéines de fusion comme un fragment de l'intégrine 5 α (résidus 163 à 443). Cela permet d'atténuer (voire d'éliminer) la toxicité pour la bactérie et ainsi d'utiliser *Escherichia coli* au maximum de ces capacités de synthèse de la protéine d'intérêt. Cela présente aussi l'avantage de protéger le récepteur de l'activité d'éventuelles protéases. Cependant, il est alors nécessaire de renaturer le RCPG *in vitro* après solubilisation de la protéine contenue dans les corps d'inclusion. Cette étape n'est pas triviale et nécessite de nombreuses optimisations, ce qui constitue le principal inconvénient de cette stratégie. Lors de cette thèse, nous avons travaillé à l'application de cette stratégie pour produire le récepteur κ opioïde humain (chapitre III) en vue d'études ultérieures par RMN en solution.

II.2. Milieux mimant la membrane plasmique pour des études en solution.

L'extraction des RCPG à partir de la membrane plasmique de l'hôte ayant été utilisé pour sa surexpression nécessite l'utilisation de détergents (115, 130). Ces molécules, organisées en micelle autour du récepteur lorsque utilisées au-dessus de leur concentration micellaire critique (CMC), permettent également de maintenir les récepteurs sous forme soluble au cours de leur purification. On utilise pour cela des détergents non-ioniques qui ne dénaturent pas le récepteur. Différents composés ont été testés (130) mais les molécules les plus utilisées sont le DDM (n-dodécyl β -D-maltoside, CMC \sim 0.15 mM) et le LMNG (lauryl maltose néopentyl glycol, CMC \sim 0.01 mM) (115). Un dérivé du cholestérol plus soluble que ce dernier en micelles de détergent, le cholestéryl hémisuccinate (CHS), est aussi fréquemment ajouté afin de stabiliser les RCPG

dans ces micelles. Dans le cas où l'on cherche à solubiliser un récepteur à partir de corps d'inclusion, il est nécessaire d'utiliser des détergents plus « fort », ioniques et donc dénaturant, comme le SDS (sodium dodécyl sulfate) (111). Ce processus est également facilité par l'ajout d'agents chaotropiques comme l'urée ou le chlorure de guanidinium (130).

La fonctionnalité des RCPG est préservée en micelles de DDM ou de LMNG pour ce qui est de la liaison des ligands et de l'activation des protéines G (115). Les micelles de DDM et de LMNG ont donc été utilisées comme milieux mimétiques de la membrane pour de nombreuses études biophysiques et pour la majorité des études de RMN en solution (71). De plus, la fonctionnalité en micelles de DDM et de LMNG implique que le récepteur correctement replié est relativement stable dans cet environnement, et on peut exploiter cette propriété pour la renaturation *in vitro* d'un RCPG (chapitre III). Des expériences ont néanmoins montré que la dynamique conformationnelle des RCPG est modulée par leur environnement hydrophobe (89). De plus, les RCPG sont tout de même moins stables en micelles de détergent, en particulier celles de DDM, qu'au sein d'une bicouche lipidique (115). Enfin, l'interaction avec certains partenaires de signalisation comme les GRK est favorisée par la présence d'une bicouche lipidique (103).

Après purification en micelles de DDM ou de LMNG, les RCPG peuvent être reconstitués dans différents types de bicouches lipidiques (115). Pour les études en solution, on peut en particulier utiliser des nanodisques ou des bicelles. Il s'agit d'organisations où une bicouche de phospholipides est maintenue en solution sous la forme d'un « disque » par un ou des composés amphipatiques. Pour les nanodisques, la bicouche est ceinturée par un dimère d'une protéine α -hélicoïdale appelée MSP (« membrane scaffolding protein »). Il existe des versions de différentes longueurs des MSP permettant d'obtenir des nanodisques de diamètres plus ou moins importants et très bien contrôlés. Les nanodisques sont bien adaptés aux études de RCPG par RMN en solution et ont été utilisés pour les récepteurs β_2 AR (89, 103) et BLT2 (91). Pour les bicelles, la bicouche est stabilisée par des détergents ou des lipides à chaînes courtes dont la quantité relative permet de faire varier la taille des particules (115, 131). Enfin, il est également possible d'utiliser des « amphipols » qui sont des polymères amphipatiques qui peuvent ceinturer les protéines membranaires en présence ou non de lipides (115, 132). Ils constituent également un environnement hydrophobe qui peut être utilisé pour la renaturation *in vitro* (111), comme pour celle du récepteur à la ghréline GHSR.

II.3. Stratégie des expériences RMN.

La RMN en solution est un outil de choix pour l'étude de la dynamique des protéines (108, 109) et cette méthode contribue de façon importante à la caractérisation des échanges conformationnels impliqués dans l'activité des RCPG (32, 71). Une des forces de cette méthode est que des expériences ont été développées pour étudier les mouvements moléculaires à différentes échelles de temps entre de la picoseconde et l'heure (**figure 7a**). Le défi que représente l'étude des RCPG par RMN en solution est présenté ici succinctement ainsi que la stratégie dans laquelle s'inscrit ce travail de thèse. Une description plus quantitative des expériences de relaxation du ^{15}N et de NOE transféré que nous avons utilisées est présentée en *annexe*.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, lorsque plusieurs états conformationnels sont en échange « lent » (*i.e.* avec une vitesse d'échange k_{ex} significativement inférieure à la différence de fréquence de résonance $\Delta\nu$ du spin entre les deux états en échange), un signal est obtenu pour chaque état (**figure 7b**) (109). Cette propriété a été exploitée pour l'étude de la dynamique des RCPG (71) pour « compter » les conformations et déterminer leurs populations respectives via l'intégrale des signaux. Néanmoins, cela implique qu'un spectre de RCPG est composé de multiples signaux (91) qu'il est nécessaire de pouvoir résoudre les uns des autres et d'attribuer. Au contraire, lorsqu'un échange conformationnel est « rapide » (*i.e.* lorsque k_{ex} est significativement supérieure à $\Delta\nu$) un signal moyen est obtenu (**figure 7b**) (109). Ces mouvements moléculaires « rapides » influencent néanmoins la relaxation des spins (qui peut donc être utilisée pour étudier cette dynamique) (**figure 7a**) (108, 109). Le temps de corrélation rotationnel τ_c influe notamment sur la relaxation transverse R_2 et donc sur la largeur des signaux RMN (133). Pour les RCPG, dont la masse moléculaire en micelles de détergent ou en nanodisques est supérieure ou égale à 100 kDa, la largeur importante des signaux aboutit à une faible sensibilité et une mauvaise résolution (71, 133). La relaxation transverse R_2 apparente et la largeur des signaux sont aussi influencées par les échanges « intermédiaires » (*i.e.* lorsque k_{ex} est proche de $\Delta\nu$) (**figure 7b**) (109). Des expériences de dispersion de relaxation basées sur la séquence d'impulsion CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (134, 135), permettent de diminuer voire de supprimer la contribution de l'échange (appelée R_{ex}) lors de mesures de R_2 ainsi que d'estimer la vitesse d'échange et les populations des différents états (108). Ces expériences ont par exemple été appliquées à des sondes ^{19}F greffées sur le récepteur $\beta_2\text{AR}$ (76). Cependant, la présence de mouvements « intermédiaires » participent aussi à détériorer la sensibilité et la résolution des spectres de RCPG (87).

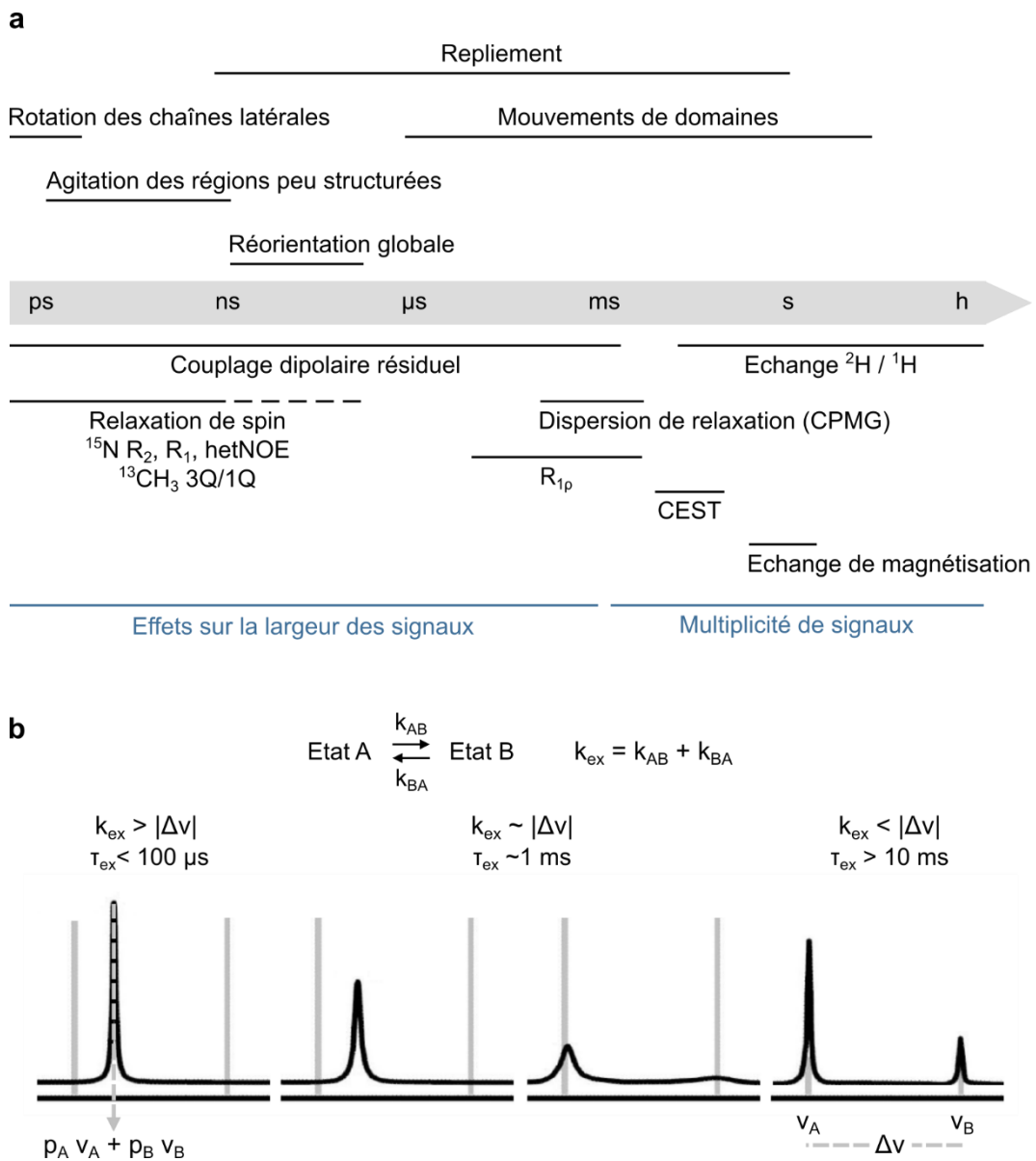


Figure 7. Dynamique des protéines et exemples d'expériences de RMN. (a) Schéma de l'échelle de temps des mouvements moléculaires impliqués dans la dynamique fonctionnelle des protéines. Des exemples d'expériences de RMN permettant de caractériser ces mouvements sont indiqués. Adapté de (108). R_2 désigne la relaxation transverse, R_1 la relaxation longitudinale, hetNOE le NOE hétéronucléaire, 3Q/1Q les expériences de « Relaxation Violated Coherence Transfer » (136), R_{1p} la relaxation longitudinale dans le référentiel tournant, CPMG la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill et CEST l'expérience de transfert de saturation par échange chimique. **(b)** Effet de l'équilibre entre deux états sur l'allure d'un spectre RMN en fonction de la vitesse d'échange. Adapté de (109). k_{AB} est la constante de vitesse de passage de l'état A vers l'état B et k_{BA} celle de B vers A. τ_{ex} est le temps caractéristique de l'échange chimique égal à l'inverse de $k_{\text{ex}} = k_{AB} + k_{BA}$. ν_A et ν_B sont les fréquences de résonance du spin considéré dans les états A et B, et $\Delta\nu$ la différence entre elles (ici prise à 1000 Hz). ρ_A et ρ_B sont les populations des états A et B.

Le travail réalisé lors de cette thèse sur la production de KOP par expression chez *E. coli* vise à bénéficier de méthodes permettant l'étude des protéines de haute masse moléculaire par RMN en solution. Le but est de diminuer la relaxation transverse R_2 et donc la largeur des signaux du récepteur afin d'améliorer la sensibilité et la résolution des différents pics (133, 137). La bactérie a été choisie comme système d'expression notamment pour sa capacité à surexprimer la protéine d'intérêt avec un haut niveau de deutériation (91, 112). Ce marquage isotopique permet de diminuer la relaxation transverse R_2 des spins d'intérêt en atténuant leur couplage dipolaire avec les hydrogènes voisins (diminution d'un facteur $42 = (\gamma^1\text{H}/\gamma^2\text{H})^2$) (91, 95, 112, 138). Il est aussi profitable d'utiliser des expériences RMN basées sur la méthode TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) (133, 137, 139, 140) où l'on sélectionne des transitions particulières qui ont une vitesse de relaxation transverse R_2 faible (et donc des raies fines). Cette méthode peut être appliquée à des groupements ^{15}N - ^1H (notamment du squelette peptidique) pour lesquels on tire profit d'une compensation partielle entre le couplage dipolaire et l'anisotropie de déplacement chimique (139). Cependant, il est aussi intéressant d'utiliser des marquages sur les chaînes latérales qui sont animées d'une dynamique supplémentaire à celle de réorientation globale de la protéine. En effet, cela aboutit à une relaxation transverse R_2 plus faible. Le marquage isotopique de chaînes latérales a ainsi été utilisé dans la majorité des études de RCPG par RMN en solution (**table 1**) (71). L'utilisation de marquages spécifiques ^{13}C - $^1\text{H}_3$ (141-146) est particulièrement avantageuse en raison de la rotation rapide du groupement méthyle (*i.e.* avec un temps caractéristique de l'ordre de la picoseconde) et de la présence de trois protons équivalents aboutissant à un gain de sensibilité. Ici, les expériences de méthyl-TROSY exploitent une compensation partielle des interactions dipolaires au sein du groupement méthyle (140). Des expériences RMN basées sur cet effet et combinées à la perdeutériation permettent l'acquisition de spectres à haute résolution sur des protéines ou complexes de très haute masse moléculaire (certains dépassant le MDa), en RMN en solution et en RMN des solides (147), et aussi la caractérisation de la dynamique des protéines à différentes échelles de temps (136, 137, 146, 148-151). Notamment, des expériences de dispersion de relaxation permettent l'étude de la dynamique ms - μs (108, 150, 151) (il est aussi possible d'utiliser des marquages ^{13}C - $^1\text{H}_1$ - $^2\text{H}_2$ des méthyles (152-154)) et les mouvements ns - ps peuvent être analysés par des expériences de « relaxation violated coherence transfer » (92, 149).

En plus de l'étude de la dynamique des RCPG, la RMN permet d'obtenir différentes informations sur les ligands en interaction avec leur récepteur (71, 113, 155). On s'intéresse ici

à des ligands peptidiques mais les expériences utilisées permettent d'étudier d'autres types de ligands. Les expériences que l'on peut appliquer dépendent de la vitesse d'échange entre les états lié et libre du ligand. Si cet échange est lent (**figure 7b**) (109), il faut réaliser les expériences avec un rapport équimolaire entre ligand et récepteur afin de n'observer que les signaux du ligand lié. On a alors les mêmes difficultés que pour l'étude du récepteur lui-même.

En revanche, si cet échange est rapide, comme observé pour la dynorphine (113) et la ghréline liées à leurs récepteurs (chapitre IV : publication II (114)), on obtient un signal moyen pour les deux états (**figure 7b**) (109). Cela présente le grand avantage de pouvoir étudier le ligand lié avec un large excès de ce ligand par rapport au récepteur (rapport molaire récepteur / ligand de 0.001 à 0.01). Pour les paramètres d'intérêt que sont la relaxation transverse R_2 du ^{15}N et du ^1H et la constante de relaxation croisée $^1\text{H}-^1\text{H}$, on mesure une valeur qui est la moyenne de celles des états lié et libre (113), pondérée par la fraction liée. Les signaux RMN sont donc moins larges, la sensibilité est meilleure et on peut utiliser des expériences qui seraient difficiles ou impossibles de réaliser si l'échange était lent.

Dans ces conditions, il est possible d'étudier la dynamique sur l'échelle de temps picoseconde – nanoseconde par mesure de la relaxation du ^{15}N (113). Cela a été largement utilisé pour analyser les mouvements du squelette peptidique des protéines par mesure de la relaxation transverse R_2 , longitudinale R_1 et du NOE hétéronucléaire $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ (108, 109). Ici cependant, seul R_2 a une valeur suffisamment élevée dans l'état lié par rapport à l'état libre pour produire un effet sur le R_2 moyen mesuré (avec une fraction liée de 0.001 à 0.01) (113). Afin de s'affranchir de la contribution de la liaison non-spécifique, on peut mesurer R_2 avec deux lots de récepteur dont l'un est bloqué par un compétiteur orthostérique. La différence de R_2 (ΔR_2) obtenue en bloquant ou non le site de liaison est ainsi proportionnelle au R_2 à l'état lié. On peut montrer que ΔR_2 est alors proportionnelle au paramètre d'ordre S^2 dans l'état lié (113). Ce paramètre traduit l'amplitude des mouvements au niveau de chaque site marqué ^{15}N du ligand peptidique et permet donc de décrire sa dynamique interne dans l'état lié. La vitesse de relaxation croisée $^1\text{H}-^1\text{H}$ (σ) a aussi une valeur bien supérieure pour l'état lié que pour l'état libre (comme R_2 , σ contient dans son expression un terme en $J(0)$, valeur de la fonction de densité spectrale à fréquence nulle, et est donc très sensible aux mouvements lents). Cette propriété peut être exploitée pour réaliser des expériences de NOE « transféré » et déterminer la conformation d'un ligand dans l'état lié (156-164). En effet, la constante de relaxation croisée entre deux protons du ligand dépend de la distance entre ces spins (σ est fonction de r^{-6} ainsi que de la dynamique du vecteur internucléaire) (165). Elle permet donc d'établir des contraintes

de distance pour le calcul de structure dans les portions du peptide structurées qui possèdent une dynamique homogène. Enfin, des expériences de différence de transfert de saturation (STD) peuvent être réalisées pour déterminer les régions d'un ligand en interaction avec son récepteur (166, 167). On sature pour cela les spins ^1H du récepteur avec une irradiation sélective. Cette saturation se propage dans le récepteur par diffusion de spin et atténue finalement les signaux des atomes du ligand qui sont suffisamment proches du récepteur (cette atténuation dépend également de la dynamique du ligand).

Ces trois types d'expérience, NOE transféré, relaxation transverse du ^{15}N , et différence de transfert de saturation constituent le cœur des informations structurales et dynamiques qui ont été obtenues sur la ghréline en interaction avec son récepteur et qui sont présentées au chapitre IV.

III. Les systèmes RCPG – neuropeptides étudiés dans cette thèse.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié deux systèmes peptide – RCPG : la ghréline et son récepteur GHSR ; la dynorphine et le récepteur κ opioïde KOP. Ce qui suit décrit les principales caractéristiques de ces récepteurs. Ils sont tous deux impliqués dans des processus physiologiques importants et sont aussi des cibles pharmacologiques d'intérêt. Le choix de ces récepteurs repose également sur les travaux antérieurs de l'équipe d'Alain Milon et de Pascal Demange concernant les récepteurs opioïdes (116, 124, 125, 129, 130, 168, 169). Il s'appuie enfin sur la collaboration avec deux autres équipes de recherche. Le groupe de Jean-Louis Banères étudie le récepteur à la ghréline par différentes approches de pharmacologie moléculaire et de biophysique et a mis au point son expression chez la bactérie en quantité compatible avec la biologie structurale. Le groupe de Vadim Cherezov a réalisé de nombreuses études structurales de RCPG, principalement par cristallographie en phase cubique lipidique. Son équipe étudie notamment les récepteurs opioïdes.

III.1. La ghréline et son récepteur.

La découverte de la ghréline et de son récepteur est un exemple de ce qu'on appelle la pharmacologie inverse : c'est-à-dire que la cible, le récepteur GHSR pour « growth hormone secretagogue receptor », a été isolée avant son ligand (170). Initialement, un groupe de peptides synthétiques dérivés des opioïdes a été identifié comme ayant un effet stimulant sur la sécrétion d'hormone de croissance (171). Cela a conduit à l'isolation de GHSR, pour lequel ces peptides synthétiques sont des agonistes, et enfin à l'identification de la ghréline en tant que ligand endogène (172, 173). Ces travaux ont montré que GHSR est un RCPG de classe A et que la ghréline est une hormone peptidique de 28 acides aminés et un agoniste de son récepteur.

La ghréline est initialement traduite sous la forme de préproghréline (170). Ce pro-peptide est ensuite clivé pour générer la ghréline et un autre peptide, l'obéostatine. La ghréline est principalement synthétisée au niveau de l'appareil digestif (173, 174), en particulier dans l'estomac où elle a été initialement isolée, mais aussi dans d'autres régions dont le système nerveux central (en quantité beaucoup plus faible) (175). L'hormone est finalement libérée dans la circulation sanguine pour exercer des effets divers au niveau de multiples organes (**figure 8**) (170). Une particularité de la ghréline est qu'elle subit une modification post-traductionnelle nécessaire pour agir sur GHSR avec une affinité et une puissance suffisantes (170). Il s'agit d'une acylation par un acide gras sur son troisième résidu d'acide aminé (une sérine) qui est

catalysée par une enzyme dédiée appelée GOAT (ghrelin O-acyl-transferase) (176, 177). La longueur des chaînes greffées est variable mais il s'agit en majorité de chaînes à huit carbones et dans une moindre mesure à dix carbones. Ces chaînes proviendraient en partie d'acides gras issus de la digestion des aliments et certaines études suggèrent que ce système aurait une fonction de détecteur de nutriments (178).

Le système ghréline – GHSR est impliqué dans une signalisation intracellulaire très riche puisque GHSR a la particularité d'être couplé à trois types de protéine G (15, 179). Le principal partenaire de signalisation de GHSR est la protéine G_q . Elle stimule l'activité de la phospholipase C- β , catalysant la transformation de PIP₂ (phosphatidylinositol bisphosphate) en IP₃ (inositol trisphosphate) et DAG (diacylglycérol). Ces produits de réaction engendrent une cascade de signalisation impliquant notamment une élévation du calcium intracellulaire (173). L'action de la ghréline sur le taux de calcium intracellulaire est une caractéristique importante de l'activité de cette hormone et a été observée dès son identification. GHSR a aussi la capacité de coupler les protéines $G_{12/13}$ et $G_{i/o}$ (15, 179) et il est probable que son activité de signalisation soit dépendante du contexte cellulaire et tissulaire. De plus, il a été observé pour certains ligands de ce récepteur des propriétés de signalisation biaisée entre les trois voies des protéines G possibles (179). Une autre caractéristique du récepteur à la ghréline est qu'il possède une activité constitutive particulièrement élevée (36) : 40 à 50 % de son activité maximale d'activation de la protéine G_q et d'accumulation d'IP₃. Le récepteur à la ghréline peut aussi interagir avec les arrestines et être internalisé.

En parallèle de la multiplicité de couplage de GHSR avec les protéines G, ce récepteur est largement distribué dans le corps humain. En fonction de sa localisation, le système ghréline – GHSR est responsable de la régulation de nombreux processus physiologiques (**figure 8**) (170, 179). La première activité du couple ghréline – GHSR à avoir été découverte est la stimulation de la sécrétion d'hormone de croissance (172, 173). Cette activité est assurée par une localisation du récepteur sur des neurones au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus. La ghréline peut également être considérée comme « l'hormone de la faim ». En effet, son niveau sanguin est corrélé avec la sensation de faim, il augmente avant les repas et diminue après la prise alimentaire. Cet effet, qualifiée d'orexigénique, est également dû à une localisation hypothalamique de GHSR. La ghréline et son récepteur régulent aussi des fonctions du système nerveux central en dehors de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Des actions ont par exemple été décrites sur le goût, le système de récompense (dont un couplage au système dopaminergique) et les phénomènes d'addiction, des fonctions cognitives telles que l'apprentissage, ou encore

l'anxiété et la dépression. La ghréline et GHSR ont également de multiples actions au niveau des tissus périphériques, bien que l'expression du récepteur s'y fasse à des taux plus faibles. En relation avec son effet « d'hormone de la faim », la ghréline régule en particulier l'homéostasie du glucose via la modulation de la sécrétion d'insuline. On peut enfin citer une série d'actions périphériques additionnelles sur le métabolisme lipidique, la thermogénèse, les fonctions digestives et cardiaques et le système nerveux sympathique.

Le système ghrélinergique suscite donc un fort intérêt pharmacologique. De nombreux ligands ont été développés (180), certains sont en essai clinique (170) et la pralmoréline est approuvée au Japon pour la diagnostic de la déficience en hormone de croissance. Le couplage de GHSR avec trois protéines G encourage aussi le développement de ligands biaisés qui pourraient permettre de réguler spécifiquement certains processus physiologiques (179). Il n'y a pas de structure tridimensionnelle qui ait été résolue pour GHSR (15) et la compréhension des mécanismes moléculaires de l'interaction ghréline – GHSR vient principalement d'étude de relation structure - fonction réalisées sur la ghréline (181-184). L'étude que nous avons menée et qui est décrite dans le chapitre IV apporte de nouveaux éléments de description de cette relation, en particulier en proposant une fonction de « centre de structuration » pour la chaîne acyle de la ghréline.

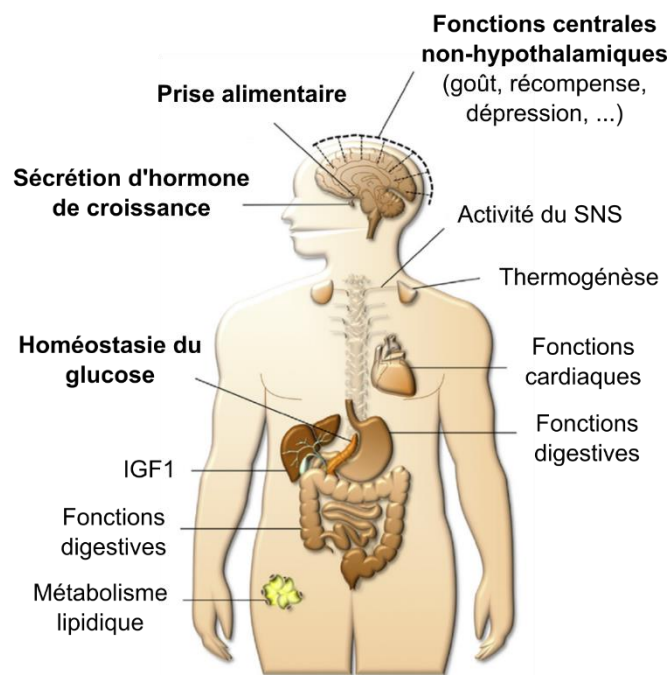


Figure 8. Fonctions physiologiques régulées par le système ghréline – GHSR. Adapté de (170). SNS désigne le système nerveux sympathique et IGF1 l'insulin-like growth factor-1.

III.2. La dynorphine et son récepteur.

Le chapitre II présente la dynorphine et son récepteur. Il s'agit d'une revue rédigée au cours de cette thèse et publiée dans la série « *Vitamins and Hormones* » en 2019 (35). Elle décrit les implications de ce système en physiologie humaine, les recherches conduites pour élucider les mécanismes moléculaires impliqués et l'utilisation de ces connaissances dans la conception de nouveaux ligands.

La dynorphine appartient au groupe des neuropeptides opioïdes avec les enképhalines et les endorphines. Elle agit sur le récepteur κ opioïde KOP et régule des processus comme la douleur ou l'addiction. La compréhension de l'interaction dynorphine – KOP présente donc un intérêt pharmacologique important. C'est également le cas des autres systèmes neuropeptide – récepteur opioïde qui ont suscité des efforts importants de pharmacologie moléculaire et de biologie structurale. Cette revue intitulée « Structure et dynamique de la dynorphine et de son récepteur » décrit en particulier les travaux réalisés pour isoler la dynorphine et son récepteur, élucider la relation structure – fonction de ce peptide et déterminer la structure et la dynamique du complexe avec son récepteur.

Chapitre II

Publication I : « Structure et dynamique de la dynorphine et de son récepteur »

Structure and dynamics of dynorphin peptide and its receptor

Guillaume Ferré*, Georges Czaplicki, Pascal Demange, Alain Milon*

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS CNRS UPS), Université de Toulouse, 31077 Toulouse, France

* Corresponding authors: Email addresses: guillaume.ferre@ipbs.fr (G. Ferré); alain.milon@ipbs.fr (A. Milon)

Vitamins and Hormones, 2019. Authors' version.

Abstract

Dynorphin is a neuropeptide involved in pain, addiction and mood regulation. It exerts its activity by binding to the kappa opioid receptor (KOP) which belongs to the large family of G-protein coupled receptors. The dynorphin peptide was discovered in 1975, while its receptor was cloned in 1993. This review will describe: *a*) the activities and physiological functions of dynorphin and its receptor, *b*) early structure-activity relationship studies performed before cloning of the receptor (mostly pharmacological and biophysical studies of peptide analogues), *c*) structure-activity relationship studies performed after cloning of the receptor via receptor mutagenesis and the development of recombinant receptor expression systems, *d*) structural biology of the opiate receptors culminating in X-ray structures of the four opioid receptors in their inactive state and structures of MOP and KOP receptors in their active state. X-ray and EM structures are combined with NMR data, which gives complementary insight into receptor and peptide dynamics. Molecular modelling greatly benefited from the availability of atomic resolution 3D structures of receptor-ligand complexes and an example of the strategy used to model a dynorphin-KOP receptor complex using NMR data will be described. These achievements have led to a better understanding of the complex dynamics of KOP receptor activation and to the development of new ligands and drugs.

Keywords: membrane protein, GPCR, site-directed mutagenesis, heterologous expression systems, NMR, X-ray crystallography, electron microscopy, molecular dynamics, docking, drug design.

I. Dynorphin: a neuropeptide involved in pain, addiction and mood regulation

Dynorphin is an endogenous neuropeptide first isolated from porcine pituitary (Cox, Opheim, Teachemacher, & Goldstein, 1975) with a particularly potent opioid activity (Goldstein, Tachibana, Lowney, Hunkapiller, & Hood, 1979). The dynorphin A 1-17 isoform was the first to be fully sequenced (Goldstein, Fischli, Lowney, Hunkapiller, & Hood, 1981) and revealed an amino-terminal sequence identical to leu-enkephalin opioid peptide (YGGFL) with a basic carboxy-terminal extension. Several dynorphin isoforms were further identified: dynorphin A 1-8, dynorphin B 1-13, big dynorphin and leumorphin (Charles Chavkin, 2013) (**Fig. 1**). All dynorphin isoforms and α - and β -neo-endorphin, which are also leu-enkephalin-based opioid peptides, derive from a common precursor named prodynorphin (C. Chavkin, Bakhit, Weber, & Bloom, 1983; Kakidani et al., 1982; Weber, Evans, & Barchas, 1982; Zamir, Palkovits, Weber, MEzey, & Brownstein, 1984) while other opioids are derived from the precursors proenkephalin and proopiomelanocortin (Charles Chavkin, 2013). Prodynorphin and its processing enzyme, prohormone convertase 2 (PC2), are largely expressed in the central nervous system (Berman et al., 2000; Civelli, Douglass, Goldstein, & Herbert, 1985) and dynorphin peptides are present in presynaptic neurosecretory vesicles (Molineaux & Cox, 1982; Pickel, Chan, & Sesack, 1993; Pickel, Chan, Veznedaroglu, & Milner, 1995; Whitnall, Gainer, Cox, & Molineaux, 1983). They can be released by membrane depolarization (C. Chavkin, et al., 1983) and subsequently activate the kappa opioid receptor (KOP) (Wagner, Evans, & Chavkin, 1991) which modulates neurotransmitter release and postsynaptic neural activity (Wagner, Terman, & Chavkin, 1993).

KOP belongs to the opioid receptor family which is composed of several subtypes, originally defined by the pharmacological profiles of the first receptors to be characterized (Dhawan et al., 1996): the μ and δ opioid receptors (MOP and DOP). KOP was initially named from ketocyclazocine opioid activity (Martin, Eades, Thompson, Huppler, & Gilbert, 1976) and highly KOP-specific agonists were synthesized (Dhawan, et al., 1996) such as U50488 (Lahti, VonVoigtlander, & Barsuhn, 1982) or U69593 (Lahti, Mickelson, McCall, & Von Voigtlander, 1985). Opioid receptor cloning led to the identification of a fourth member of the family, the nociceptin opioid receptor (NOP), and of its endogenous ligand, nociceptin (J-C. Meunier et al., 1995; Mollereau et al., 1994). Several studies reported the cloning of KOP from rodents (Li et al., 1993; Meng et al., 1993; Yasuda et al., 1993) and then from human (Simonin et al., 1995; J. Zhu et al., 1995), showing that it, together with the other opioid receptors, belongs to the G-protein-coupled receptors (GPCR) superfamily. Opioid receptors are mainly G_i/G_o -coupled

Peptide	Sequence	pK _i			References
		KOP	MOP	DOP	
Met-enkephalin	YGGFM	7.3	8.7	9.3	1, 2, 3
Leu-enkephalin	YGGFL	7.0	8.2	9.4	1, 4
Dynorphin A 1-8	YGGFLRRI	9.3	8.6	8.9	4, 5, 6
Dynorphin A 1-13	YGGFLRRIRPKLK	9.6	8.4	8.3	4
Dynorphin A 1-17	YGGFLRRIRPKLKWDNQ	9.4	8.6	8.9	4, 5, 6, 7, 8
Big dynorphin	YGGFLRRIRPKLKWDNQKRYGGFLRRQFKVVT	8.5	8.2	8.5	6
Leumorphin	YGGFLRRQFKVVTRSQQDPNPAYYGGLFNV	9.3	8.4	8.4	
Dynorphin B 1-13	YGGFLRRQFKVVT	9.3	8.7	8.5	6
α-neo-endorphin	YGGFLRKYPK	9.9	8.9	8.9	3, 5, 7
β-neo-endorphin	YGGFLRKYP	9.3	8.3	8.9	5

Figure 1: Dynorphin-related opioid peptides. Met-enkephalin, leu-enkephalin, dynorphin A 1-13 and prodynorphin-derived peptides amino acid sequence and affinity for opioid receptors. The common N-terminal leu-enkephalin "message" sequence is colored in green and C-terminal "address" residues conserved with dynorphin A 1-17 in blue. In order to compare affinities in homogenous systems, pK_i values from (Mansour, Hoversten, Taylor, Watson, & Akil, 1995) are reported where competition binding experiments were conducted against rat opioid receptors transiently expressed in COS-1 cells. Binding properties have been additionally reviewed from the indicated references from IUPHAR/BPS guide to pharmacology (Alexander et al., 2017): 1 (Meng, et al., 1993), 2 (Raynor et al., 1994), 3 (Yasuda, et al., 1993), 4 (Toll et al., 1998), 5 (Simonin, et al., 1995), 6 (Merg et al., 2006), 7 (J. Zhu, et al., 1995), 8 (J. Zhu, Luo, Li, Chen, & Liu-Chen, 1997). Similar trends are observed despite discrepancies arising from differences in experimental models and conditions.

(Al-Hasani & Bruchas, 2011; Prather et al., 1995). They display a small basal intracellular signaling activity, at about 10% of the maximal response for KOP, in the absence of any ligand, and this is modulated by extracellular ligand binding (D. Wang, Sun, & Sadee, 2007).

Opioid receptor signaling controls a multitude of intracellular effectors by both G-protein-dependent and G-protein-independent pathways (Al-Hasani & Bruchas, 2011; Bruchas & Chavkin, 2010; Law, Wong, & Loh, 2000). G-protein-dependent opioid receptor signaling predominantly results in neuronal excitability and synaptic transmission inhibition. G_i/G_o-protein activation promotes G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK) activity (Barchfeld & Medzihradsky, 1984; Childers & Snyder, 1978; Minneman & Iversen, 1976). It causes neuronal membrane hyperpolarization and thus attenuates the neuron's ability to generate and propagate action potentials (Henry, Grandy, Lester, Davidson, & Chavkin, 1995; Sadjja, Alagem, & Reuveny, 2003; Schneider, Eckert, & Light, 1998). Activation of G_i/G_o-proteins also inhibits voltage-dependent calcium channels, diminishing calcium influx in response to action potentials, and thus prevents neurotransmitter synaptic release (Bourinet,

Soong, Stea, & Snutch, 1996; Rhim & Miller, 1994; Rusin, Giovannucci, Stuenkel, & Moises, 1997; Zamponi & Snutch, 1998). Activated G_i/G_o -proteins also inhibit adenylate cyclase thus decreasing intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration (Taussig, Iniguez-Lluhi, & Gilman, 1993), which in turn regulates numerous targets. Opioid receptors also signal through G-protein-independent pathways. Following agonist stimulation, they can be intracellularly phosphorylated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) leading to receptor interaction with β -arrestins (Al-Hasani & Bruchas, 2011; Law, et al., 2000). This interaction is involved in receptor internalization, one of the consequences of which is to prevent exposition to extracellular ligands. It is also responsible for intracellular signaling *per se*, notably through mitogen activated kinase (MAPK) pathways that regulate predominant cellular processes such as gene transcription, proliferation and differentiation (Bruchas & Chavkin, 2010; Raman, Chen, & Cobb, 2007).

Because of their involvement in cellular communication, opioid peptides and their receptors participate in numerous physiological processes (Y. Feng et al., 2012). First, opioid receptor activation results in spinal and supra-spinal pain modulation (Ahlbeck, 2011; Waldhoer, Bartlett, & Whistler, 2004). The afferent nociceptive influx from peripheral tissues is regulated by descending neurons and opioid receptors participate in this system at multiple levels (Vanderah, 2010). As an example, KOP has been found to be present in spinal cord dorsal root ganglia (Attali & Vogel, 1989; Corder, Castro, Bruchas, & Scherrer, 2018; Ji et al., 1995) where it inhibits synaptic transmission between primary and secondary afferent neurons (Vanderah, 2010) in response to agonists released by descending neurons. Opioid peptides and their receptors also regulate monoaminergic systems and notably mesolimbic dopaminergic functions (Lutz & Kieffer, 2013). KOP agonists inhibit dopamine neuron release activity by their receptor-specific action both in the *nucleus accumbens* and the ventral tegmental area (Lutz & Kieffer, 2013; Margolis, Hjelmstad, Bonci, & Fields, 2003; R. Spanagel, A. Herz, & Shippenberg, 1992), resulting in an aversive effect (R. Bals-Kubik, A. Ableitner, A. Herz, & Shippenberg, 1993). In contrast, MOP agonists cause a rewarding effect (R. Bals-Kubik, et al., 1993) because they indirectly stimulate dopamine release by diminishing inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA) neuron activity in the ventral tegmental area (Lutz & Kieffer, 2013; R. Spanagel, et al., 1992). Opioid receptors thus mediate abusive opioid seeking behavior but are also more generally involved in modulating drug addictions with pronounced subtype discrepancies (Kreek et al., 2012). In addition, the mesolimbic dopamine reward system is linked to mood disorders (Nestler & Carlezon, 2006) and opioid receptors further regulate

serotonin and noradrenaline neurons (Lutz & Kieffer, 2013), thought to participate in depression (Krishnan & Nestler, 2010). Consistent with this, opioid receptors and their ligands are involved in depression-like behaviours and KOP antagonists such as JD1c induce antidepressant-like effects (Lutz & Kieffer, 2013). Furthermore, opioid peptides and their receptors, especially dynorphin and KOP, control the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) and are thus involved in stress-related phenomenon with implications in addiction, depression and anxiety disorders (Bruchas, Land, & Chavkin, 2010; Knoll & Carlezon, 2010; Kreek, et al., 2012; Ribeiro, Kennedy, Smith, Stohler, & Zubieta, 2005). Beside their predominant role in pain, addiction and mood control, opioid receptors have been linked to a multitude of functions such as immunity, neuroprotection, cell proliferation, neural differentiation, cardiovascular system regulation and feeding (Y. Feng, et al., 2012). Of particular importance, opioid receptors signaling stimulation can influence the respiratory system function (Pattinson, 2008) with strong respiratory depression observed upon activation of MOP (but not KOP). Together with its impact on breathing, MOP agonism induces an important inhibition of gastrointestinal transit (A. Tavani, P. Petrillo, A. La Regina, & Sbacchi, 1990), which represents a significant limitation of opioid use in the clinic.

The biological functions of opioid peptides and their receptors renders them key targets to interfere in pain, addiction and mood disorders. There is considerable interest in discovering new opioids with reduced side effects and compounds that target the dynorphin / KOP system are being developed in order to produce analgesic, antidepressant, anxiolytic or anti-addiction drugs (Dogra & Yadav, 2015; Zheng et al., 2017). Because of the biological significance of this system, extensive research is under way to decipher the molecular mechanisms underlying the dynorphin / KOP interaction and the resulting modulation of receptor signaling activity. These studies, which form the subject of this review, could also help in the design of novel KOP ligands with pharmacologically relevant properties such as biased agonism or allosteric modulation.

II. The molecular mechanism of action of dynorphin: research and hypotheses prior to KOP cloning

The ability to produce dynorphin and analogues by solid-phase peptide synthesis (Goldstein, et al., 1979) opened the way to a wide range of structure-activity relationship studies on various peptide structures. These have been reviewed thoroughly elsewhere (Aldrich & McLaughlin,

2009; Lapalu et al., 1997; Naqvi, Haq, & Mathur, 1998; Ramos-Colon et al., 2016). In brief, the 17 amino-acid long dynorphin 1-17 may be shortened at its C-terminus to dynorphin 1-13 without affecting its activity (activation of KOP is typically assessed on the guinea pig ileum electrical contraction assay), and further to dynorphin 1-8 with a 50-fold reduction in activity and no loss in affinity (**Fig. 1** and (Mansour, et al., 1995)). Further shortening is deleterious for both affinity and activity. Substitution of Gly2 by L-amino-acids resulted in a reduction in activity while substitution by D-amino-acids resulted in reduced selectivity for KOP versus MOP, since D amino-acids tend to increase activity on MOP and to decrease it on KOP. Substitution of Pro10 by a D-proline led to a marked increase in selectivity for KOP over the other opiate receptors. The further alkylation of the amino group of Tyr1 gave rise to highly KOP-selective peptide ligands such as N-Benzyl[D-Pro10]-Dyn A(1-11) (Choi, Murray, DeLander, Caldwell, & Aldrich, 1992).

Peptide synthesis also enabled biophysical studies of dynorphin conformation and dynamics in solution and in membrane biomimetic media (Lancaster et al., 1991; Lind, Graslund, & Maler, 2006; Naito & Nishimura, 2004; Spadaccini, Crescenzi, Picone, Tancredi, & Temussi, 1999). These included circular dichroism, Raman, FT-IR and NMR spectroscopies. In aqueous solution, dynorphin is largely disordered. It may adopt secondary structures in specific environments, such as a type I β -turn involving the first five residues in DMSO (Renugopalakrishnan, Rapaka, Huang, Moore, & Hutson, 1988) or a α -helical conformation from residue Gly3 to Arg9 when bound to dodecylphosphocholine detergent micelles (Kallick, 1993). Limiting the conformational space available to constrained peptide analogues increases receptor binding affinity and specificity (Naqvi, et al., 1998). However, without knowing the structure adopted by dynorphin upon KOP binding, it was difficult to derive a clear understanding of the binding mechanism from these results.

A detailed study of dynorphin and dynorphin analogues bound to lipid bilayers was performed in the early eighties. Using a combination of infrared attenuated total reflection spectroscopy and capacitance minimization, dynorphin was found to bind to POPC lipid bilayers by forming an α -helix from Tyr1 to Pro10, which inserts into the bilayer perpendicular to the bilayer plane (Erne, Sargent, & Schwyzer, 1985). In the same study, the affinity for a neutral bilayer was determined to have a K_d of 11 μ M. In a subsequent theoretical estimation of the preferred orientation and binding energy of a series of dynorphin analogues of various lengths (from 1-13 to 1-5), a good correlation between the peptide amphiphilic moment, the affinity for lipid bilayers and the KOP receptor subtype specificity was found. Loss of the C-terminal positively-

charged residues converts a KOP-selective peptide dynorphin, into a MOP/DOP-selective peptide Leu-enkephalin (**Fig. 1**). This, and similar observations on other neuropeptide families, gave rise to two major hypotheses: a) the *message-address concept*, first introduced in 1977 (Schwyzer, 1977)), in which the N-terminal 5 residues (message) are responsible for specific binding and receptor activation, while the positively charged C-terminus (address) is responsible for KOP receptor selectivity by concentrating the peptide in the vicinity of the receptor; b) the *membrane compartment concept*, in which the lipid bilayer plays an active role in catalyzing the peptide-receptor interaction (Auge, Bersch, Tropis, & Milon, 2000; Axelrod & Wang, 1994; Bersch, Koehl, Nakatani, Ourisson, & Milon, 1993; Czaplicki & Milon, 1998, 2005; Milon, Miyazawa, & Higashijima, 1990; Sargent & Schwyzer, 1986). One reason for the correlation between KOP receptor subtype specificity and the positively charged C-terminus (besides the potential role of the bilayer itself) became clear when the opiate receptors were cloned in 1992-1994 (Chen, Mestek, Liu, Hurley, & Yu, 1993; Evans, Keith, Morrison, Magendzo, & Edwards, 1992; Kieffer, Befort, Gaveriaux-Ruff, & Hirth, 1992; Mollereau, et al., 1994; Yasuda, et al., 1993). Indeed, it appeared that a specific feature of KOP and NOP receptors as compared to MOP and DOP receptors is the high negative potential surrounding the extracellular loops 2 (**Fig. 2**), which is expected to increase the local concentration of highly positively-charged neuropeptides (such as dynorphin and nociceptin for KOP and NOP, respectively). Dynorphin affinity for the extracellular loop 2 was further confirmed experimentally (Bjorneras et al., 2014). The sole effect of an attractive electrostatic potential may account for increased on-rate binding kinetics and receptor binding affinity by at least two orders of magnitude (Fersht, 1999).

	ECL1		ECL2		ECL3		ECL2 charge
KOP:	LMNSWPF	GDV	LCKI . . .	GGTKVREDVDVIECSLQFP	DDYSWWD . . .	EALGSTSHST-AALSSY	-6
MOP:	LMGTWPF	GTILCKI . . .	ATKYRQ--GSIDCTLTFSHPTW-YWE . . .	KALVTIPETT-FQTVSW			0
DOP:	LMETWPF	GELLCKA . . .	AVTRPRD--GAVVCMLQFPSPSW-YWD . . .	WTLVDIDRRDPLVVAAL			0
NOP:	LLGFWPF	GNALCKT . . .	GSAQVED--EEIECLVEIPTPQD-YWG . . .	QGLGVQPSSE-TAVAIL			-7

Figure 2: Primary sequences of the extracellular loops of the opioid receptor subtypes, KOP, MOP, DOP and NOP showing that the extracellular loop 2 (ECL2) is particularly rich in negative charges in KOP and NOP, while it is neutral for MOP and DOP. A similar trend is observed for the entire

extracellular surface. This characteristic contributes to KOP specificity of positively charged dynorphin analogues as shown with MOP/KOP chimeric receptors (J. B. Wang, Johnson, Wu, Wang, & Uhl, 1994).

III. KOP cloning, site-directed mutagenesis and heterologous expression systems

KOP (Li, et al., 1993; Meng, et al., 1993; Simonin, et al., 1995; Yasuda, et al., 1993; J. Zhu, et al., 1995) and the other three opioid receptors DOP, MOP and NOP (Chen, et al., 1993; Evans, et al., 1992; Kieffer, et al., 1992; Mollereau, et al., 1994; Yasuda, et al., 1993) were cloned in the early nineties. KOP shares 60% sequence similarity with the other receptors. The highest sequence diversity is located in the N-terminus, C-terminus and extracellular loops (Waldhoer, et al., 2004). Moreover, all four opioid receptors possess a remarkable signature, specific to class A GPCRs, which includes a sodium binding pocket (residues numbering corresponds to human KOP; superscripts are given according to Ballesteros-Weinstein numbering (Ballesteros & Weinstein, 1995)): D105^{2.50}, N141^{3.35}, S145^{3.39}; a PIF micro-switch P238^{5.50}, I146^{3.40}, F283^{6.44}; a NPxxY motif N326^{7.49}, Y330^{7.53}; a DRY motif D155^{3.49}, R156^{3.50}, Y157^{3.51} and a cysteine disulfide bridge C131^{3.25}, C210ECL2 (**Fig. 3**). Heterologous expression and site-directed mutagenesis experiments were then used intensively to better understand the receptor architecture, ligand recognition specificity and activation mechanisms. It was shown that the extracellular loops play a major role in receptor subtype specificity (Metzger & Ferguson, 1995; Seki et al., 1998). Several key transmembrane residues were identified, such as S187^{4.54} (Claude et al., 1996), E297^{6.58} (Larson, Jones, Hjorth, Schwartz, & Portoghese, 2000; Sharma, Jones, Metzger, Ferguson, & Portoghese, 2001), Y312^{7.35} (Metzger, Paterlini, Ferguson, & Portoghese, 2001) and I316^{7.39} (Owens & Akil, 2002). Using KOP/DOP chimeric receptor, Kong et al. obtained indirect evidence that “agonists and antagonists bind to different domains of the cloned kappa opioid receptor” (Kong et al., 1994). However, recent structures of KOP in the presence of antagonist (H. Wu et al., 2012) and agonist (Che et al., 2018) do not support this statement, illustrating the difficulties of drawing firm conclusions from these approaches in the absence of precise 3D structures. Using the 3D structures of KOP, extensive mutagenesis experiments were performed to characterize the interaction of KOP with dynorphin, as well as with other non-peptide ligands such as salvinorin, which are summarized, together with previous studies, in **Figure 3 and Table 1**.

KOP mutant	Binding	Potency	References
T111 ^{2.56}	↔	↓	3
Q115 ^{2.60}	↓	↓	2
Y119 ^{2.64}	↓	↓	1, 2
D138 ^{3.32}	↓	↓	2, 3
Y139 ^{3.33}	↔	↓	1, 2, 3
M142 ^{3.36}	↔	↓	2
W287 ^{6.48}	↔	↓	3
H291 ^{6.52}	↓	↓	2, 3
I294 ^{6.55}	↓	↓	2
Y312 ^{7.34}	↔	↓	1, 2, 3
Y313 ^{7.35}	↓	↓	1, 3
I316 ^{7.39}	↓	↓	2
G319 ^{7.42}	↔	↓	3
Y320 ^{7.43}	↓	↓	1, 2, 3

Table 1: Main point mutations of KOP and their consequences on dynorphin binding and functional activity (cAMP inhibition assay). References: 1 (Yan et al., 2005); 2 (Vardy, et al., 2013); 3 (Che, et al., 2018).

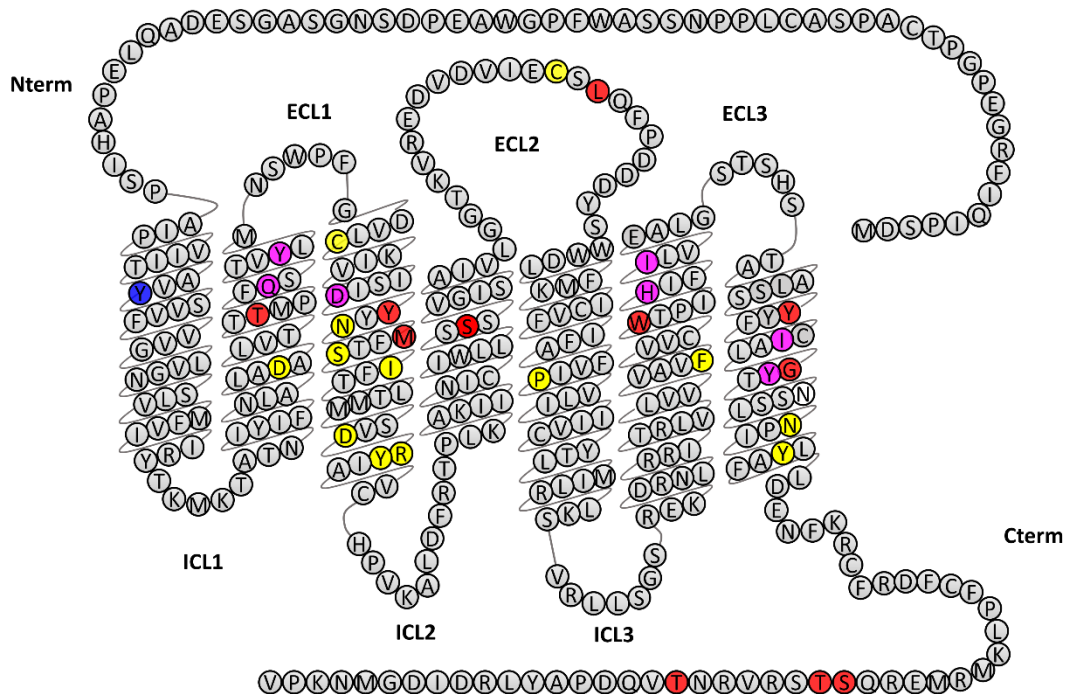


Figure 3: Primary sequence of human KOP highlighting mutations shown to affect KOP-dynorphin interactions. The limits of the seven α -helices were defined according to the activated KOP 3D structure (Che, et al., 2018). In the three-dimensional structure of inactive KOP (H. Wu, et al., 2012) these limits differ slightly for α -helix 5 (D218^{5.30} to S260^{5.72} instead of W221^{5.33} to S255^{5.67}), α -helix 6 (R267^{6.28} to

L299^{6.60} instead of R263^{6.24} to G300^{6.61}) and α -helix 7 (L309^{7.32} to L333^{7.56} instead of T306^{7.29} to D334^{7.57}). Mutations affecting dynorphin binding (more than 10-fold increase in K_d) are colored in blue (Y66^{1.39}), those affecting signaling (more than 10-fold increase in EC_{50} in cAMP inhibition assay) are colored in red (T111^{2.56}, Y139^{3.33}, M142^{3.36}, S187^{4.54}, C210^{ECL2}, L212^{ECL2}, W287^{6.48}, Y312^{7.35}, G319^{7.43}, S356^{Ct}, T357^{Ct}, T363^{Ct}) and those affecting both are colored in magenta (Q115^{2.60}, Y119^{2.64}, D138^{3.32}, H291^{6.52}, I294^{6.55}, I316^{7.39}, Y320^{7.43}). Other residues generally considered to play a role in opioid receptor activation (Che, et al., 2018; Koehl et al., 2018) are colored in yellow (cysteine disulfide bridge C131^{3.25}, C210^{ECL2}; sodium binding pocket: D105^{2.50}, N141^{3.35}, S145^{3.39}; PIF microswitch: P238^{5.50}, I146^{3.40}, F283^{6.44}; NPxxY motif: N326^{7.49}, Y330^{7.53}; DRY motif: D155^{3.49}, R156^{3.50}, Y157^{3.51}). Residues D^{3.32} and Y^{7.43} (conserved in all four opioid receptors) were shown to form direct contacts with DAMGO N-terminus in the DAMGO-MOP-Gi structure (Koehl, et al., 2018) and thus presumably with the N-terminus of dynorphin in the case of KOP. Residue H^{6.52} is conserved in MOP, KOP and DOP and forms a water-mediated contact with the phenol group of Tyr1 in the same MOP structure. Interestingly, this residue H^{6.52} is mutated to a glutamine in NOP, whose ligand nociceptin possesses a phenylalanine at position 1 and is thus devoid of the phenol hydroxyl group. It should be noted that for clarity, this figure presents data obtained with dynorphin (mostly from (Claude, et al., 1996, Che, 2018 #199; Vardy et al., 2013) and not with other non-peptide ligands for which other deleterious mutations have been described. Superscripts are given according to Ballesteros-Weinstein numbering (Ballesteros & Weinstein, 1995); residues numbering corresponds to human KOP.

IV. Structure and dynamics of dynorphin and its receptor based on experimental 3D structures

Three-dimensional structures of GPCRs at atomic resolution began to appear with the structure of rhodopsin A (Palczewski et al., 2000). However, rhodopsin was a specific case due to its unusual stability and availability from natural sources, and further efforts were necessary to solve the three-dimensional structures of recombinant GPCRs. Several international consortia developed crucial methodologies in protein expression systems, receptor stabilization by mutagenesis, fusion proteins, the selection of stabilizing ligands, binding to antibodies (particularly nanobodies), the development of better solubilizing and crystallizing media (Caffrey & Cherezov, 2009; Cherezov, 2011; Granier & Kobilka, 2012; Kobilka & Schertler, 2008; Rosenbaum, Rasmussen, & Kobilka, 2009; Stevens et al., 2013; Tate, 2012).

Most GPCR structures were obtained from membrane proteins expressed in eukaryotic insect cells where the flexible N- and C-termini, as well as the intracellular loops (mostly ICL3), were deleted or replaced by exogenous protein domains promoting thermostability and crystallization, such as T4 lysozyme or the thermostabilized apocytochrome b562 RIL (BRIL) (Chun et al., 2012; Lv et al., 2016). Other expression systems have been used such as the methylotrophic yeast *P. pastoris* (Talmont, Sidobre, Demange, Milon, & Emorine, 1996), which allows stable isotope labelling, including perdeuteration (Massou et al., 1999), mostly for NMR experiments (Eddy et al., 2018). *E. coli* is also an interesting host for isotope-labelled

GPCR biosynthesis which can be achieved by receptor expression as inclusion bodies followed by *in vitro* refolding during the protein purification (Baneres et al., 2003; Baneres, Popot, & Mouillac, 2011; Casiraghi et al., 2016). We have shown this strategy to be efficient for KOP: the dynorphin-KOP interaction was measured in our laboratory using KOP expressed in *E. coli* and refolded (unpublished results), and the same results were obtained as with KOP produced and purified from sf9 cell membranes (O'Connor et al., 2015).

These methodological developments allowed the first three-dimensional structure of a recombinant GPCR, the β 2-adrenergic receptor, to be solved in 2007 (Rosenbaum et al., 2007). This marked the beginning of a new era of GPCR structural biology: according to the database GPCRdb, 270 structures of receptor-ligand complexes had been solved by September 2018, including 52 unique receptor complexes (<http://gpcrdb.org/structure/statistics>). In 2011 the first structure of the β 2-adrenergic receptor in its active form (that is in the presence of an agonist and a G-protein or a nanobody mimicking the G-protein) was solved, thus revealing for the first time the atomic details of an activation mechanism of a GPCR (Rasmussen, Choi, et al., 2011; Rasmussen, DeVree, et al., 2011). The field of opioid receptors followed closely this revolution, with structures of the four opioid receptors solved in their inactive state in 2012 (Granier et al., 2012; Manglik et al., 2012; Thompson et al., 2012; H. X. Wu et al., 2012), and later in their active states for MOP (Huang et al., 2015; Koehl, et al., 2018) and KOP (Che, et al., 2018). An overlay of KOP in its inactive state, in complex with the antagonist JD_{Tic} (PDB 4DJH), and in its activated state, in complex with the agonist MP1104 and a nanobody mimicking G-protein (Nb39) (PDB 6B7S) illustrates the general mechanism of activation (**Fig. 4**): it is characterized by outward movements of transmembrane helix 6 (TM6) (by 10 Å) and ICL2 and inward movements of TM5 and TM7, leading to the creation of an intracellular pocket into which G-proteins can penetrate. These movements are associated with a contraction (10% reduction in volume of the ligand binding pocket) of the extracellular portion in the active-state KOP, with extracellular loop 2 (ECL2) and TM4 and TM6 moving closer to the receptor core (Che, et al., 2018). Both ligands, the antagonist JD_{Tic} and the agonist MP1104 bind at a similar location, with conserved contacts, in particular a salt bridge to D138^{3.32} in TM3 and a water-mediated hydrogen bond with the backbone carbonyl oxygen of K227^{5.39}. Comparison of the active and inactive states of KOP indicates structural changes involving several residues of TM3, which are thus believed to be critical for coupling ligand-mediated changes in the orthosteric site and the transducer interface. This coupling is in part mediated by changes in a sodium binding pocket (formed by residues D105^{2.50}, N141^{3.35} and S145^{3.39}) which acts as a negative allosteric

modulator at opioid receptors (Fenalti et al., 2014; V. Katritch et al., 2014; Pasternak, Snowman, & Snyder, 1975).

With these data in hand, it may appear that the structural biology of opioid receptors and the molecular details of their activation mechanism are now well understood. This is not entirely true for several reasons: firstly, GPCRs in general and opioid receptors in particular must be understood in terms of interactions with other intracellular protein partners such as arrestins (Kang et al., 2015; Zhou et al., 2017), and with phospholipids and cholesterol within membrane domains (Dawaliby et al., 2016; Lagane et al., 2000; Meral et al., 2018; Pucadyil & Chattopadhyay, 2006; Xu et al., 2006), where they can form homo- and hetero-oligomers (Ferre et al., 2014; Jordan & Devi, 1999). Secondly, another important emerging characteristic of GPCRs is their extremely complex conformational landscape, within which the X-ray structures determined to date should be viewed as specific snapshots (Casiraghi et al., 2016; Deupi & Kobilka, 2010; Hilger, Masureel, & Kobilka, 2018). Thirdly, it is extremely difficult to solve three-dimensional structures of complexes of a GPCR with its natural peptide agonist. So far,

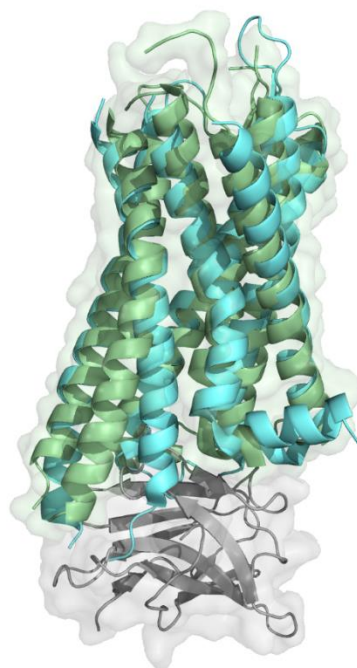


Figure 4: Superposition of the X-ray structures of KOP in its inactive state (in blue, PDB 4DJH) and in its active state (in green, PDB 6B7S). The nanobody present in the active state is shown in grey, penetrating a pocket created by the displacement of TM6. The antagonist and agonist in the inactive and active states respectively are not displayed.

the structure of DOP in complex with a non-natural peptide antagonist has been solved (Fenalti et al., 2015), and the structure of MOP in complex with DAMGO, a highly specific synthetic peptide agonist analogue, and Gi heterotrimeric protein has been solved at 3.5 Å resolution by cryo-electron microscopy (Koehl, et al., 2018).

NMR has proven highly efficient in demonstrating the conformational heterogeneity of GPCRs and their ligands (Bokoch et al., 2010; Casiraghi, et al., 2016; Didenko, Liu, Horst, Stevens, & Wuthrich, 2013; Nygaard et al., 2013), including opioid receptors (Sounier et al., 2015). In collaboration with R.C. Stevens and K. Wüthrich, we have solved the structure of dynorphin 1-13 bound to KOP in the absence of G-proteins by NMR, thus in its low affinity state for agonists (O'Connor et al., 2015). A well-defined α -helical conformation forms from Leu5 to Arg9 upon receptor binding (**Fig. 5A**). Most interestingly, ^{15}N relaxation measurements indicate that the peptide remains flexible on a nanosecond time scale in its receptor-bound state (**Fig. 5B**). This was expected for the C-terminus in which non-specific electrostatic interaction contribute to receptor binding (i.e. for the “address” part of dynorphin). It was however unexpected for the first four amino acids Tyr1-Gly2-Gly3-Phe4 which form the signature of opioid peptides (the “message”) and which cannot be modified without affecting receptor binding and activation (Naqvi, et al., 1998). This mobility may be characteristic of an intermediate binding state observed for the G-protein uncoupled receptor, and work is in progress to determine whether N-terminal immobilization occurs in the high-affinity ternary complex of peptide, receptor and G-protein or the Nb39 nanobody used to stabilize the active conformation (Che, et al., 2018).

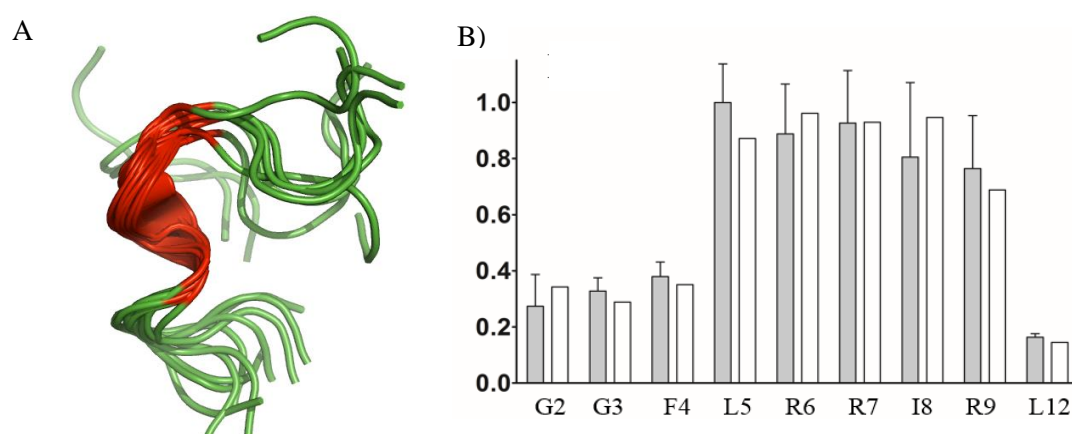


Figure 5: A) receptor-bound conformation of dynorphin 1-13: a α -helical conformation is formed between Phe4 and Arg9; B) Order parameter profile of dynorphin N-H bonds in the receptor-bound state. *Grey*: experimental data; *White*: calculated S^2 profiles from molecular dynamics simulations of dynorphin-receptor complexes. Note that both the N- and C-termini remain flexible in the receptor-bound state.

V. Building 3D models of dynorphin-KOP complexes

Modelling structures of complexes formed by KOP and its agonists or antagonists has been attempted for more than 20 years (Alonso, Bliznyuk, & Gready, 2006; Bailey & Husbands, 2018; Benyhe, Zador, & Otvos, 2015; Bera, Marathe, Payghan, & Ghoshal, 2018; Gentilucci, Tolomelli, De Marco, & Artali, 2012; Johnson, 2017; Kane, Svensson, & Ferguson, 2006; Kaserer, Lantero, Schmidhammer, Spetea, & Schuster, 2016; Kolinski & Filipek, 2010; Lavecchia, Greco, Novellino, Vittorio, & Ronsisvalle, 2000; Martinez-Mayorga et al., 2013; Patra, Kumar, Pasha, & Chopra, 2012; Tessmer, Meyer, Hruba, & Kallick, 1997; Wu, Song, Graaf, & Stevens, 2017; Yongye & Martínez-Mayorga, 2012). Some of these models specifically focused on dynorphin (Bjorneras, et al., 2014; Charles Chavkin, 2013; Iadanza, Höltje, Ronsisvalle, & Höltje, 2002; Kang, et al., 2015; O'Connor, et al., 2015; Paterlini, Portoghese, & Ferguson, 1997; Sankararamakrishnan & Weinstein, 2000; Smeets et al., 2016; Vardy, et al., 2013). Early studies, performed before any experimentally determined receptor structures were available, were based entirely on modelling (Iadanza, et al., 2002; Paterlini, et al., 1997; Wan et al., 2000). Dynorphin was positioned within the receptor such that it was in agreement with mutagenesis data. Specifically, the spatial proximity between the N-terminus of dynorphin and residue D138^{3.32} was preserved. Recent progress in obtaining X-ray and electron microscopy structures of the opioid receptors has enabled significant advances, due to the wealth of details for both the receptor structure and the binding modes of associated ligands. A binding mode was proposed for dynorphin 1-8, in which the peptide's N terminal mimics the orientation of the phenol-like ring of the JDTic antagonist (Vardy, et al., 2013). The structure of dynorphin 1-13 in the bound state was determined using transferred NOE experiments and that of the dynorphin-KOP complex was modelled using restraints from NMR, in particular N-H bond order parameters derived from ¹⁵N R₂ relaxation rates, as discussed below (O'Connor, et al., 2015),.

A protocol has been developed for creating three-dimensional structures of dynorphin-KOP complexes (O'Connor, et al., 2015). The molecular modelling approach (**Fig. 6**) starts with the separate preparation of the two molecules. Although a KOP structure in complex with an antagonist was known from X-ray studies (H. Wu et al., 2012) a MOP structure mutated into KOP was used as starting point to avoid possible structural distortions caused by JDTic binding. Following the addition of missing residues and the prediction of rotamers of their side-chains (Krivov, Shapovalov, & Dunbrack, 2009; Nagata, Randall, & Baldi, 2012), the structure was

relaxed and equilibrated in a 100 ns molecular dynamics (MD) run (R Salomon-Ferrer, Case, & Walker, 2013; Romelia Salomon-Ferrer, Götze, Poole, Le Grand, & Walker, 2013), followed by a clustering procedure which allowed major conformers of the receptor to be identified. The use of a cluster radius of 2 Å resulted in eight families of structures, whose representative members were selected as those being closest to the cluster centroids. Six major KOP structures were retained for docking. The modelling of dynorphin involved a typical MD simulation coupled with a simulated annealing protocol (Nilges, Clore, & Gronenborn, 1988), run in the presence of NMR constraints to preserve the peptide structure previously determined by NMR. The results indicated the existence of an α -helical turn involving residues Leu5-Ile8, and a disordered peptide elsewhere. In the subsequent docking procedure, the backbone of residues Leu5-Ile8 was therefore held fixed, while the rest of the molecule (backbone and side-chains) remained flexible. The KOP molecule was mostly held rigid, except for 16 residues whose side-chains were allowed to be flexible as they were considered likely to interact with the peptide in the binding pocket. Flexible docking was performed with the AutoDock Vina program (Trott & Olson, 2009), by launching multiple runs on each of the six retained KOP structures. The results were filtered to keep the 10 best poses per each KOP structure. This produced a set of 60 structures of the dynorphin-KOP complex, which was reduced to a set of 22 structures after selecting the best representatives from each family, characterized by lowest energies. The stability of the complexes was verified by running further MD simulations for times ranging from 50 to 100 ns.

The crucial final step consisted of comparing the values of the order parameters calculated from the generated structures with those obtained from NMR experiments. The calculations were based on the hypothesis that the flexible peptide adopts varying conformations and that its order parameter should be averaged over different conformers. The exchange is fast on the NMR time scale, but beyond the reach of MD simulations (1 μ s – 1 ms). To find the minimum number of conformations required to reproduce the experimental order parameters, all combinations of modelled structures were taken into account. As a result, five major dynorphin conformations were identified, revealing significant structural diversity in both N- and C- termini.

Analysis of the resulting complexes allowed us to conclude that the position of a phenol-like functional group in the orthosteric site was largely conserved, for antagonist-bound structures of KOP-JDTic, as well as DOP-DIPP and MOP-funaltrexamine. One of the structural models (available in (O'Connor, et al., 2015)) revealed Tyr1 in a position near the phenol-piperidine fused-ring system of JDTic, resembling a previously proposed binding mode (Vardy, et al., 2013). Another model suggested that the side-chain of Tyr1 is close to the allosteric sodium

binding site. D138^{3.32} makes polar contacts with Tyr1, Gly2 and Gly3 in both of these models. However, only the latter features polar contacts of both Tyr1 and Arg7 with W287^{6.48} and N322^{7.45}.

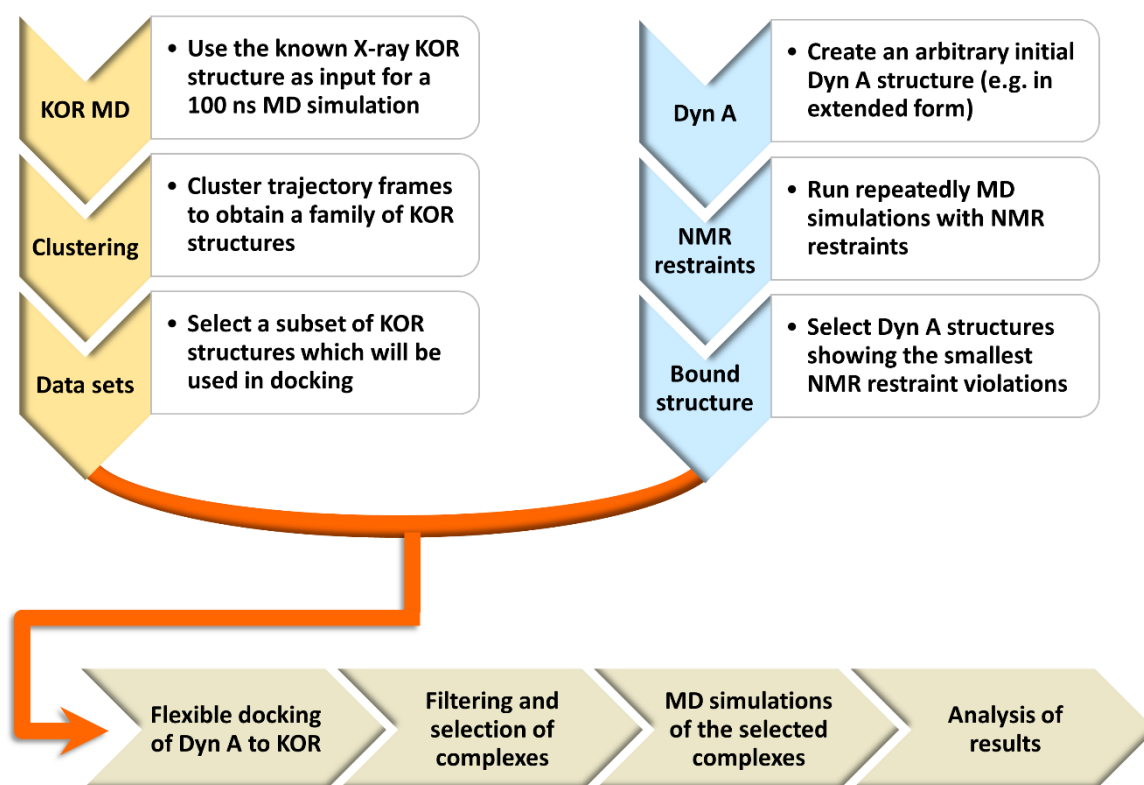


Figure 6: Molecular modelling protocol leading to three-dimensional structures of dynorphin-KOP complexes. Briefly, plausible KOP structures were obtained from MD simulations using an X-ray structure as input, while dynorphin models were obtained from simulations with NMR constraints. Subsequent docking, filtering and verification of stability of complex structures thus obtained permitted a selection of the optimal result. See the text for a more detailed description of the procedure.

VI. Development of novel KOP ligands based on structural knowledge

Opioids possess powerful properties and are currently the most effective analgesics available, but development is still needed to reduce their undesired side-effects (Dogra & Yadav, 2015). KOP agonists produce analgesia but, for most, their use is limited by centrally-mediated adverse effects such as dysphoria. Nalfurafine (TRX-820), that does not induce dysphoria, has been registered in Japan since 2009 for the treatment of uremic pruritus (Kozono, Yoshitani, & Nakano, 2018). Several peripherally-restricted (to avoid undesired effects) KOP agonists are

currently in clinical trials: asimadoline (EMD-61753) (Delvaux et al., 2004; Szarka et al., 2007) and difelikefalin (CR845) (Hesselink, 2017) for irritable bowel syndrome and chronic or post-operative pain (<https://clinicaltrials.gov/>). Another promising strategy is the development of KOP-biased ligands: by acting as agonists for the G-protein-dependent signaling and not for G-protein-independent pathways, they could induce analgesia without dysphoria (Dogra & Yadav, 2015). In addition, there is a strong potential for KOP antagonists as antidepressant, anxiolytic or anti-addiction drugs (Zheng, et al., 2017). The knowledge obtained from the structures of inactive KOP (H. X. Wu, et al., 2012), KOP-bound dynorphin (O'Connor, et al., 2015) and G-protein bound KOP (Che, et al., 2018) offers new strategies for finding novel KOP ligands (Shang & Filizola, 2015).

Among the various ways of using structural knowledge in drug discovery, structure-based virtual screening has proven successful in designing GPCR ligands, such as for D₃ dopamine (Carlsson et al., 2011; Lane et al., 2013), β_2 adrenergic (Kolb et al., 2009; Weiss et al., 2013) and A_{2A} adenosine (Carlsson et al., 2010; Vsevolod Katritch et al., 2010) receptors. It has allowed the discovery of a G-protein-biased MOP agonist that produces analgesia with diminished side-effects (Manglik et al., 2016). Studies using virtual screening from the inactive JD_{Tic}-bound KOP structure have discovered new KOP agonists (Negri et al., 2013) and new G-protein-biased agonists scaffolds (White et al., 2013). More recently, ligand-guided receptor optimization was applied to the inactive JD_{Tic}-bound KOP structure to generate alternative orthosteric pocket models that served to increase the prediction power of the methods (Zheng, et al., 2017). Virtual screening on the initial and alternative binding site models, followed by Tanimoto distances-based selection of novel chemotypes, revealed ligands in the micromolar range with a 32% hit rate. An initial optimization round generated eleven compounds with sub-micromolar affinities and functional assays defined two potent antagonists and one G-protein-biased agonist. The accumulation of precise structural knowledge on the modulation of KOP signaling activity by orthosteric ligands and allosteric modulators will certainly play a major role in future drug discovery programs.

VII. Conclusions and future perspectives

Future research into the dynorphin-KOP structure and dynamics must address one major question: what defines a ligand as a full, partial, unbiased or biased agonist, an antagonist or an inverse agonist (Wacker, Stevens, & Roth, 2017). As GPCR signaling involves multiple receptor conformations in dynamic exchange, extensive research aims to characterize their

conformational landscape and their modulation by ligands and signaling partners (Weis & Kobilka, 2018). Crystallography and electron microscopy provide structures of lowest-energy populated states (Wacker, et al., 2017). Spectroscopic methods such as NMR allow the characterization of dynamic properties (Weis & Kobilka, 2018), such as the weak allosteric coupling between the orthosteric site and the signaling interface, as described for MOP (Sounier, et al., 2015). One may take advantage of yeast or bacterial expression systems to produce specifically labelled GPCRs and perform advanced relaxation-based analyses to assess receptor dynamics, as was done recently for BLT2 (Casiraghi, et al., 2016) and A2A adenosine receptors (Clark et al., 2017; Eddy, et al., 2018). We are currently applying the methodologies we developed to determine the conformation and dynamics of KOP-bound dynorphin (O'Connor, et al., 2015) to the ternary dynorphin-KOP-Nb39 complex (where Nb39 is a nanobody which mimics G-proteins and confers high affinity binding to agonists). We thus hope to explain the 10-fold gain in dynorphin binding affinity in the presence of G-proteins. The conformational dynamics of G proteins and arrestins themselves can be modulated by the ligands (Hilger, et al., 2018). The question of conformational landscape and allosteric coupling must therefore be extended to entire GPCR signaling complexes and posed in the context of real cellular environment where modulation by lipids, membrane domains and other receptors do occur. While using information derived from structural biology, one should always bear in mind that recombinant G protein-coupled receptors *in vitro* may not recapitulate all the properties of native receptors naturally expressed in tissues as was shown for instance in (Broad et al., 2016).

References

- A. Tavani, P. Petrillo, A. La Regina, & Sbacchi, M. (1990). Role of peripheral mu, delta, and kappa opioid receptors in opioid-induced inhibition of gastrointestinal transit in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 254, 91-97.
- Ahlbeck, K. (2011). Opioids: a two-faced Janus. *Current Medical Research and Opinion*, 27(2), 439-448. doi:10.1185/03007995.2010.545379
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115, 1363–1381.
- Aldrich, J. V., & McLaughlin, J. P. (2009). Peptide kappa opioid receptor ligands: potential for drug development. *The AAPS journal*, 11(2), 312-322. doi:10.1208/s12248-009-9105-4
- Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J. A., . . . Collaborators, C. (2017). The concise guide to pharmacology 2017/18: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 174, S17-S129.
- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Greedy, J. E. (2006). Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research Reviews*, 26, 531-568.

- Attali, B., & Vogel, Z. (1989). Characterization of kappa opiate receptors in rat spinal cord-dorsal root ganglion cocultures and their regulation by chronic opiate treatment. *Brain research*, 517, 182-188.
- Auge, S., Bersch, B., Tropis, M., & Milon, A. (2000). Characterization of substance P-membrane interaction by transferred nuclear Overhauser effect. *Biopolymers*, 54(5), 297-306.
- Axelrod, D., & Wang, M. D. (1994). Reduction-of-Dimensionality Kinetics at Reaction-Limited Cell-Surface Receptors. *Biophysical Journal*, 66(3), 588-600. doi:Doi 10.1016/S0006-3495(94)80834-3
- Bailey, S. J., & Husbands, S. M. (2018). Targeting opioid receptor signaling in depression: do we need selective κ opioid receptor antagonists? *Neuronal Signaling*, 2(2).
- Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci*, 25, 366-428.
- Barchfeld, C. C., & Medzihradsky, F. (1984). Receptor-mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats. *Biomedical and biophysical research communications*, 121, 641-648.
- Benyhe, S., Zador, F., & Otvos, F. (2015). Biochemistry of opioid (morphine) receptors: binding, structure and molecular modelling. *Acta Biologica Szegediensis*, 59, 17-37.
- Bera, I., Marathe, M. V., Payghan, P. V., & Ghoshal, N. (2018). Identification of novel hits as highly prospective dual agonists for mu and kappa opioid receptors: an integrated in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(2), 279-301.
- Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A., Furuta, M., Steiner, D. F., Pintar, J. E., & Devi, L. A. (2000). Defective Prodynorphin Processing in Mice Lacking Prohormone Convertase PC2. *Journal of neurochemistry*, 75, 1763-1770.
- Bersch, B., Koehl, P., Nakatani, Y., Ourisson, G., & Milon, A. (1993). 1H nuclear magnetic resonance determination of the membrane-bound conformation of senktide, a highly selective neurokinin B agonist. *Journal of biomolecular NMR*, 3(4), 443-461.
- Bjorneras, J., Kurnik, M., Oliveberg, M., Graslund, A., Maler, L., & Danielsson, J. (2014). Direct detection of neuropeptide dynorphin A binding to the second extracellular loop of the kappa opioid receptor using a soluble protein scaffold. *Febs Journal*, 281(3), 814-824. doi:10.1111/febs.12626
- Bokoch, M. P., Nygaard, R., Zou, Y. Z., Rasmussen, S. G. F., Pardo, L., Prosser, R. S., . . . Kobilka, B. K. (2010). Conformational Changes in GPCR Surface and Core Probed by [C-13]-Methyl NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 98(3), 418a-418a. doi:DOI 10.1016/j.bpj.2009.12.2257
- Bourinet, E., Soong, T. W., Stea, A., & Snutch, T. P. (1996). Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 93, 1486-1491.
- Broad, J., Maurel, D., Kung, V. W. S., Hicks, G. A., Schemann, M., Barnes, M. R., . . . Sanger, G. J. (2016). Human native kappa opioid receptor functions not predicted by recombinant receptors: Implications for drug design. *Scientific Reports*, 6. doi:ARTN 3079710.1038/srep30797
- Bruchas, M. R., & Chavkin, C. (2010). Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology*, 210, 137-147.
- Bruchas, M. R., Land, B. B., & Chavkin, C. (2010). The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain research*, 1314, 44-55. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.062
- Caffrey, M., & Cherezov, V. (2009). Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nature Protocols*, 4(5), 706-731. doi:10.1038/nprot.2009.31
- Carlsson, J., Coleman, R. G., Setola, V., Irwin, J. J., Fan, H., Schlessinger, A., . . . Shoichet, B. K. (2011). Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nature Chemical Biology*, 7(11), 769-778. doi:10.1038/nchembio.662
- Carlsson, J., Yoo, L., Gao, Z.-G., Irwin, J. J., Shoichet, B. K., & Jacobson, K. A. (2010). Structure-Based Discovery of A2A Adenosine Receptor Ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 53(9), 3748-3755. doi:10.1021/jm100240h
- Casiraghi, M., Damian, M., Lescop, E., Point, E., Moncoq, K., Morellet, N., . . . Catoire, L. J. (2016). Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a

- Lipid Bilayer. *Journal of the American Chemical Society*, 138(35), 11170-11175. doi:10.1021/jacs.6b04432
- Chavkin, C. (2013). Dynorphin–Still an Extraordinarily Potent Opioid Peptide. *Molecular Pharmacology*, 83(4), 729-736.
- Chavkin, C., Bakhit, C., Weber, E., & Bloom, F. E. (1983). Relative Contents and Concomitant Release of Prodynorphin Neoenkephalin-Derived Peptides in Rat Hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80(24), 7669-7673. doi:DOI 10.1073/pnas.80.24.7669
- Che, T., Majumdar, S., Zaidi, S. A., Ondachi, P., McCorvy, J. D., Wang, S., . . . Roth, B. L. (2018). Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor. *Cell*, 172(1-2), 55-+. doi:10.1016/j.cell.2017.12.011
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A., & Yu, L. (1993). Molecular-Cloning and Functional Expression of a Mu-Opioid Receptor from Rat-Brain. *Molecular Pharmacology*, 44(1), 8-12.
- Cherezov, V. (2011). Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(4), 559-566. doi:https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.007
- Childers, S. R., & Snyder, S. H. (1978). Guanine Nucleotides Differentiate Agonist and Antagonist Interactions with opiate receptors. *Life sciences*, 23, 759-762.
- Choi, H., Murray, T. F., DeLander, G. E., Caldwell, V., & Aldrich, J. V. (1992). N-terminal alkylated derivatives of [D-Pro10]dynorphin A-(1-11) are highly selective for kappa-opioid receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 35(24), 4638-4639.
- Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., . . . Stevens, R. C. (2012). Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, 20(6), 967-976. doi:10.1016/j.str.2012.04.010
- Civelli, O., Douglass, J., Goldstein, A., & Herbert, E. (1985). Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4291-4295.
- Clark, L. D., Dikiy, I., Chapman, K., Rodstrom, K. E., Aramini, J., LeVine, M. V., . . . Rosenbaum, D. M. (2017). Ligand modulation of sidechain dynamics in a wild-type human GPCR. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.28505
- Claude, P. A., Wotta, D. R., Zhang, X. H., Prather, P. L., McGinn, T. M., Erickson, L. J., . . . Law, P. Y. (1996). Mutation of a conserved serine in TM4 of opioid receptors confers full agonistic properties to classical antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5715-5719.
- Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R., & Scherrer, G. (2018). Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci*, 41, 453-473. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061522
- Cox, B. M., Opheim, K. E., Teachemacher, H., & Goldstein, A. (1975). A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life sciences*, 16, 1777-1782.
- Czaplicki, J., & Milon, A. (1998). Simulations of transferred NOE in a ternary peptide-receptor-lipid complex. *Chem Phys Chem (ex J Chim Phys)*, 95, 196-207.
- Czaplicki, j., & Milon, A. (2005). Quantitative analysis of transferred nuclear overhauser effects in complex spin systems by full relaxation matrix analysis. *ACTA PHYSICA POLONICA A*, 108(1), 25-32.
- Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Masureel, M., Van Antwerpen, P., Kobilka, B. K., & Govaerts, C. (2016). Allosteric regulation of G protein-coupled receptor activity by phospholipids. *Nature Chemical Biology*, 12(1), 35-+. doi:10.1038/Nchembio.1960
- Delvaux, M., Beck, A., Jacob, J., Bouzamondo, H., Weber, F. T., & Frexinos, J. (2004). Effect of asimadoline, a kappa opioid agonist, on pain induced by colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 20(2), 237-246. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.01922.x
- Deupi, X., & Kobilka, B. K. (2010). Energy Landscapes as a Tool to Integrate GPCR Structure, Dynamics, and Function. *Physiology*, 25(5), 293-303. doi:10.1152/physiol.00002.2010

- Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Portoghese, P. S., & Hamon, M. (1996). International Union of Pharmacology. XII. Classification of Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, *48*, 567-592.
- Didenko, T., Liu, J. J., Horst, R., Stevens, R. C., & Wuthrich, K. (2013). Fluorine-19 NMR of integral membrane proteins illustrated with studies of GPCRs. *Current Opinion in Structural Biology*, *23*(5), 740-747. doi:10.1016/j.sbi.2013.07.011
- Dogra, S., & Yadav, P. N. (2015). Biased agonism at kappa opioid receptors: Implication in pain and mood disorders. *European journal of pharmacology*, *763*, 184-190. doi:10.1016/j.ejphar.2015.07.018
- Eddy, M. T., Lee, M. Y., Gao, Z. G., White, K. L., Didenko, T., Horst, R., . . . Wuthrich, K. (2018). Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A(2A) Adenosine Receptor. *Cell*, *172*(1-2), 68-+. doi:10.1016/j.cell.2017.12.004
- Erne, D., Sargent, D. F., & Schwyzler, R. (1985). Preferred conformation, orientation, and accumulation of dynorphin A-(1-13)-tridecapeptide on the surface of neutral lipid membranes. *Biochemistry*, *24*(16), 4261-4263.
- Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., & Edwards, R. H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, *258*(5090), 1952-1955.
- Fenalti, G., Giguere, P. M., Katritch, V., Huang, X. P., Thompson, A. A., Cherezov, V., . . . Stevens, R. C. (2014). Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature*, *506*(7487), 191-196. doi:10.1038/nature12944
- Fenalti, G., Zatselin, N. A., Betti, C., Giguere, P., Han, G. W., Ishchenko, A., . . . Cherezov, V. (2015). Structural basis for bifunctional peptide recognition at human delta-opioid receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(3), 265-268. doi:10.1038/nsmb.2965
- Ferre, S., Casado, V., Devi, L. A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M. J., . . . Guitart, X. (2014). G Protein-Coupled Receptor Oligomerization Revisited: Functional and Pharmacological Perspectives. *Pharmacological Reviews*, *66*(2), 413-434. doi:10.1124/pr.113.008052
- Fersht, A. R. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*: Freeman, New York.
- Gentilucci, L., Tolomelli, A., De Marco, R., & Artali, R. (2012). Molecular Docking of Opiates and Opioid Peptides, a Tool for the Design of Selective Agonists and Antagonists, and for the Investigation of Atypical Ligand-Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, *19*, 1587-1601.
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L. I., Hunkapiller, M., & Hood, L. (1981). Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(11), 7219-7223.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M., & Hood, L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(12), 6666-6670.
- Granier, S., & Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nature Chemical Biology*, *8*(8), 670-673. doi:10.1038/nchembio.1025
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2012). Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*, *485*(7398), 400-U171. doi:10.1038/nature11111
- Henry, D. J., Grandy, D. K., Lester, H. A., Davidson, N., & Chavkin, C. (1995). K-Opioid Receptors Couple to Inwardly Rectifying Potassium Channels when Coexpressed by Xenopus Oocytes. *Molecular Pharmacology*, *47*, 551-557.
- Hesselink, J. M. K. (2017). CR845 (Difelikefalin), A Kappa Receptors Agonist In Phase III By CARA Therapeutics: A Case Of 'Spin' In Scientific Writing? *J of Pharmacol & Clin Res*, *2*(3), 555588. doi:10.19080/JPCR.2017.02.555588
- Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*(1), 4-12. doi:10.1038/s41594-017-0011-7

- Huang, W. J., Manglik, A., Venkatakrishnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., . . . Kobilka, B. K. (2015). Structural insights into mu-opioid receptor activation. *Nature*, *524*(7565), 315-+. doi:10.1038/nature14886
- Iadanza, M., Höltje, M., Ronsisvalle, G., & Höltje, H.-D. (2002). κ -Opioid Receptor Model in a Phospholipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulation. *Journal of medicinal chemistry*, *45*(22), 4838-4846.
- J-C. Meunier, C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, . . . Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, *377*, 532-535.
- Ji, R.-R., Zhang, Q., Law, P. Y., Low, H. H., Elde, R., & Hökfelt, T. (1995). Expression of mu-, delta-, and kappa- opioid receptor-like Immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *The Journal of Neuroscience*, *15*, 8155-8166.
- Johnson, S. (2017). *Design and Synthesis of Functionally Selective Kappa Opioid Receptor Ligands*. University of Kansas, Lawrence. Retrieved from <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/26154>
- Jordan, B. A., & Devi, L. A. (1999). G protein coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, *399*(6737), 697-700.
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., . . . Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*, *298*, 245-249.
- Kallick, D. A. (1993). Conformation of Dynorphin a(1-17) Bound to Dodecylphosphocholine Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(20), 9317-9318. doi:DOI 10.1021/ja00073a069
- Kane, B. E., Svensson, B., & Ferguson, D. M. (2006). Molecular recognition of opioid receptor ligands. *The AAPS journal*, *8*(1), E126-E137.
- Kang, Y. Y., Zhou, X. E., Gao, X., He, Y. Z., Liu, W., Ishchenko, A., . . . Xu, H. E. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, *523*(7562), 561-+. doi:10.1038/nature14656
- Kaserer, T., Lantero, A., Schmidhammer, H., Spetea, M., & Schuster, D. (2016). μ Opioid receptor: novel antagonists and structural modeling. *Scientific Reports*, *6*, 21548.
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E. E., Roth, B. L., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2014). Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(5), 233-244. doi:10.1016/j.tibs.2014.03.002
- Katritch, V., Jaakola, V.-P., Lane, J. R., Lin, J., Ijzerman, A. P., Yeager, M., . . . Abagyan, R. (2010). Structure-Based Discovery of Novel Chemotypes for Adenosine A2A Receptor Antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, *53*(4), 1799-1809. doi:10.1021/jm901647p
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., & Hirth, C. G. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(24), 12048-12052.
- Knoll, A. T., & Carlezon, W. A. (2010). Dynorphin, stress, and depression. *Brain research*, *1314*, 56-73. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.074
- Kobilka, B., & Schertler, G. F. X. (2008). New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends in pharmacological sciences*, *29*(2), 79-83. doi:10.1016/j.tips.2007.11.009
- Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J. M., . . . Kobilka, B. K. (2018). Structure of the μ -opioid receptor-Gi protein complex. *Nature*. doi:10.1038/s41586-018-0219-7
- Kolb, P., Rosenbaum, D. M., Irwin, J. J., Fung, J. J., Kobilka, B. K., & Shoichet, B. K. (2009). Structure-based discovery of beta2-adrenergic receptor ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(16), 6843-6848. doi:10.1073/pnas.0812657106
- Kolinski, M., & Filipek, S. (2010). Study of a structurally similar kappa opioid receptor agonist and antagonist pair by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Modeling*, *16*(10), 1567-1576.

- Kong, H., Raynor, K., Yano, H., Takeda, J., Bell, G. I., & Reisine, T. (1994). Agonists and antagonists bind to different domains of the cloned kappa opioid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(17), 8042-8046.
- Kozono, H., Yoshitani, H., & Nakano, R. (2018). Post-marketing surveillance study of the safety and efficacy of nalfurafine hydrochloride (Remitch((R)) capsules 2.5 mug) in 3,762 hemodialysis patients with intractable pruritus. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, *11*, 9-24. doi:10.2147/IJNRD.S145720
- Kreek, M. J., Levran, O., Reed, B., Schlussman, S. D., Zhou, Y., & Butelman, E. R. (2012). Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(10), 3387-3393. doi:10.1172/jci60390
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2010). Linking Molecules to Mood: New Insight Into the Biology of Depression. *American Journal of Psychiatry*, *167*(11), 1305-1320. doi:10.1176/appi.ajp.2009.10030434
- Krivov, G. G., Shapovalov, M. V., & Dunbrack, R. L. (2009). Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins*, *77*(4), 778-795.
- Lagane, B., Gaibelet, G., Meilhoc, E., Masson, J. M., Cezanne, L., & Lopez, A. (2000). Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33197-33200. doi:DOI 10.1074/jbc.C000576200
- Lahti, R. A., Mickelson, M. M., McCall, J. M., & Von Voigtlander, P. F. (1985). U-69593 a highly selective ligand for the opioid kappa receptor. *European journal of pharmacology*, *109*, 281-284.
- Lahti, R. A., VonVoigtlander, P. F., & Barsuhn, C. (1982). Properties of a selective kappa agonist, U-50,488H. *Life sciences*, *31*, 2257.
- Lancaster, C. R. D., Mishra, P. K., Hughes, D. W., Stpierre, S. A., Bothnerby, A. A., & Epan, R. M. (1991). Mimicking the Membrane-Mediated Conformation of Dynorphin a-(1-13)-Peptide - Circular-Dichroism and Nuclear-Magnetic-Resonance Studies in Methanolic Solution. *Biochemistry*, *30*(19), 4715-4726. doi:DOI 10.1021/bi00233a012
- Lane, J. R., Chubukov, P., Liu, W., Canals, M., Cherezov, V., Abagyan, R., . . . Katritch, V. (2013). Structure-Based Ligand Discovery Targeting Orthosteric and Allosteric Pockets of Dopamine Receptors. *Molecular Pharmacology*, *84*(6), 794-807. doi:10.1124/mol.113.088054
- Lapalu, S., Moisan, C., Mazarguil, H., Cambois, G., Mollereau, C., & Meunier, J. C. (1997). Comparison of the structure-activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides. *FEBS letters*, *417*(3), 333-336.
- Larson, D. L., Jones, R. M., Hjorth, S. A., Schwartz, T. W., & Portoghese, P. S. (2000). Binding of norbinaltorphimine (norBNI) congeners to wild-type and mutant mu and kappa opioid receptors: molecular recognition loci for the pharmacophore and address components of kappa antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, *43*(8), 1573-1576.
- Lavecchia, A., Greco, G., Novellino, E., Vittorio, F., & Ronsisvalle, G. (2000). Modeling of κ -Opioid Receptor/Agonists Interactions Using Pharmacophore-Based and Docking Simulations. *Journal of medicinal chemistry*, *43*(11), 2124-2134.
- Law, P. Y., Wong, Y. H., & Loh, H. H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *40*, 389-430.
- Li, S., Zhu, J., Chen, C. G., Chen, Y. W., Deriel, J. K., Ashby, B., & Liu-Chen, L. Y. (1993). Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem. J.*, *195*, 629-633.
- Lind, J., Graslund, A., & Maler, L. (2006). Membrane interactions of dynorphins. *Biochemistry*, *45*(51), 15931-15940. doi:10.1021/bi061199g
- Lutz, P.-E., & Kieffer, B. L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, *36*(3), 195-206. doi:10.1016/j.tins.2012.11.002
- Lv, X., Liu, J., Shi, Q., Tan, Q., Wu, D., Skinner, J. J., . . . Stevens, R. C. (2016). In vitro expression and analysis of the 826 human G protein-coupled receptors. *Protein & cell*, *7*(5), 325-337. doi:10.1007/s13238-016-0263-8

- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., . . . Granier, S. (2012). Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, *485*(7398), 321-U170. doi:10.1038/nature10954
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D. K., McCorvy, J. D., Dengler, D., Corder, G., . . . Shoichet, B. K. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, *537*(7619), 185-+. doi:10.1038/nature19112
- Mansour, A., Hoversten, M. T., Taylor, L. P., Watson, S. J., & Akil, H. (1995). The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain research*, *27*, 89-98.
- Margolis, E. B., Hjelmstad, G. O., Bonci, A., & Fields, H. L. (2003). Kappa-Opioid Agonists Directly Inhibit Midbrain Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *23*, 9981-9986.
- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E., & Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *197*(3), 517.
- Martinez-Mayorga, K., Byler, K. G., Yongye, A. B., Giulianotti, M. A., Dooley, C. T., & Houghten, R. A. (2013). Ligand/kappa-Opioid Receptor Interactions: Insights from the X-Ray Crystal Structure. *European journal of medicinal chemistry*, *66*, 114-121.
- Massou, S., Puech, V., Talmont, F., Demange, P., Lindley, N. D., Tropis, M., & Milon, A. (1999). Heterologous expression of a deuterated membrane-integrated receptor and partial deuteration in methylotrophic yeasts. *Journal of biomolecular NMR*, *14*(3), 231-239.
- Meng, F., Xie, G. X., Thompson, R. C., Mansour, A., Goldstein, A., Watson, S. J., & Akil, H. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*, 9954-9958.
- Meral, D., Provasi, D., Prada-Gracia, D., Moller, J., Marino, K., Lohse, M. J., & Filizola, M. (2018). Molecular details of dimerization kinetics reveal negligible populations of transient mu-opioid receptor homodimers at physiological concentrations. *Scientific Reports*, *8*. doi:ARTN 770510.1038/s41598-018-26070-8
- Merg, F., Filliol, D., Usynin, I., Bazov, I., Bark, N., Hurd, Y. L., . . . Bakalkin, G. (2006). Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor. *Journal of neurochemistry*, *97*(1), 292-301. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03732.x
- Metzger, T. G., & Ferguson, D. M. (1995). On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS letters*, *375*(1-2), 1-4.
- Metzger, T. G., Paterlini, M. G., Ferguson, D. M., & Portoghese, P. S. (2001). Investigation of the selectivity of oxymorphone- and naltrexone-derived ligands via site-directed mutagenesis of opioid receptors: exploring the "address" recognition locus. *Journal of medicinal chemistry*, *44*(6), 857-862.
- Milon, A., Miyazawa, T., & Higashijima, T. (1990). Transferred nuclear Overhauser effect analyses of membrane-bound enkephalin analogues by 1H nuclear magnetic resonance: correlation between activities and membrane-bound conformations. *Biochemistry*, *29*(1), 65-75.
- Minneman, K. P., & Iversen, L. L. (1976). Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature*, *262*, 313-314.
- Molineaux, C. J., & Cox, B. M. (1982). Subcellular localization of immunoreactive dynorphin and vasopressin in rat pituitary and hypothalamus. *Life sciences*, *31*, 1765-1768.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., . . . Meunier, J. C. (1994). Or11, a Novel Member of the Opioid Receptor Family - Cloning, Functional Expression and Localization. *FEBS letters*, *341*(1), 33-38. doi:Doi 10.1016/0014-5793(94)80235-1
- Nagata, K., Randall, A., & Baldi, P. (2012). SIDEpro: a Novel Machine Learning Approach for the Fast and Accurate Prediction of Side-Chain Conformations. *Proteins*, *80*(1), 142-153.
- Naito, A., & Nishimura, K. (2004). Conformational analysis of opioid peptides in the solid states and the membrane environments by NMR spectroscopy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *4*(1), 135-145. doi:Doi 10.2174/1568026043451645
- Naqvi, T., Haq, W., & Mathur, K. B. (1998). Structure-activity relationship studies of dynorphin A and related peptides. *Peptides*, *19*(7), 1277-1292.

- Negri, A., Rives, M.-L., Caspers, M. J., Prisinzano, T. E., Javitch, J. A., & Filizola, M. (2013). Discovery of a Novel Selective Kappa-Opioid Receptor Agonist Using Crystal Structure-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(3), 521-526. doi:10.1021/ci400019t
- Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1151-1159. doi:10.1016/j.biopsych.2005.09.018
- Nilges, M., Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1988). Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms Circumventing problems associated with folding. *FEBS letters*, 239(1), 129 - 136.
- Nygaard, R., Zou, Y. Z., Dror, R. O., Mildorf, T. J., Arlow, D. H., Manglik, A., . . . Kobilka, B. K. (2013). The Dynamic Process of beta(2)-Adrenergic Receptor Activation. *Cell*, 152(3), 532-542. doi:10.1016/j.cell.2013.01.008
- O'Connor, C., White, K. L., Doncescu, N., Didenko, T., Roth, B. L., Czaplicki, G., . . . Milon, A. (2015). NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), 11852-11857. doi:10.1073/pnas.1510117112
- Owens, C. E., & Akil, H. (2002). Determinants of ligand selectivity at the kappa-receptor based on the structure of the orphanin FQ receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(3), 992-999.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., . . . Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739-745. doi:DOI 10.1126/science.289.5480.739
- Pasternak, G. W., Snowman, A. M., & Snyder, S. H. (1975). Selective Enhancement of H-3 Opiate Agonist Binding by Divalent-Cations. *Molecular Pharmacology*, 11(6), 735-744.
- Paterlini, G. L., Portoghese, P. S., & Ferguson, D. M. (1997). Molecular simulation of dynorphin A-(1-10) binding to extracellular loop 2 of the kappa-opioid receptor. A model for receptor activation. *Journal of medicinal chemistry*, 40 20, 3254-3262.
- Patra, M. C., Kumar, K., Pasha, S., & Chopra, M. (2012). Comparative modeling of human kappa opioid receptor and docking analysis with the peptide YFa. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 33, 44 - 51.
- Pattinson, K. T. S. (2008). Opioids and the control of respiration. *British Journal of Anaesthesia*, 100(6), 747-758. doi:10.1093/bja/aen094
- Pickel, V. M., Chan, J., & Sesack, S. R. (1993). Cellular substrates for interactions between dynorphin terminals and dopamine dendrites in rat ventral tegmental area and substantia nigra. *Brain research*, 602, 275-289.
- Pickel, V. M., Chan, J., Veznedaroglu, E., & Milner, T. A. (1995). Neuropeptide Y and Dynorphin-Immunoreactive Large Dense-Core Vesicles Are Strategically Localized for Presynaptic Modulation in the Hippocampal Formation and Substantia Nigra. *Synapse*, 19, 160-169.
- Prather, P. L., McGinn, T. M., Claude, P. A., Liu-Chen, L. Y., Loh, H. H., & Law, P. Y. (1995). Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Molecular Brain Research*, 29, 336-346.
- Pucadyil, T. J., & Chattopadhyay, A. (2006). Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Progress in Lipid Research*, 45(4), 295-333. doi:10.1016/j.plipres.2006.02.002
- R. Bals-Kubik, A. Ableitner, A. Herz, & Shippenberg, T. S. (1993). Neuroanatomical Sites Mediating the Motivational Effects of Opioids as Mapped by the Conditioned Place Preference Paradigm in Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 264, 489-495.
- R. Spanagel, A. Herz, & Shippenberg, T. S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2046-2050.

- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392
- Ramos-Colon, C. N., Lee, Y. S., Remesic, M., Hall, S. M., LaVigne, J., Davis, P., . . . Hruby, V. J. (2016). Structure-Activity Relationships of [des-Arg(7)]Dynorphin A Analogues at the kappa Opioid Receptor. *Journal of medicinal chemistry*, *59*(22), 10291-10298. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01411
- Rasmussen, S. G. F., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., . . . Kobilka, B. K. (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*, *469*(7329), 175-180. doi:10.1038/nature09648
- Rasmussen, S. G. F., DeVree, B. T., Zou, Y. Z., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., . . . Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the beta(2) adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, *477*(7366), 549-U311. doi:10.1038/nature10361
- Raynor, K., Kong, H. Y., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G. I., & Reisine, T. (1994). Pharmacological Characterization of the Cloned Kappa-Opioid, Delta-Opioid, and Mu-Opioid Receptors. *Molecular Pharmacology*, *45*(2), 330-334.
- Renugopalakrishnan, V., Rapaka, R. S., Huang, S. G., Moore, S., & Hutson, T. B. (1988). Dynorphin-a (1-13) Peptide Nh Groups Are Solvent Exposed - Ft-Ir and 500 Mhz H-1-Nmr Spectroscopic Evidence. *Biochemical and biophysical research communications*, *151*(3), 1220-1225. doi:Doi 10.1016/S0006-291x(88)80496-0
- Rhim, H., & Miller, R. J. (1994). Opioid Receptors Modulate Diverse Types of Calcium Channels in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat. *The Journal of Neuroscience*, *14*, 7608-7615.
- Ribeiro, S. C., Kennedy, S. E., Smith, Y. R., Stohler, C. S., & Zubieta, J. K. (2005). Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and μ -opioid receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *29*(8), 1264-1280. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.011
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., . . . Kobilka, B. K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta(2)-adrenergic receptor function. *Science*, *318*(5854), 1266-1273. doi:10.1126/science.1150609
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363. doi:10.1038/nature08144
- Rusin, L. I., Giovannucci, D. R., Stuenkel, E. L., & Moises, H. C. (1997). Kappa-Opioid Receptor Activation Modulates Ca²⁺ Currents and Secretion in Isolated Neuroendocrine Nerve Terminals. *The Journal of Neuroscience*, *17*, 6565-6574.
- Sadja, R., Alagem, N., & Reuveny, E. (2003). Gating of GIRK Channels: Minireview Details of an Intricate, Membrane-Delimited Signaling Complex. *Neuron*, *39*, 9-12.
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*, *3*, 198-210.
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C. (2013). Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J. Chem. Theory Comput.*, *9*, 3878-3888.
- Sankaramakrishnan, R., & Weinstein, H. (2000). Molecular dynamics simulations predict a tilted orientation for the helical region of dynorphin A(1-17) in dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, *79*(5), 2331-2344.
- Sargent, D. F., & Schwyzer, R. (1986). Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(16), 5774-5778.
- Schneider, S. P., Eckert, W. A., & Light, A. R. (1998). Opioid-Activated Postsynaptic, Inward Rectifying Potassium Currents in Whole Cell Recordings in Substantia Gelatinosa Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *80*, 2954-2962.
- Schwyzler, R. (1977). ACTH: a short introductory review. *Ann N Y Acad Sci*, *297*, 3-26.
- Seki, T., Minami, M., Nakagawa, T., Ienaga, Y., Morisada, A., & Satoh, M. (1998). DAMGO recognizes four residues in the third extracellular loop to discriminate between mu- and kappa-opioid receptors. *European journal of pharmacology*, *350*(2-3), 301-310.

- Shang, Y., & Filizola, M. (2015). Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *European journal of pharmacology*, 763, 206-213. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.012
- Sharma, S. K., Jones, R. M., Metzger, T. G., Ferguson, D. M., & Portoghese, P. S. (2001). Transformation of a kappa-opioid receptor antagonist to a kappa-agonist by transfer of a guanidinium group from the 5'- to 6'-position of naltrindole. *Journal of medicinal chemistry*, 44(13), 2073-2079.
- Simonin, F., Gavériaux-Ruff, C., Befort, K., Mathes, H., Lannes, B., Micheletti, G., . . . Kieffer, B. (1995). Kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7006-7010.
- Smeets, C. J. L. M., Zmorzyńska, J., Melo, M. N., Stargardt, A., Dooley, C., Bakalkin, G., . . . Verbeek, D. S. (2016). Altered secondary structure of Dynorphin A associates with loss of opioid signalling and NMDA-mediated excitotoxicity in SCA23. *Human Molecular Genetics*, 25(13), 2728-2737.
- Sounier, R., Mas, C., Steyaert, J., Laeremans, T., Manglik, A., Huang, W. J., . . . Granier, S. (2015). Propagation of conformational changes during mu-opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), 375-+. doi:10.1038/nature14680
- Spadaccini, R., Crescenzi, O., Picone, D., Tancredi, T., & Temussi, P. A. (1999). Solution structure of dynorphin A (1-17): a NMR study in a cryoprotective solvent mixture at 278 K. *Journal of Peptide Science*, 5(7), 306-312. doi:Doi 10.1002/(Sici)1099-1387(199907)5:7<306::Aid-Psc199>3.0.Co;2-B
- Stevens, R. C., Cherezov, V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., & Wuthrich, K. (2013). The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(1), 25-34. doi:10.1038/nrd3859
- Szarka, L. A., Camilleri, M., Burton, D., Fox, J. C., McKinzie, S., Stanislav, T., . . . Zinsmeister, A. R. (2007). Efficacy of on-demand asimadoline, a peripheral kappa-opioid agonist, in females with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5(11), 1268-1275. doi:10.1016/j.cgh.2007.07.011
- Talmont, F., Sidobre, S., Demange, P., Milon, A., & Emorine, L. J. (1996). Expression and pharmacological characterization of the human mu-opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS letters*, 394(3), 268-272.
- Tate, C. G. (2012). A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9), 343-352. doi:10.1016/j.tibs.2012.06.003
- Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J. A., & Gilman, A. G. (1993). Inhibition of Adenylyl Cyclase by Gialpha. *Science*, 261, 218-221.
- Tessmer, M. R., Meyer, J.-P., Hruby, V. J., & Kallick, D. A. (1997). Structural Model of a Cyclic Dynorphin A Analog Bound to Dodecylphosphocholine Micelles by NMR and Restrained Molecular Dynamics. *Journal of medicinal chemistry*, 40(14), 2148-2155.
- Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H. X., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, 485(7398), 395-U150. doi:10.1038/nature11085
- Toll, L., Berzetei-Gurske, I. P., Polgar, W. E., Brandt, S. R., Adapa, I. D., Rodriguez, L., . . . Auh, J. S. (1998). Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr.*, 178, 440-466.
- Trott, O., & Olson, A., J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- Vanderah, T. W. (2010). Delta and Kappa Opioid Receptors as Suitable Drug Targets for Pain. *Clin J Pain*, 26, 10-15.
- Vardy, E., Mosier, P. D., Frankowski, K. J., Wu, H. X., Katritch, V., Westkaemper, R. B., . . . Roth, B. L. (2013). Chemotype-selective Modes of Action of kappa-Opioid Receptor Agonists. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34470-34483. doi:10.1074/jbc.M113.515668

- Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*, 170(3), 414-427. doi:10.1016/j.cell.2017.07.009
- Wagner, J. J., Evans, C. J., & Chavkin, C. (1991). Focal Stimulation of the Mossy Fibers Releases Endogenous Dynorphins That Bind Kappa-Opioid Receptors in Guinea Pig Hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 57, 333-343.
- Wagner, J. J., Terman, G. W., & Chavkin, C. (1993). Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature*, 363, 451-454.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 953-990. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940
- Wan, X., Huang, X.-Q., Zhou, D.-H., Jiang, H.-L., Feng, Y.-P., Chen, K.-X., & Chi, Z.-Q. (2000). Molecular Modeling of Kappa Opioid Receptor-Gi Protein Recognition. *Protein and Peptide Letters*, 7, 403-409.
- Wang, D., Sun, X., & Sadee, W. (2007). Different Effects of Opioid Antagonists on Mu, Delta and Kappa Opioid Receptors with and without Agonist Pretreatment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321, 544-552.
- Wang, J. B., Johnson, P. S., Wu, J. M., Wang, W. F., & Uhl, G. R. (1994). Human kappa opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human mu/kappa chimeras. *The Journal of biological chemistry*, 269(42), 25966-25969.
- Weber, E., Evans, C. J., & Barchas, J. D. (1982). Predominance of the amino-terminal octapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions. *Nature*, 299, 77-79.
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 897-919. doi:10.1146/annurev-biochem060614-033910
- Weiss, D. R., Ahn, S., Sassano, M. F., Kleist, A., Zhu, X., Strachan, R., . . . Shoichet, B. K. (2013). Conformation Guides Molecular Efficacy in Docking Screens of Activated β -2 Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *ACS Chemical Biology*, 8(5), 1018-1026. doi:10.1021/cb400103f
- White, K. L., Scopton, A. P., Rives, M. L., Bikbulatov, R. V., Polepally, P. R., Brown, P. J., . . . Roth, B. L. (2013). Identification of Novel Functionally Selective κ -Opioid Receptor Scaffolds. *Molecular Pharmacology*, 85(1), 83-90. doi:10.1124/mol.113.089649
- Whitnall, M. H., Gainer, H., Cox, B. M., & Molineaux, C. J. (1983). Dynorphin-A-(1-8) is contained within vasopressin neurosecretory vesicles in rat pituitary. *Science*, 222, 1137-1139.
- Wu, F., Song, G., Graaf, C. d., & Stevens, R. C. (2017). Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Molecular Biology*, 429(17), 2726 - 2745.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JD₁Tic. *Nature*, 485, 327.
- Wu, H. X., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD₁Tic. *Nature*, 485(7398), 327-U369. doi:10.1038/nature10939
- Xu, W., Yoon, S. I., Huang, P., Wang, Y. L., Chen, C. G., Chong, P. L. G., & Liu-Chen, L. Y. (2006). Localization of the kappa opioid receptor in lipid rafts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1295-1306. doi:10.1124/jpet.105.099507
- Y. Feng, X. He, Y. Yang, D. Chao, L. H. Lazarus, & Xia, Y. (2012). Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr Drug Targets*, 13, 230-246.
- Yan, F., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., Stewart, J., Zjawiony, J. K., Vortherms, T. A., . . . Roth, B. L. (2005). Identification of the Molecular Mechanisms by Which the Diterpenoid Salvinorin A Binds to κ -Opioid Receptors. *Biochemistry*, 44(24), 8643-8651. doi:10.1021/bi050490d
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T., & Bell, G. I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6736-6740.
- Yongye, A., & Martínez-Mayorga, K. (2012). *Molecular Aspects of Opioid Receptors and Opioid Receptor Painkillers*.
- Zamir, N., Palkovits, M., Weber, E., MEzey, E., & Brownstein, M. J. (1984). A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, 307, 643-645.

- Zamponi, G. W., & Snutch, T. P. (1998). Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Current Opinion in Neurobiology*, *8*, 351-356.
- Zheng, Z., Huang, X.-P., Mangano, T. J., Zou, R., Chen, X., Zaidi, S. A., . . . Katritch, V. (2017). Structure-Based Discovery of New Antagonist and Biased Agonist Chemotypes for the Kappa Opioid Receptor. *Journal of medicinal chemistry*, *60*(7), 3070-3081. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00109
- Zhou, X. E., He, Y. Z., de Waal, P. W., Gao, X., Kang, Y. Y., Van Eps, N., . . . Xu, H. E. (2017). Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, *170*(3), 457-+. doi:10.1016/j.cell.2017.07.002
- Zhu, J., Chen, C., Xue, J. C., Kunapuli, S., DeRiel, J. K., & Liu-Chen, L. Y. (1995). Cloning of a human kappa opioid receptor from the brain. *Life sciences*, *56*, 201-207.
- Zhu, J., Luo, L. Y., Li, J. G., Chen, C., & Liu-Chen, L. Y. (1997). Activation of the Cloned Human Kappa Opioid Receptor by Agonists Enhances [³⁵S]GTPgammaS Binding to Membranes: Determination of Potencies and Efficacies of Ligands. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *282*, 676-684.

Chapitre III

Production du récepteur κ opioïde humain chez la bactérie

I. Contexte.

Comme cela a été discuté dans le chapitre d'introduction de cette thèse, il est essentiel de développer des méthodes permettant différents marquages isotopiques des RCPG. Ces marquages, et en particulier la perdeutériation des récepteurs, ouvrent la voie à des expériences de RMN permettant d'étudier la dynamique conformationnelle des RCPG.

Ce chapitre décrit les travaux réalisés pour exprimer le récepteur κ opioïde humain KOP chez *Escherichia coli*, l'objectif étant de bénéficier des possibilités étendues de marquage isotopique de cette bactérie. Des études précédentes sur l'expression de récepteurs opioïdes sous forme fonctionnelle chez la bactérie (185, 186) ont abouti à un niveau d'expression relativement faible. Pour le récepteur μ opioïde MOP, l'expression s'est révélée toxique pour la bactérie et une partie du récepteur est retrouvé sous forme de corps d'inclusion (185). Dans cette étude, le rendement de production de récepteur à partir de sa fraction fonctionnelle adressée à la membrane a pu être optimisé à 0.2 mg par litre de culture en milieu riche. Dans le cas de KOP, nous avons donc préféré la stratégie établie par le groupe de notre collaborateur Jean-Louis Banères qui consiste à favoriser l'expression en grande quantité sous forme de corps d'inclusion et à renaturer le récepteur *in vitro* lors de sa purification.

Nous avons bénéficié de travaux réalisés précédemment où KOP a été exprimé en cellules d'insecte SF9. Ces travaux ont abouti à la cristallisation de KOP inactivé (49) et à la détermination de la conformation de la dynorphine liée à KOP (113) (voir le chapitre II (35)). Nous avons en particulier exploité le fait que KOP peut être purifié sous forme fonctionnelle en micelles de détergent DDM (n-dodécyl β -D-maltoside) – CHS (cholestéryl hémisuccinate), l'observation que l'antagoniste JD₁Tic permet de stabiliser efficacement KOP et l'accès aux données RMN signatures de l'interaction entre la dynorphine et un récepteur KOP fonctionnel. Il a également été possible de purifier KOP à partir de membranes SF9 fournies par le groupe de Raymond Stevens (University of Southern California, Los Angeles) pour des expériences contrôles.

II. Expression en corps d'inclusion chez *E. coli*.

Plusieurs constructions ont été réalisées afin de mettre en place l'expression de KOP chez la bactérie (**figure 1a**). La séquence de KOP initiale est celle employée dans l'étude précédente de la dynorphine liée à KOP (113), qui avait été dérivée de la construction utilisée pour la

crystallisation du récepteur (49). Il s'agit de la séquence du récepteur humain délétée des 42 acides aminés N-terminaux et portant la mutation stabilisatrice I135^{3,29}L. Ces modifications n'ont pas d'effet sur la fonctionnalité de KOP pour ce qui est de sa capacité à interagir avec ses ligands (49). La délétion N-terminale permet d'éviter des glycosylations non-désirées du récepteur (dans le cas de l'expression en cellules d'insecte) (187) et facilite la cristallisation en éliminant une région désordonnée. Elle a été utilisée dans nos expériences dans le but de comparer les résultats aux contrôles réalisés avec KOP produit à partir de cellules d'insecte et dans la perspective de simplifier les spectres RMN du récepteur produit chez la bactérie. Des étiquettes HA, Flag et poly-histidine sont placées en N-terminal, ainsi qu'un site de digestion à la TEV (protéase du « tobacco etch virus »). Cette séquence est notée KOP-SF9 dans ce qui suit. Deux protéines de fusion ont été générées par remplacement des étiquettes HA et Flag par les gènes codant respectivement pour le domaine N-terminal membranaire de la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae* (résidus 1-201, fusion notée NKp-KOP) ou pour un fragment de l'intégrine 5 α (résidus 163-443 ; fusion notée IN5-KOP₁, où l'indice est utilisé pour différencier cette construction de modifications ultérieures). Ces séquences sont connues pour favoriser l'expression sous forme de corps d'inclusion chez *Escherichia coli* (188, 189). Les constructions ont été insérées dans deux vecteurs d'expression inductibles à l'IPTG : pJ411 et pET21a. Des niveaux d'expression proches ayant été observés dans les premières expériences, le plasmide pJ411 a été utilisé par la suite. Il s'agit d'un vecteur à haut nombre de copies qui permet théoriquement de favoriser l'expression protéique.

Des tests d'expression ont été réalisés en milieu riche LB (lysogeny broth) en suivant la croissance bactérienne par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) (**figure 1b**). Ils ont montré la toxicité de l'expression avec la séquence KOP-SF9. Ils ont aussi révélé que NKp-KOP et IN5-KOP₁ permettent d'atténuer la toxicité. Cette atténuation est meilleure pour IN5-KOP₁ qui a donc été préférée. Le taux d'expression a aussi été testé par analyse SDS-PAGE des lysats bactériens fractionnés par centrifugation (**figure 1c**). Cela a montré une surexpression de la protéine d'intérêt pour NKp-KOP et IN5-KOP₁. Pour KOP-SF9, la bande d'intérêt est également présente avec les deux autres constructions. Il s'agit vraisemblablement d'une superposition de la bande du récepteur avec celle d'une protéine d'*E. coli*. Cette bande étant d'intensité comparable dans les trois conditions, cela suggère que l'expression de KOP-SF9 se fait à un niveau faible en plus d'être toxique.

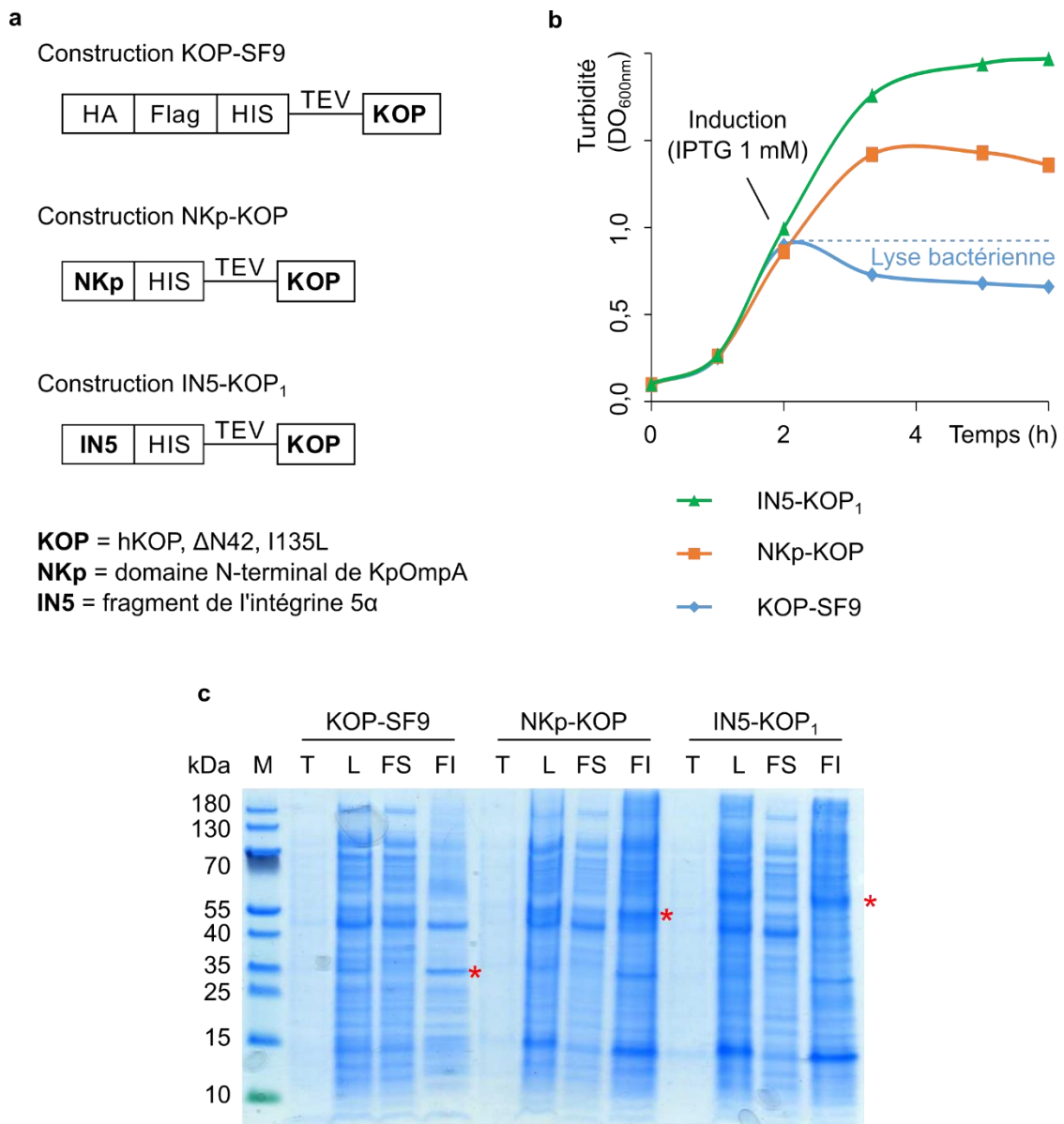


Figure 1. Surexpression de KOP chez *E. coli*. (a) Schéma des protéines de fusion testées. KOP indique la séquence du récepteur κ opioïde humain avec une délétion de 42 acides aminés en N-terminal et portant la mutation I135^{3,29}L. NKp correspond au domaine N-terminal de la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, et IN5 à un fragment de l'intégrine 5α. TEV indique le site de digestion de la protéase du « tobacco etch virus ». HIS, Flag et HA réfèrent respectivement à des étiquettes poly-histidine, Flag et HA. (b) Courbes de croissance de bactéries BL21Star en milieu riche lors de l'expression des protéines de fusion présentées en (a) à partir du plasmide pJ411. (c) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montrant la surexpression des protéines de fusion NKp-KOP et IN5-KOP₁ en milieu riche LB. Les étoiles rouges indiquent la position des bandes correspondant aux constructions d'expression de KOP. M désigne le marqueur de taille, T le milieu de culture des bactéries (problème de dépôt), L le lysat bactérien et FS et FI indiquent respectivement ses fractions soluble et insoluble.

III. Purification et renaturation *in vitro*.

III.1. Premiers essais de purification et renaturation en DDM – CHS.

A la différence de l'extraction de KOP exprimé en membranes de cellules SF9, la solubilisation du récepteur en corps d'inclusion nécessite des conditions dénaturantes (**figure 2a et 2b**). Des tests de solubilisation ont été réalisés à partir de la fraction insoluble du lysat bactérien après expression d'IN5-KOP₁. Plusieurs mélanges de détergent et d'urée ont été testés : SDS seul, urée seule à différentes concentrations, mélanges SDS – urée, SDS – DDM – CHS et SDS – DDM – CHS – urée. Après fractionnement par centrifugation, l'analyse des fractions solubles et insolubles par western-blot (anticorps dirigés contre l'étiquette histidine) a permis d'identifier le mélange SDS 0.8 % / urée 2 M comme celui donnant le meilleur résultat. Les moins bons résultats obtenus avec l'urée seule ou avec les mélanges SDS – DDM avec une plus faible concentration de SDS confirment la présence de IN5-KOP₁ sous forme de corps d'inclusion (190).

Après solubilisation, IN5-KOP₁ a été fixée sur résine TALON pour purification via son étiquette poly-histidine. La renaturation *in vitro* a aussi été réalisée sur cette résine dans le but de limiter l'agrégation du récepteur durant ce processus (**figure 2a**) (190). La renaturation du récepteur a été opérée par lavages successifs de la résine permettant un échange de détergent du mélange SDS – urée par un mélange DDM – CHS. Elle a également été faite en présence d'antagonistes afin de stabiliser une forme correctement repliée du récepteur. JD_{Tic} (K_D 10⁻¹⁰ M (191)), qui a permis la cristallisation de KOP (49), est utilisé dans les premiers lavages puis est remplacé par de la naltrexone (K_D 10⁻⁹ M (192)) qui peut être plus facilement éliminée par la suite (à l'aide d'échanges de tampon sans ligand). Enfin, il est nécessaire de former un pont disulfure de KOP reliant son hélice transmembranaire 3 à sa boucle extracellulaire 2. Du β -mercaptoéthanol a été utilisé pour éviter la formation de ponts disulfures non désirés sur le récepteur dénaturé, puis ce composé a été éliminé lors des étapes de renaturation pour permettre l'oxydation du pont disulfure. Un essai a également été réalisé en ajoutant du glutathion oxydé lors de la renaturation mais n'a pas modifié la capacité de KOP à lier la dynorphine (voir le test utilisé partie III. 2) et ce composé n'a plus été utilisé par la suite. Après élution d'IN5-KOP₁ de la résine TALON, l'échantillon est finalement dessalé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille à faible résolution. A ce stade, nous avons obtenu des rendements d'environ 4 mg de récepteur purifié par litre de culture (calculé avec la masse molaire de KOP) contre environ 0.2 mg par litre de culture pour les cellules SF9.

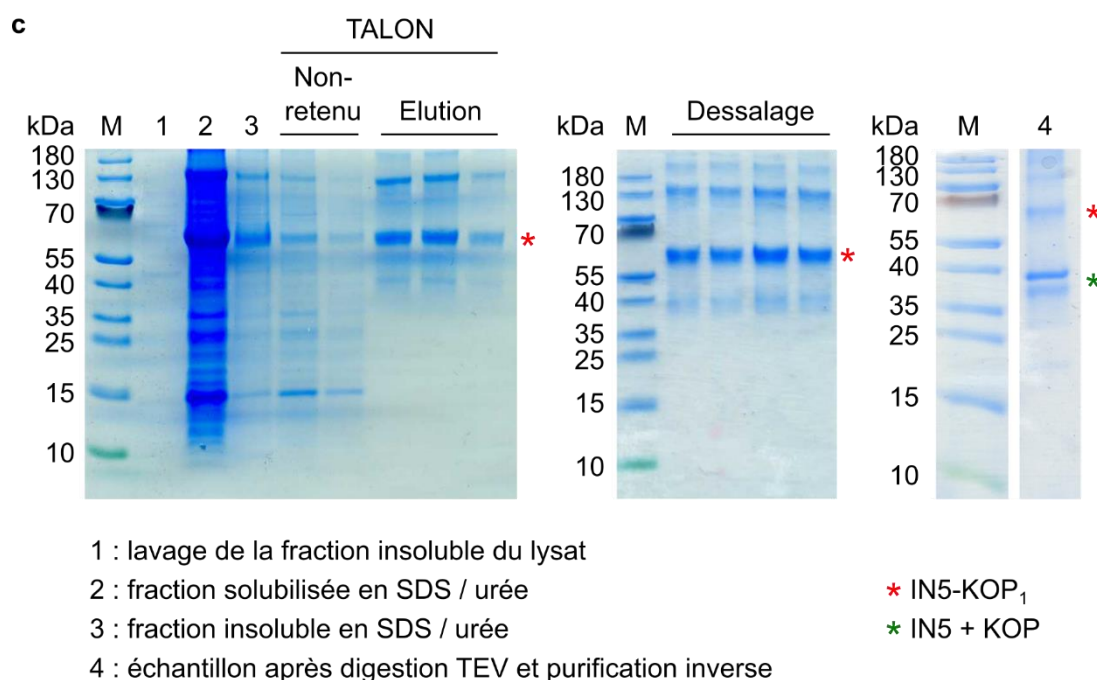
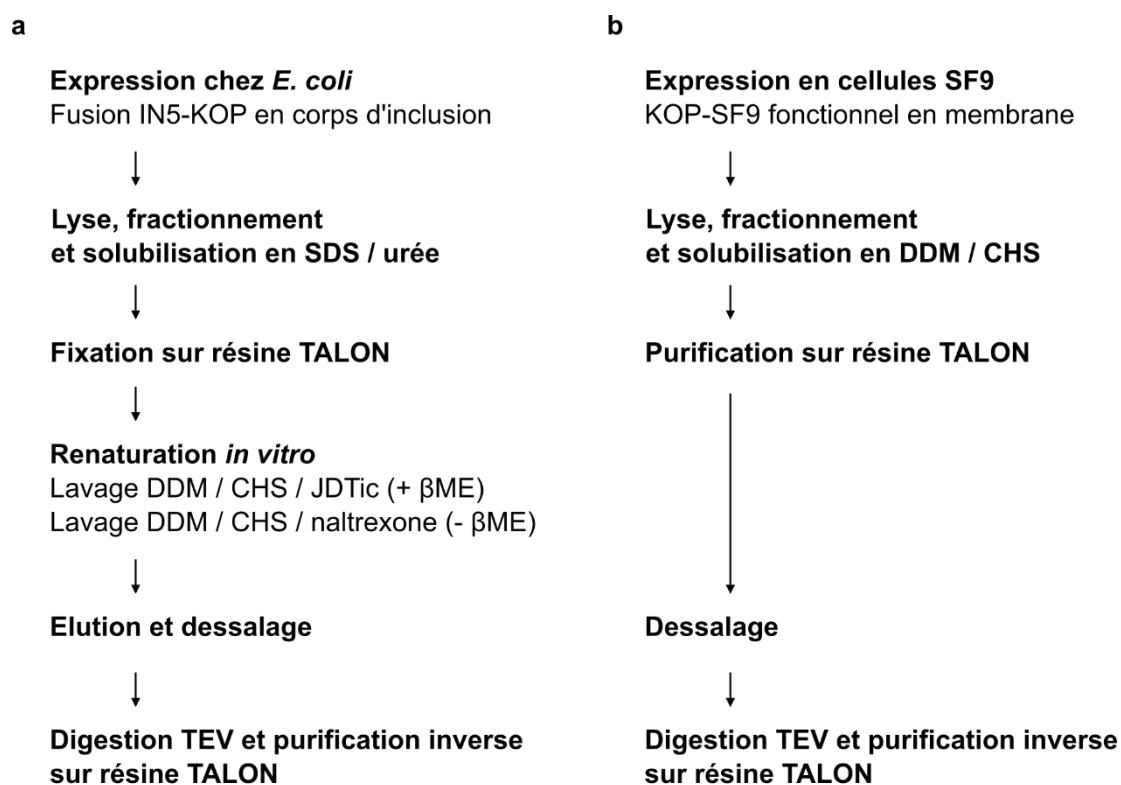


Figure 2. (a) Schéma de la stratégie initiale de production de KOP par expression en corps d'inclusion chez *E. coli* et renaturation *in vitro* lors de sa purification. (b) Schéma de la stratégie de purification de KOP en cellules SF9 utilisé dans (113) pour comparaison. (c) Suivi par gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie des premiers essais de purification. M indique le marqueur de taille. Les bandes de poids moléculaire supérieur à celui de IN5-KOP₁ peuvent être attribuées (au moins en partie) à des formes oligomériques obtenues dans les conditions de l'analyse SDS-PAGE.

Le suivi de ces étapes par SDS-PAGE (**figure 2c**) a permis de valider les différentes étapes de production d'IN5-KOP₁. La pureté de l'échantillon finalement obtenu est correcte mais sera améliorée par la suite. La présence de bandes de plus haut poids moléculaire que celle d'IN5-KOP₁ est souvent observée avec les RCPG. Ces bandes peuvent être attribuées (au moins en partie) à des formes oligomériques obtenues dans les conditions de l'analyse SDS-PAGE. Des bandes apparaissent cependant à une masse moléculaire plus faible que celle du récepteur. Elles correspondent vraisemblablement à des formes incomplètement traduites. Dans ces premiers essais de purification, le clivage d'IN5 a également été testé par digestion à la TEV ainsi que son élimination par chromatographie d'affinité inverse sur résine TALON. Le suivi de ces étapes par SDS-PAGE a confirmé le clivage mais a montré qu'IN5 et KOP n'étaient pas séparés par la purification inverse.

III.2. Test RMN d'interaction avec la dynorphine.

Lors de ces premiers essais de purification et de renaturation, la capacité de KOP renaturé *in vitro* à lier la dynorphine a été testée par RMN (**figure 3**). Ce test a d'abord été réalisé en clivant IN5 et les résultats correspondants sont présentés ici. Nous avons par la suite observé que l'absence de clivage aboutissait à un résultat identique.

Des spectres 1D ¹H et 2D ¹⁵N-¹H HSQC ont été enregistrés dans les mêmes conditions que ce qui avait été réalisé sur le récepteur purifié à partir de cellules SF9 (113). Dans ces conditions, la dynorphine est en échange rapide entre les états lié et libre. La relaxation transverse (donc la largeur de raie) et le déplacement chimique mesurés sont des moyennes entre les deux états. Ces moyennes sont pondérées par les fractions liée et libre de dynorphine. Un premier échantillon contenant KOP et la dynorphine A 1-13 permet d'acquérir des données correspondant à la dynorphine en interaction à la fois spécifique avec le récepteur et non-spécifique. L'antagoniste orthostérique JD₁Tic est ajouté dans un second échantillon. Ce ligand possède une affinité 100 fois meilleure que la dynorphine et constitue donc un puissant compétiteur lorsqu'ajouté en concentration équimolaire. Ce second échantillon est utilisé pour acquérir des données relatives à la dynorphine en interaction non-spécifique. Par différence entre les deux échantillons, on accède donc au signal de la dynorphine spécifiquement liée à KOP.

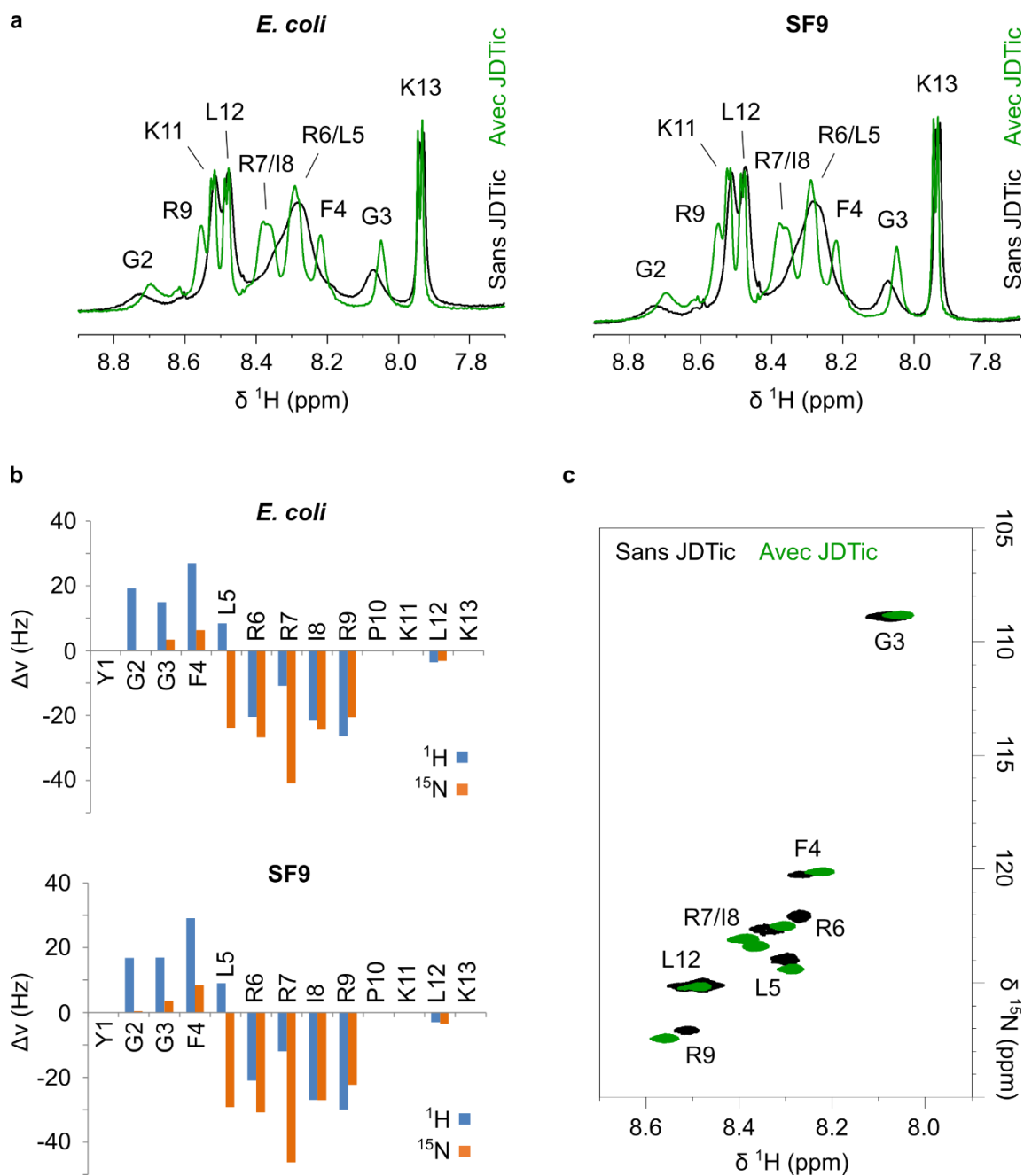


Figure 3. Test RMN d'interaction dynorphine A 1-13 / KOP. (a) Spectre 1D ^1H de la dynorphine (région des protons amides) en présence de KOP et en l'absence de JDITic (en noir) ou en présence de ce compétiteur (en vert). Les spectres à gauche sont ceux obtenus avec KOP renaturé après production chez *E. coli* et ceux de droite avec KOP purifié à partir de membranes de cellules SF9. (b) Perturbation de déplacement chimique ($\Delta\nu$ en Hz) des résidus marqués ^{15}N de la dynorphine en présence de KOP. Cette perturbation est calculée pour les dimensions ^1H (en bleu) et ^{15}N (en orange) par différence entre les échantillons sans et avec compétiteur. Pour les résidus non-marqués, la perturbation n'a pas été mesurée et apparaît comme une valeur nulle sur les graphes. L'histogramme du haut correspond à l'expérience avec KOP renaturé après production chez *E. coli* et celui du bas à l'expérience à partir de cellules SF9. (c) Spectres 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC en l'absence de JDITic (en noir) ou en présence de ce compétiteur (en vert) utilisés pour déterminer les perturbations de déplacement chimique de la dynorphine présentées en (b) avec KOP produit chez *E. coli*. Dans l'ensemble de ces expériences, le rapport molaire KOP / dynorphine est de 0.0025 et les spectres ont été enregistrés à 280 K et 600 MHz.

Le spectre 1D ^1H (**figure 3a**) de l'échantillon sans compétiteur présente une largeur de raie importante, en particulier pour les protons amides des résidus F4 à I8. Ces raies spectrales sont clairement affinées lorsqu'on ajoute le compétiteur JD_{Tic}. Cela est cohérent avec la rigidification de la dynorphine dans sa partie centrale lors de son interaction avec KOP, comme précédemment décrit (113). Ces résultats sont équivalents à ceux obtenus lors de l'expérience effectuée avec KOP purifié à partir de cellules SF9. Pour les résidus marqués au ^{15}N , les spectres 2D ^{15}N - ^1H HSQC ont permis de calculer la perturbation de déplacement chimique que subit la dynorphine dans les dimensions ^1H et ^{15}N (**figure 3b et 3c**). Cette perturbation traduit directement l'environnement chimique de la dynorphine liée à KOP. La comparaison avec le résultat obtenu avec KOP purifié à partir de cellules SF9 révèle des signatures quasiment identiques.

Ces données indiquent que KOP renaturé *in vitro* après expression chez la bactérie est compétent pour la liaison à la dynorphine. De plus, les effets RMN observés dépendent de la fraction liée de dynorphine et ont été obtenus avec un rapport molaire KOP / dynorphine identique à celui utilisé pour l'expérience à partir de cellules SF9 (*i.e.* 0.0025). Cela indique que la fraction de récepteur fonctionnel est comparable dans les deux méthodes. Ce test RMN a été utilisé par la suite pour suivre la fonctionnalité du récepteur à l'issue des différentes purifications. Pour la plupart des expériences ultérieures, le test a été réalisé avec de la dynorphine non-marquée et seul les spectres 1D ^1H ont été enregistrés. Ce test s'est révélé robuste et des résultats négatifs ont par exemple été systématiquement corrélés avec la perte d'une partie du récepteur par agrégation puis précipitation, dans certaines expériences qui ont abouti à une mauvaise renaturation de KOP.

III.3. Optimisations préliminaires.

Nous avons ensuite testé l'expression en milieu minimum M9. Ce milieu permet en effet de réaliser les différents marquages isotopiques nécessaires pour étudier la dynamique de KOP. Nous avons aussi testé l'utilisation de la souche bactérienne B834 (auxotrophe pour la synthèse de méthionine) afin de pouvoir ultérieurement maximiser l'incorporation de méthionines marquées par ajout de cet acide aminé dans le milieu de culture. Le taux d'expression de ces différents tests s'est révélé équivalent à celui des premières expériences effectuées en milieu riche. Par la suite, l'ensemble des purifications a alors été réalisé à partir d'une expression en milieu minimum M9. A ce stade nous avons également modifié les étapes de lyse (presse de

french au lieu de sonication en présence de triton) et de fractionnement (ultracentrifugation à 150.000 g au lieu d'une centrifugation à 15.000 g) afin de maximiser la fraction insoluble récupérée des bactéries. Nous avons aussi utilisé une nouvelle construction IN5-KOP conçue afin d'améliorer la purification du récepteur (**figure 4a**).

Cette construction (notée IN5-KOP₂) est un gène synthétique où les codons sont optimisés pour utiliser ceux qui sont le plus fréquemment utilisés par *Escherichia coli* pour traduire un acide aminé donné. L'objectif était d'améliorer le taux de traduction, mais nous avons obtenu des niveaux d'expression équivalents, cette étape n'étant vraisemblablement pas limitante. L'étiquette poly-histidine a aussi été placée en C-terminal au lieu d'être positionnée entre IN5 et KOP. Cela a permis d'éliminer les formes incomplètement traduites co-purifiées dans les premières expériences (bandes de poids moléculaires plus faibles) (**figure 4b**). L'objectif était aussi d'améliorer l'accessibilité de cette étiquette pour augmenter la rétention sur résine TALON mais elle s'est finalement révélée équivalente. Dans cette nouvelle construction, un site de digestion à la protéase 3C (dérivée du rhinovirus humain B14, aussi appelée PreScission) encadré de séquences répétées glycine-sérine a été introduit entre les séquences d'IN5 et KOP. Nous avons choisi cette protéase en raison de sa bonne résistance aux détergents (193), en particulier au DDM. Enfin des sites de restriction ont été introduits afin de faciliter la manipulation ultérieure de cette séquence.

La mise en place de ces diverses optimisations a finalement permis la production de la nouvelle protéine de fusion IN5-KOP₂ par expression en milieu minimum. Sa pureté est améliorée rapport aux premiers essais (**figure 4b**) et la capacité du récepteur à lier son ligand a été validée par le test RMN décrit dans la partie précédente (**figure 4c**). Le rendement obtenu est équivalent aux premières expériences, à savoir environ 4 mg par litre de culture (calculé avec la masse molaire de KOP).

III.4. Essais avec des micelles LMNG – CHS.

Nous avons voulu également tester la possibilité d'obtenir KOP en micelles de LMNG (lauryl maltose néopentyl glycol) additionnées de CHS. En effet, le LMNG est connu pour aboutir à une meilleure stabilité des RCPG que le DDM (115) et a par exemple été utilisé pour l'étude du récepteur A_{2A}AR par RMN (95). Nous avons d'abord testé l'échange progressif de DDM – CHS par du LMNG – CHS lors d'une purification de KOP à partir de membranes de cellules SF9. La séquence exprimée correspond à la construction KOP-SF9 présentée **figure 1a**. Le

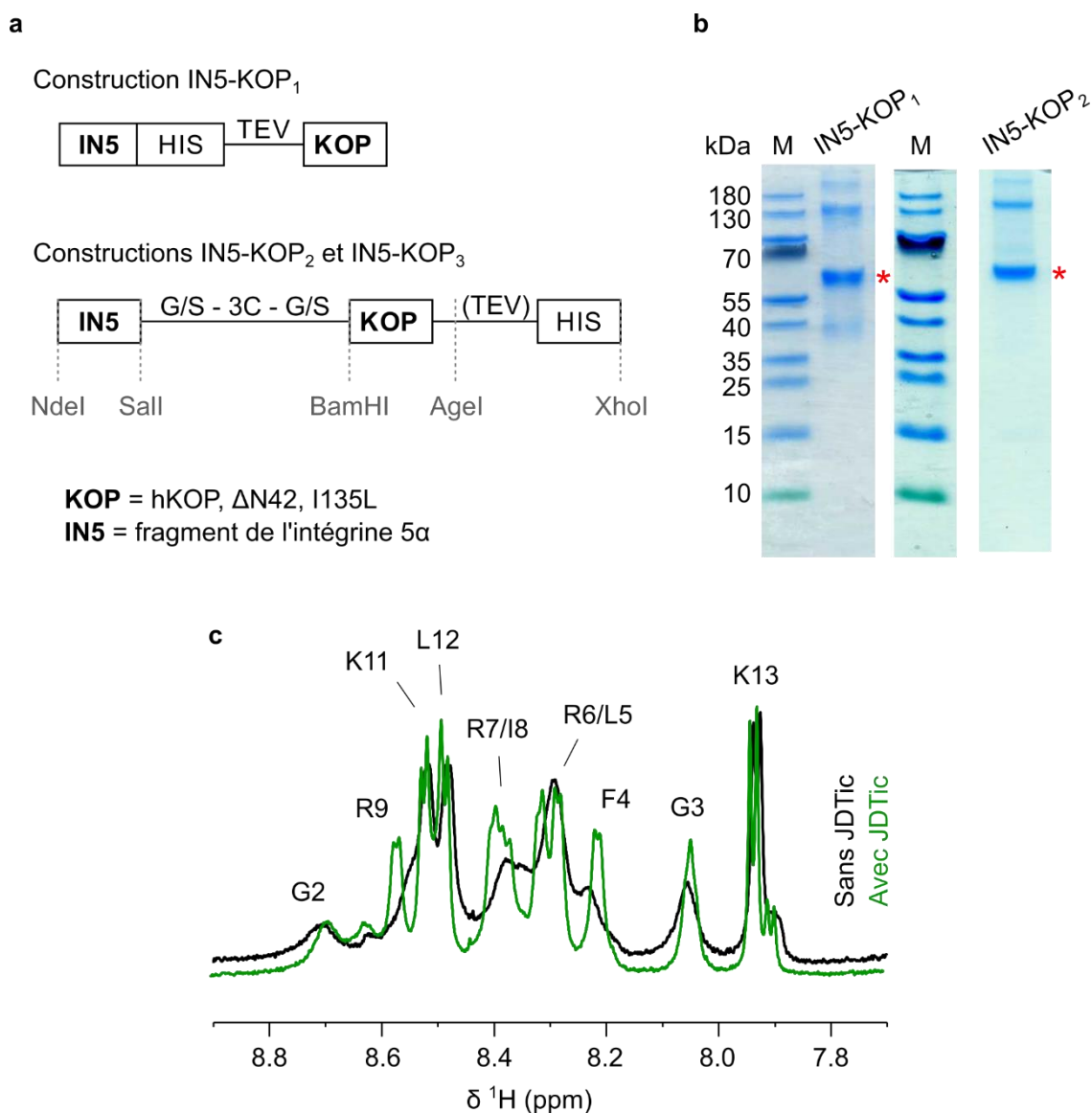


Figure 4. Optimisation de la production d'IN5-KOP chez *E. coli*. (a) Schéma des modifications de la construction IN5-KOP. KOP indique la séquence du récepteur κ opioïde humain avec une délétion de 42 résidus d'acide aminé en N-terminal et portant la mutation I135^{3,29}L et IN5 celle d'un fragment de l'intégrine 5α. TEV désigne le site de digestion de la protéase du « tobacco etch virus ». Comme indiqué dans la partie III. 5., le site TEV a été supprimé lors de la mise en place de l'élimination d'IN5 (séquence IN5-KOP₃). HIS et Flag réfèrent respectivement à des étiquettes poly-histidine, et Flag. G/S indique une séquence répétée glycine-sérine, et 3C le site de digestion à la protéase 3C dérivée du rhinovirus humain B14. Les sites de restriction introduits sur la nouvelle construction sont indiqués en gris. (b) Analyse par SDS-PAGE de la protéine de fusion IN5-KOP (bandes indiquées par des étoiles rouges) en fin de purification avec les deux constructions présentées en (a). Les bandes de poids moléculaire supérieur à celui de IN5-KOP_{1/2} peuvent être attribuées (au moins en partie) à des formes oligomériques obtenues dans les conditions de l'analyse SDS-PAGE. (c) Test RMN (spectres 1D ¹H) de la compétence d'IN5-KOP₂ à lier la dynorphine. Cette expérience a été réalisée comme expliqué dans la partie III. 2. Dans cette expérience, le rapport molaire KOP / dynorphine est de 0.0025 et les spectres ont été enregistrés à 280 K et 600 MHz.

protocole précédemment décrit (113) et schématisé dans la **figure 2b** a été modifié pour inclure une étape de lavage avec des concentrations décroissantes de DDM – CHS en présence de LMNG – CHS, alors que le récepteur est fixé sur résine TALON pour purification. Le récepteur obtenu est compétent pour la liaison de la dynorphine comme observé avec le test RMN (**figure 5a**). Cela a aussi été confirmé par une expérience de liaison d'un ligand radioactif (voir partie V.). Ces résultats confirment la stabilité de KOP en micelles LMNG – CHS sous forme fonctionnelle et la faisabilité d'échanger le détergent avec cette stratégie.

Nous avons alors réalisé plusieurs expériences incluant cette étape au protocole de production de la protéine de fusion IN5-KOP₂ chez *E. coli*. Différentes concentrations de LMNG – CHS ont en particulier été testées. Le meilleur résultat obtenu est présenté dans la **figure 5b**. On observe les élargissements de signaux caractéristiques de la liaison de la dynorphine. Ces élargissements sont cependant moins prononcés et il a été nécessaire de doubler le rapport molaire KOP / dynorphine par rapport à l'expérience contrôle à partir de cellules SF9 (*i.e.* 0.01 au lieu de 0.005). L'effet RMN observé étant dépendant de la fraction liée de dynorphine, ces résultats indiquent qu'une part significative du récepteur n'est pas compétente pour la liaison du ligand. Ce point corrèle avec les rendements de production obtenus qui sont diminués d'environ un facteur deux par rapport aux expériences en DDM – CHS à partir d'*E. coli*.

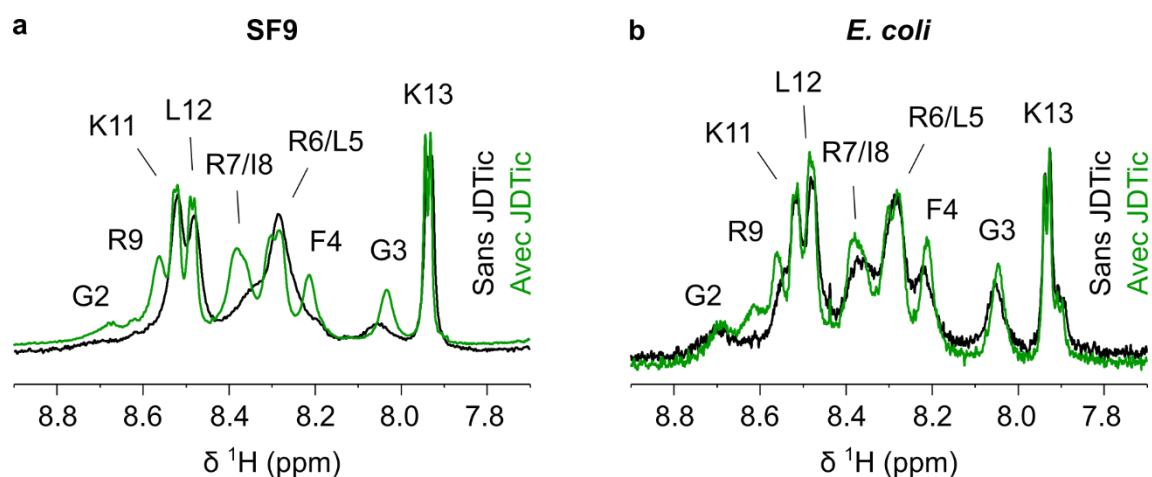


Figure 5. (a) Test RMN (spectres 1D ¹H) de la compétence KOP à lier la dynorphine après production à partir de cellules SF9 avec échange en micelles de LMNG - CHS. Dans cette expérience, le rapport molaire KOP / dynorphine est de 0.005. (b) Test RMN (spectres 1D ¹H) de la compétence d'IN5-KOP₂ à lier la dynorphine après production chez *E. coli* avec échange en micelles de LMNG - CHS. Dans cette expérience, le rapport molaire KOP / dynorphine est de 0.01. Les expériences présentées en (a) et (b) ont été réalisées comme expliqué dans la partie III. 2. et les spectres ont été enregistrés à 280 K et 600 MHz.

Nous avons aussi vu dans la partie III. 1. qu'une chromatographie d'affinité inverse ne permettait pas de séparer IN5 et KOP après clivage de la protéine de fusion. Il est donc vraisemblable qu'une interaction entre IN5 et KOP nuise à la stabilité de la forme fonctionnelle de KOP lors de l'échange de DDM vers LMNG. En parallèle, nous avons mis en place l'élimination d'IN5. La stratégie de séparation d'IN5 et KOP présentée dans la partie suivante (III. 5.) permettra de tester à nouveau l'échange de DDM par LMNG établi avec le récepteur exprimé en cellules SF9 mais cela n'a pas été réalisé à l'heure actuelle.

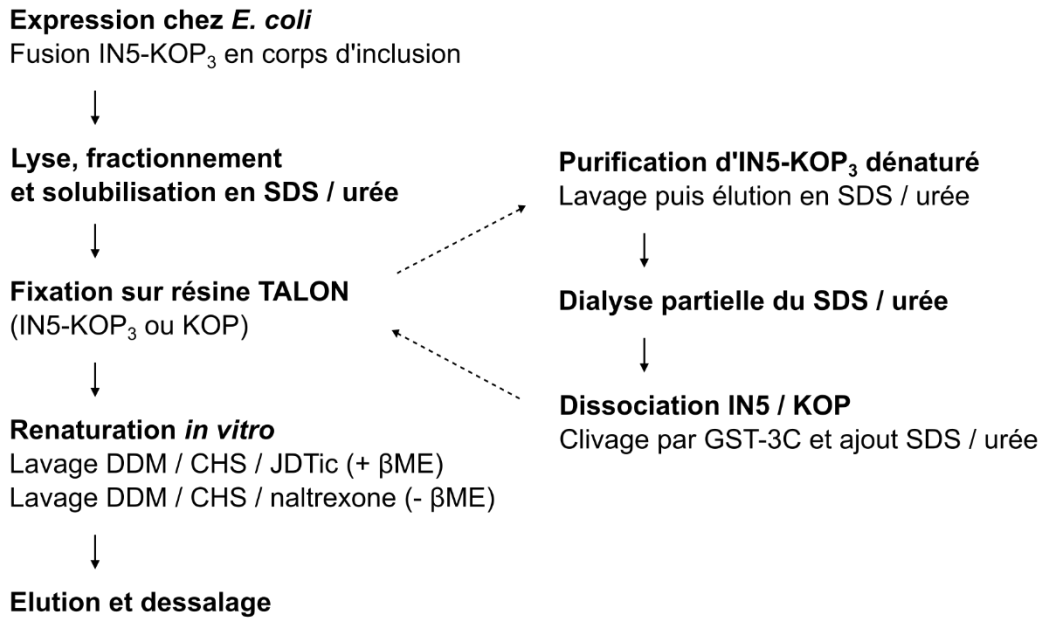
III.5. Elimination d'IN5 et finalisation du protocole en DDM – CHS.

Les expériences préliminaires ont montré que, suite au clivage de la protéine de fusion, IN5 et KOP renaturé n'étaient pas séparés lors d'une chromatographie d'affinité inverse sur résine TALON. Ce point a également été observé avec la construction IN5-KOP₂ et il n'a pas non plus été possible de séparer IN5 et KOP par chromatographie échangeuse d'ion et par chromatographie d'exclusion de taille. Ces résultats indiquent une interaction entre IN5 et KOP renaturé en présence de DDM – CHS.

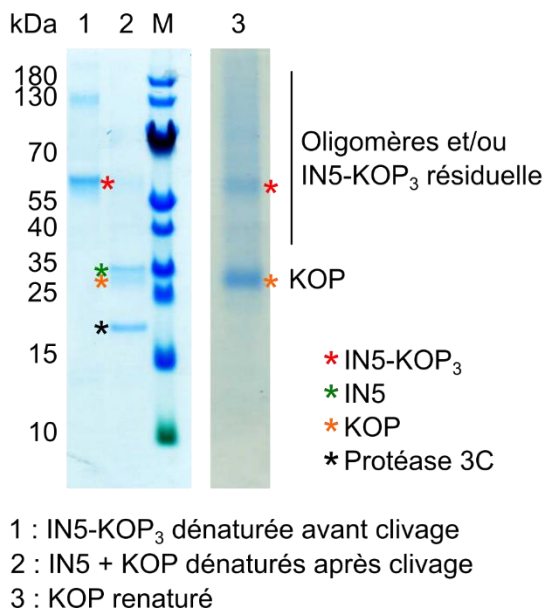
Nous avons donc modifié notre stratégie initiale avec pour objectif de cliver la protéine de fusion IN5-KOP ainsi que de séparer les produits de digestion en conditions dénaturantes (**figure 6a**), comme précédemment décrit (111, 190). IN5-KOP a d'abord été purifiée sur résine TALON dans les conditions utilisées pour la solubilisation des corps d'inclusion. Il est ensuite nécessaire d'éliminer par dialyse l'urée et suffisamment de SDS pour permettre la digestion par la protéase 3C. Il faut cependant conserver une quantité minimale de SDS afin de prévenir la précipitation de KOP dénaturé. Le temps de dialyse respectant ces conditions a été recherché par la réalisation de tests de digestion du récepteur et par l'enregistrement de spectres d'absorbance dans l'ultra-violet. Cette digestion nécessite aussi l'utilisation d'une quantité de protéase importante (de 1 à 5 équivalents de la concentration du récepteur). Or nous avons observé dans des expériences intermédiaires que la protéase 3C pouvait cliver le site TEV à haute concentration. Nous avons donc éliminé ce site d'IN5-KOP₂ pour obtenir la construction notée IN5-KOP₃ qui a été utilisée pour la mise en place de l'élimination d'IN5.

Après digestion, du SDS et de l'urée ont alors été ajoutés pour revenir aux conditions dénaturantes initiales. Suite au clivage, seul KOP possède une étiquette poly-histidine. IN5 et la protéase 3C (qui en fusion avec la GST) ont donc été éliminées par rétention de KOP dénaturé sur résine TALON. La renaturation *in vitro* ainsi que la suite de la purification ont alors été

a



b



c

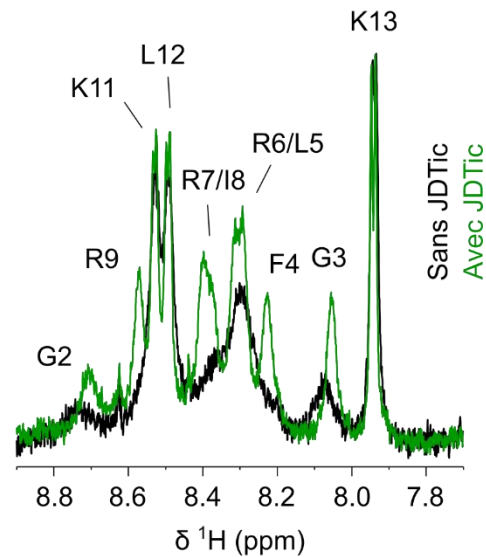


Figure 6. (a) Schéma de la stratégie finale de production de KOP par expression hétérologue chez *E. coli* permettant l'élimination d'IN5. La partie de clivage de IN5 (flèche en pointillés) peut ne pas être réalisée si désiré. **(b)** Gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie montrant le clivage et l'élimination d'IN5 avec la stratégie présentée en (a). Les bandes d'intérêt sont notés par des étoiles colorées. **(c)** Test RMN (spectres 1D ¹H) montrant la capacité à lier la dynorphine de KOP renaturé après élimination d'IN5. Cette expérience a été réalisée comme expliqué dans la partie III. 2, le rapport molaire KOP / dynorphine est de 0.0025 et les spectres ont été enregistrés à 280 K et 700 MHz.

réalisées comme dans la stratégie initiale. L'analyse par SDS-PAGE a montré que cette stratégie permet de cliver et d'éliminer totalement IN5 (**figure 6b**). Le rendement de production est alors d'environ 2 mg par litre de culture. Le test RMN de liaison de la dynorphine a également montré que cette stratégie produit KOP compétent pour lier son ligand endogène (**figure 6c**). Les expériences de mise en place de cette stratégie ont ainsi abouti à un protocole de production de KOP en micelles de DDM – CHS après expression chez *E. coli*.

La question de la fraction exacte de récepteur fonctionnel n'est cependant pas résolue à l'heure actuelle. En effet, le test RMN de liaison de la dynorphine ne permet pas une quantification précise du nombre de sites de liaison. Une des perspectives immédiates de ce travail est donc d'ajouter en fin de purification une étape de chromatographie d'affinité pour un ligand orthostérique de KOP afin de retenir uniquement le récepteur fonctionnel.

IV. Essais de cristallisation de KOP et GHSR produits chez *E. coli*.

Lors de cette thèse, j'ai pu effectuer un séjour de deux mois dans le laboratoire de Vadim Cherezov à Los Angeles. Cela a permis de tester la cristallisation de deux RCPG produit chez la bactérie : KOP dont la production est discutée dans ce chapitre ; et le récepteur à la ghréline GHSR qui est produit chez *E. coli* par l'équipe de Jean-Louis Banères et qui a été utilisé pour l'étude décrite dans le chapitre IV. Les expériences ont été réalisées avec l'aide d'Anna Shiriaeva, Jeffrey Velasquez et Andrii Ishchenko que je remercie.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la structure de KOP a été déterminée après cristallisation dans son état inactivé (49). Nous avons d'abord réalisé une expérience de référence reproduisant l'obtention de ces cristaux. KOP a pour cela été purifié à partir de cellules SF9, comme précédemment décrit (49) (stratégie schématisée dans la **figure 2b**). Un point important est que les étapes de purification réalisées après solubilisation sont faites en présence de l'antagoniste de haute affinité JD1c. Par rapport au gène de KOP utilisé plus haut dans ce chapitre, la construction employée présente une délétion supplémentaire des 20 acides aminés C-terminaux (qui constituent une région désordonnée), et une version modifiée d'un fragment du lysozyme du phage T4 (résidus 2 à 161 (194), noté T4L) est insérée dans la boucle intracellulaire 3 (en position 262) afin de permettre des contacts inter-récepteurs cristallins supplémentaires. Le récepteur purifié en micelles DDM – CHS et concentré à 30 à 50 mg/mL (500 à 900 μ M) a été analysé par chromatographie d'exclusion de taille (**figure 7c**, courbe bleu). Cela a montré que le récepteur était quasi-exclusivement présent sous forme de

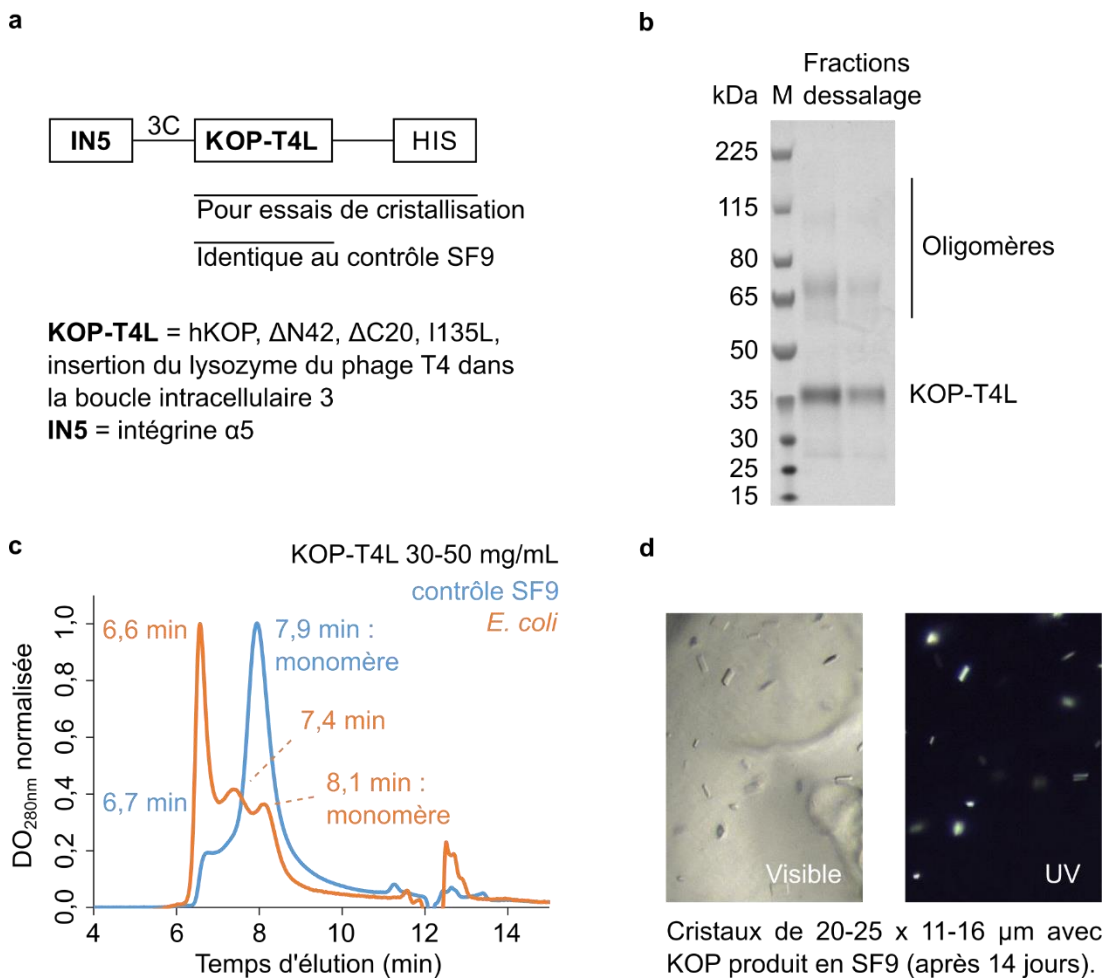


Figure 7. Essais de cristallisation comparés de KOP produit chez *E. coli* et en cellules SF9. (a) Schéma de la protéine de fusion utilisée pour les essais de cristallisation de KOP produit chez la bactérie. La séquence du récepteur utilisée pour l'expression bactérienne présentée plus haut dans ce chapitre (récepteur humain avec délétion de 42 résidus d'acide aminé en N-terminal et portant la mutation I135^{3,29}L) a été délétée de 20 résidus d'acide aminé en C-terminal et le fragment du lysozyme du phage T4 (T4L) a été inséré dans la troisième boucle intracellulaire. Après digestion par la protéase 3C (site de clivage noté 3C) et élimination du fragment de l'intégrine 5 α (notée IN5), le récepteur produit (noté KOP-T4L) a la même séquence que dans l'expérience contrôle réalisée avec une production en cellules SF9 à partir de (49), à l'exception d'une étiquette poly-histidine (notée HIS) en C-terminal. (b) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de KOP-T4L produit chez la bactérie et utilisé pour les essais de cristallisation. (c) Chromatogrammes d'exclusion de taille de KOP-T4L produit chez la bactérie et en cellules SF9. Les récepteurs sont concentrés en micelles DDM - CHS pour essais de cristallisation en phase cubique lipidique. (d) Imagerie des cristaux obtenus à partir du récepteur contrôle produit en cellules d'insecte (citrate de sodium 100 mM pH 5.5, nitrate de potassium 400 mM, PEG400 30 %v/v). Aucun cristal n'a été obtenu avec KOP produit chez la bactérie.

monomère. Des essais de cristallisation en phase cubique lipidique (LCP) ont finalement permis de reproduire les cristaux précédemment obtenus (**figure 7d**).

Nous avons alors testé KOP produit chez *E. coli* en DDM – CHS avec la stratégie finale permettant l'élimination d'IN5. Les étapes de purification après renaturation ont ici été réalisées en présence de JD_{Tic}. La construction IN5-KOP₃ a aussi été modifiée pour inclure l'insertion du lysozyme du phage T4 modifié et la délétion C-terminale. Après clivage d'IN5, la protéine notée KOP-T4L correspond à celle de l'expérience de référence en cellules SF9 plus une étiquette poly-histidine en C-terminal (**figure 7a**). L'analyse par gel SDS-PAGE a montré un bon niveau de pureté de la protéine KOP-T4L produite (**figure 7b**). Après concentration à 30 à 50 mg/mL (500 à 900 μM), l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille (**figure 7c**, courbe orange) a par contre montré que le pic correspondant au monomère (à 8.1 minutes de temps de rétention) était minoritaire devant des pics correspondant à des oligomères de degrés supérieurs et potentiellement à des agrégats (7.4 et 6.6 minutes). Le test de RMN de liaison de la dynorphine n'a pas pu être réalisé ici.

Finalement, nous n'avons pas obtenu de cristaux avec le récepteur d'*E. coli* dans les différentes conditions criblées après reconstitution en LCP. Des résultats équivalents ont été obtenus en ne clivant pas IN5 sur cette protéine IN5-KOP-T4L ainsi qu'avec la protéine IN5-KOP₃ décrite dans la partie précédente. Ces résultats indiquent que le récepteur renaturé a une propension à former des oligomères et des agrégats. Ceci peut être dû à une fraction incorrectement repliée du récepteur et constitue un argument supplémentaire en faveur de l'ajout d'une étape de chromatographie d'affinité pour un ligand orthostérique en fin de purification. Ces résultats indiquent également qu'il faudrait ajouter une étape de chromatographie d'exclusion de taille préparative pour purifier le monomère.

La cristallisation en LCP a aussi été essayée avec le récepteur à la ghréline GHSR (**figure 8**). Pour ce dernier, la structure n'est actuellement pas connue (15) et aucune condition permettant la cristallisation n'a été décrite à notre connaissance. L'équipe de Jean-Louis Banères a produit GHSR (36) en DDM – CHS à partir d'*E. coli* avec la stratégie décrite dans ce chapitre. Le récepteur utilisé a une délétion des 30 acides aminés N-terminaux, une insertion du lysozyme du phage T4 (T4L) dans la boucle intracellulaire 3 et la mutation A204E qui supprime l'activité constitutive (195). L'objectif de cette mutation est de limiter la dynamique conformationnelle du récepteur. Le récepteur purifié a également été mis en présence de JMV5327, un antagoniste de forte affinité utilisé dans les expériences du chapitre IV.

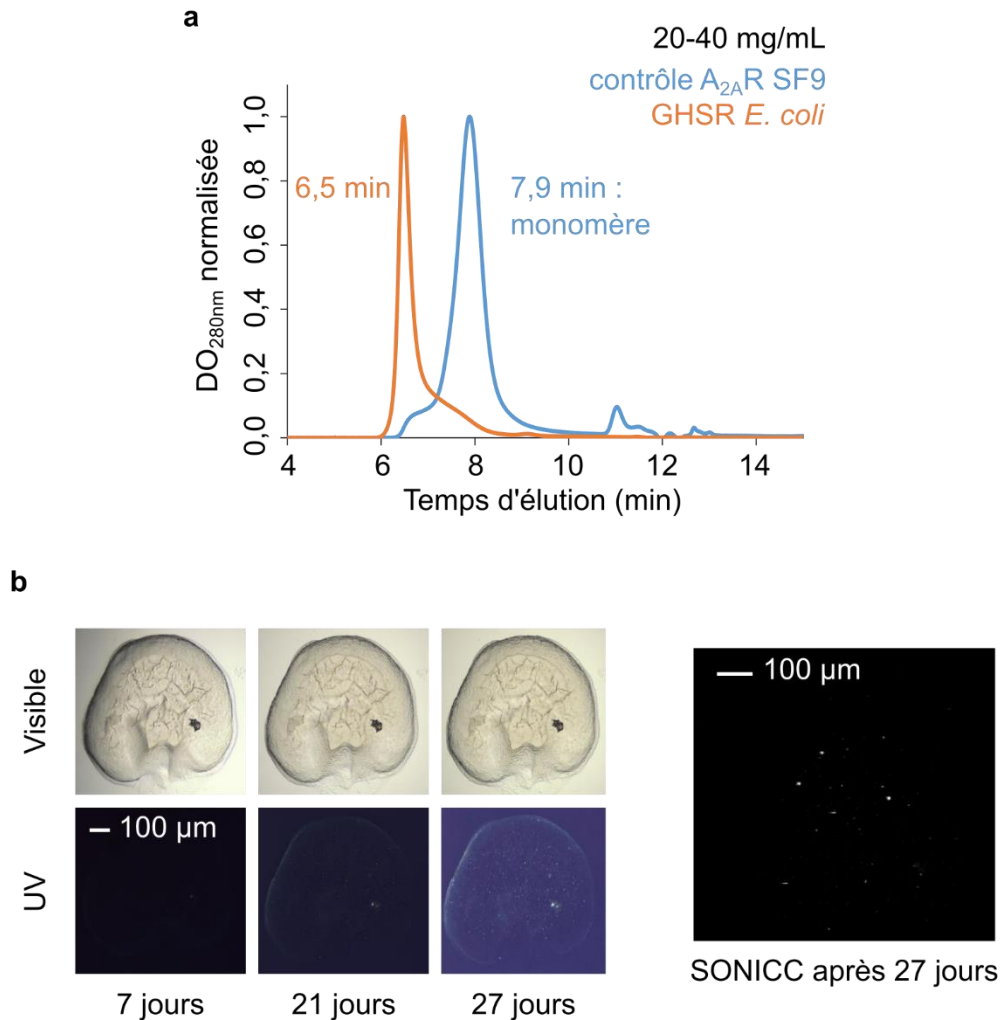


Figure 8. Essais de cristallisation de GHSR produit chez *E. coli* par l'équipe de Jean-Louis Banères. (a) Chromatogramme d'exclusion de taille de GHSR comparé à un récepteur contrôle ($A_{2A}R$ produit en cellules d'insecte SF9). Le récepteur est concentré en micelles DDM - CHS pour essais de cristallisation en phase cubique lipidique. (b) Imagerie des microcristaux de GHSR suspectés (MES 100 mM pH 6.7, thiocyanate de potassium 400 mM, PEG400 30 %v/v). L'imagerie par fluorescence dans l'ultra-violet montre l'apparition de signaux provenant de particules de $\sim 1 \mu$ m à 21 jours. A 27 jours, l'imagerie SONICC (« second order non-linear imaging of chiral crystals ») confirme la présence de cristaux de molécules chirales.

Après concentration à 20-40 mg/mL (350 à 700 μ M), l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille comparée à un échantillon contrôle de A_{2A}AR (**figure 8a**) a montré ici aussi un récepteur majoritairement non-monomérique. Un échantillon de GHSR a été marqué avec une sonde fluorescente, il a été reconstitué en LCP et des expériences de récupération de fluorescence après photo-blanchissement ont été réalisées (LCP-FRAP). Elles ont montré qu'environ 10% du récepteur était capable de diffuser dans les LCP et était donc disponible pour la cristallisation. Il faut souligner que l'échantillon de récepteur utilisé a dû être congelé pour le transport et que cela a pu causer l'agrégation de GHSR.

Un échantillon de récepteur à 20-40 mg/mL a été reconstitué en LCP sans marquage fluorescent et de nombreuses conditions de cristallisation ont été criblées. Pour une condition (**figure 8b**), des particules qui pourraient correspondre à des microcristaux de GHSR ont été observées. Ces particules ne sont pas visibles en imagerie visible mais un signal apparaît en imagerie par fluorescence dans l'ultra-violet au bout de 27 jours. De façon importante, ces particules donnent un signal en imagerie SONICC (« second order nonlinear imaging of chiral crystals ») (196) qui révèle des cristaux de molécules chirales comme les protéines. Ces résultats préliminaires sont encourageants pour de futures études de GHSR par cristallographie.

V. Mise en place d'un test de liaison d'un ligand radioactif en micelles de détergent.

En parallèle des expériences de production de KOP, nous avons mis en place une expérience de liaison de ligand en micelles de détergent alternative au test RMN discuté plus haut. Il s'agit d'un suivi de liaison de ³H-diprénorphine par « scintillation proximity assay » (SPA) (197).

La liaison de ligands radioactifs est couramment utilisée pour les RCPG en membrane (198). La réalisation de compétitions par des ligands non-marqués permet de déterminer l'affinité de ces derniers. Dans ces expériences, le ligand radioactif libre est généralement séparé de celui lié au récepteur par filtration des membranes afin de quantifier le ligand lié par scintillation. Pour un récepteur solubilisé en micelles de détergent, et un ligand de basse affinité (donc un complexe ligand – récepteur de durée de vie courte par rapport au temps de la filtration), la filtration est une technique peu efficace. Avec KOP en micelles de détergent, nous avons donc utilisé des billes SPA contenant un scintillant et permettant la fixation du récepteur en surface via son étiquette poly-histidine. Le principe est que le ligand radioactif lié est suffisamment proche de la bille pour détecter sa radioactivité par scintillation, à l'inverse du ligand libre. La

fraction de ligand liée au récepteur est déterminée à l'équilibre et est donc valable quelle que soit l'affinité du ligand.

Des essais préliminaires ont permis de définir les conditions expérimentales à utiliser comme la quantité de récepteur ou de billes SPA. Ces essais ont consisté à optimiser le signal de scintillation correspondant à la liaison spécifique, obtenu par différence entre une mesure en l'absence de compétiteur et une autre en présence d'un large excès de ^1H -diprénorphine. Ils ont été réalisés d'abord directement sur KOP en membranes de cellules SF9 puis sur le récepteur purifié en micelles de DDM – CHS.

Des expériences de compétition ont alors pu être réalisées avec le récepteur en micelles de DDM – CHS (**figure 9**) et ont permis la détermination de l'affinité de la diprénorphine et de la dynorphine pour le récepteur dans ces micelles. Pour ce récepteur issu de cellules d'insecte, ces expériences ont également permis de valider la fonctionnalité de KOP après passage en micelles de LMNG – CHS tel que discuté dans la partie III. 4. En revanche, elles n'ont pas encore pu être testées sur KOP produit chez la bactérie.

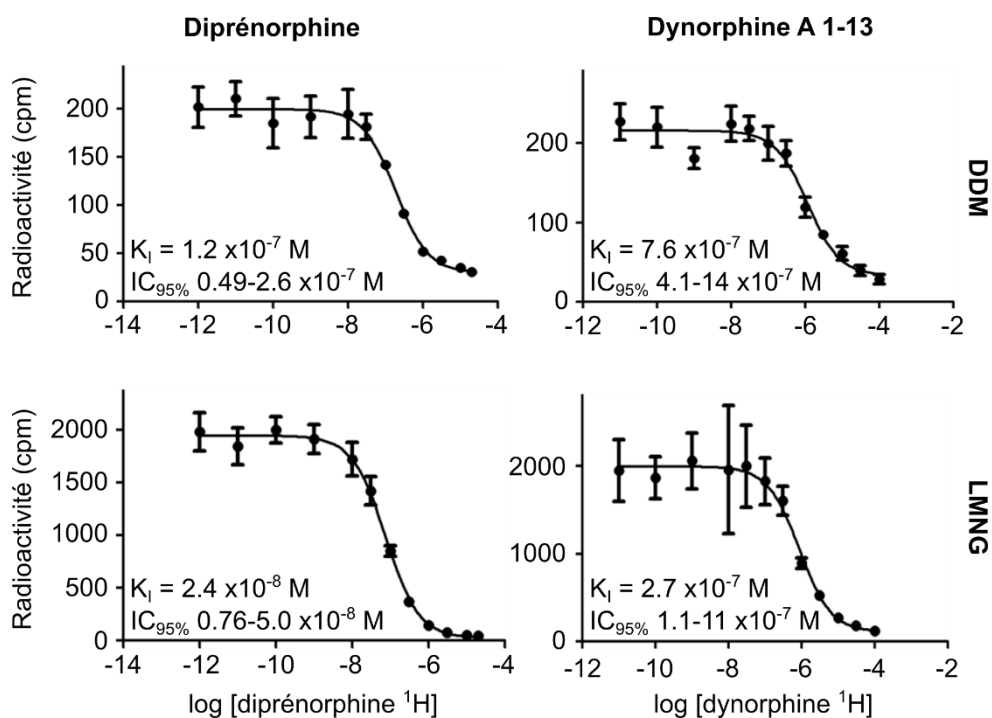


Figure 9. Compétitions de la liaison de ^3H -diprénorphine sur KOP en micelles de détergent suivi par « scintillation proximity assay ». Ces expériences permettent de déterminer l'affinité des compétiteurs (K_i , pour lequel l'intervalle de confiance à 95% est indiqué) que sont la diprénorphine et la dynorphine non-marquées. Elles ont été réalisées avec KOP en micelles DDM – CHS ou LMNG – CHS.

Il est intéressant d'examiner les valeurs d'affinité obtenues mais il convient de relativiser la précision des mesures et la comparaison d'expériences indépendantes réalisées dans des conditions et/ou avec des méthodes différentes. Dans nos expériences, l'affinité de la dynorphine (K_I 760 nM) en DDM – CHS est légèrement moins bonne qu'en LMNG – CHS (K_I 270 nM) où elle est comparable à celle précédemment mesurée en membrane de cellules SF9 avec une construction identique de KOP (K_I 200 nM, expérience par filtration) (113). Nous avons également observé une amélioration d'affinité de la diprénorphine entre les micelles de DDM – CHS (K_I 120 nM) et de LMNG – CHS (K_I 24 nM), ce qui va dans le sens d'une meilleure stabilité de KOP en LMNG – CHS. On peut ici noter, que l'affinité de la dynorphine et de la diprénorphine sont plutôt de l'ordre du nano-molaire en cellules de mammifère (1, 35) où la concentration de récepteur par rapport à celle de ses partenaires de signalisation et la composition membranaire diffèrent des cellules d'insecte.

VI. Conclusions.

L'ensemble des expériences réalisées ont permis d'aboutir à un protocole de production de KOP en DDM – CHS par expression chez *E. coli*. Le protocole final utilisant le plasmide pJ411-IN5-KOP₃ et permettant l'élimination d'IN5 est détaillé en *annexe* de ce manuscrit. Si le test RMN de liaison de la dynorphine indique une fraction significative de récepteur compétent pour lier son ligand, il reste cependant un point à finaliser avant publication de ces résultats : purifier la fraction correctement renaturée et monomérique du récepteur et déterminer le rendement correspondant. Il s'agit donc d'ajouter une étape de chromatographie d'affinité pour un ligand orthostérique (la résine correspondante est en cours d'obtention) puis une chromatographie d'exclusion de taille préparative. L'expérience de SPA sera alors utilisée pour caractériser le récepteur avec une méthode alternative à la RMN.

Le rendement final sera diminué et donc inférieur à 2 mg par litre de culture en milieu minimum. Cependant, s'il reste supérieur à celui obtenu en cellules SF9 avec la construction correspondante KOP-SF9 (environ 0.2 mg par litre de culture), ce protocole permettra de profiter des meilleures possibilités de marquage isotopique de la bactérie et pourra aboutir à l'étude de KOP par RMN.

Suite à l'ajout de ces étapes, il sera possible de tester à nouveau la cristallisation du récepteur produit chez la bactérie en LCP. Ce sera aussi le cas de l'échange en LMNG – CHS qui a été mis en place avec le récepteur de cellules SF9. Cet échange serait réalisé lorsque KOP est fixé

sur résine TALON après élimination d'IN5 et renaturation du récepteur. Une alternative aux micelles LMNG – CHS serait la reconstitution du récepteur en nanodisques lipidiques comme discuté dans les perspectives générales de ce manuscrit.

VII. Matériel et méthodes.

Plasmides d'expression de KOP chez *E. coli*.

Le plasmide pET21a-KOP-SF9 avait été préalablement obtenu par Pascal Demange par sous-clonage à partir du vecteur utilisé par l'équipe de Ray Stevens pour l'expression en cellules SF9. L'ensemble des digestions ont été réalisées avec des enzymes de restriction Fast Digest, les ligations avec la T4 DNA ligase, les PCR avec la polymérase Phusion et DpnI a été utilisée pour une mutagénèse dirigée. Ces enzymes ont été fournies par Thermo Fisher Scientific.

La stratégie de clonage ayant permis l'obtention des constructions KOP-SF9, NKp-KOP et IN5-KOP₁ et leur insertion dans les vecteurs pJ411 et pET21a est présentée ici et schématisée en *annexe*. La séquence KOP-SF9 a été insérée dans un vecteur pJ411 « vide » par digestion avec XbaI et XhoI. La séquence du gène NKp (domaine N-terminal membranaire de la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*) a été amplifiée par PCR (voir séquences des amorces en *annexe*) puis insérée dans le vecteur pJ411-KOP-SF9 par digestion avec NdeI et PstI pour construire pJ411-NKp-KOP. La séquence du gène IN5 (fragment de l'intégrine 5α) a été aussi amplifiée par PCR (voir séquences des amorces en *annexe*) puis insérée dans le vecteur pJ411-NKp-KOP par digestion avec NdeI et SalI pour construire pJ411-IN5-KOP₁. Les séquences NKp-KOP et IN5-KOP₁ ont alors été sous-clonées dans le plasmide pET21a-KOP-SF9 par digestion avec NdeI et XhoI pour obtenir les plasmides pET21a-NKp-KOP et pET21a-IN5-KOP₁.

La séquence IN5-KOP₂ est un gène synthétique fourni par Eurofins genomics dans un plasmide pEX-K4. Elle a été sous-clonée dans les plasmides pJ411-KOP-SF9 et pET21a-KOP-SF9 par digestion avec NdeI et XhoI. Le vecteur pET21a-IN5-KOP₂ obtenu a par la suite été utilisé pour modifier la construction IN5-KOP₂. Une mutagénèse dirigée a été réalisée pour ajouter un site AgeI supplémentaire en 3' du site de clivage à la TEV. Le site TEV a alors été éliminé par digestion avec AgeI et la séquence IN5-KOP₃ obtenue a été sous-clonée dans le vecteur pJ411 par digestion avec NdeI et XhoI. Le vecteur pJ411-IN5-KOP-T4L utilisé pour les essais de cristallisation a finalement été obtenu par PCR de fusion à partir de pJ411-IN5-KOP₃ par Jeffrey Velasquez dans l'équipe de Ray Stevens.

Pour l'ensemble des plasmides construits, la souche de clonage *E. coli* MC1061 [génotype : araD139, Δ (ara, leu)7697, Δ lacX74, galU⁻, galK⁻, hsr⁻, hsm⁺, strA] a été utilisée pour isoler et amplifier un clone et purifier le plasmide avec le kit mini-prep de QIAGEN. Les plasmides obtenus ont été séquencés par Eurofins genomics.

Expression de KOP en milieu riche.

Des bactéries *E. coli* BL21Star [génotype : F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm rne131 (DE3)] ont été transformées par les plasmides pJ411 et pET21a permettant l'expression des différentes constructions. L'ensemble des cultures ont été réalisées en milieu LB (lysogeny broth) à 37 °C et en présence d'ampicilline à 50 µg/mL avec les plasmides pET21a ou en présence de kanamycine à 30 µg/mL avec les plasmides pJ411. L'expression des protéines d'intérêt a été induite à une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de 0.8 à 1 pendant 4 heures en présence d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) à 1 mM. Le milieu de culture a été éliminé par centrifugation à 3000 g et 4 °C pendant 30 minutes avant de congeler le culot bactérien à -80 °C.

Des tests d'expression préliminaires ont été effectués par culture en 50 mL de milieu avec les vecteurs pJ411 et pET21a permettant d'exprimer les protéines KOP-SF9, NKp-KOP et IN5-KOP₁. Des tests d'expression ont ensuite été réalisés en 500 mL de milieu avec les vecteurs pJ411 permettant d'exprimer les protéines KOP-SF9, NKp-KOP et IN5-KOP₁ et les résultats sont présentés dans la partie II.

Les premiers essais de production de KOP présentés dans les parties III. 1. et III. 2 ont été réalisés dans les mêmes conditions d'expression avec des cultures en 500 mL et le vecteur pJ411-IN5-KOP₁. C'est aussi le cas de l'expression des protéines IN5-KOP₃ et IN5-KOP-T4L pour les essais de cristallisation, respectivement avec les plasmides pJ411-IN5-KOP₃ et pJ411-IN5-KOP-T4L.

Expression de KOP en milieu minimum.

L'expression en milieu minimum M9 a été réalisée dans des conditions similaires. L'ensemble des cultures ont été faites à 37 °C, en présence de kanamycine à 30 µg/mL, avec induction à une DO_{600nm} de 0.8 à 1 par l'IPTG 1 mM pendant 4 heures et le culot bactérien a été obtenu par centrifugation à 3000 g et 4 °C pendant 30 minutes puis congelé à -80°C. L'expression avec des bactéries *E. coli* BL21Star et B834 [génotype : F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm met (DE3)] transformées par pJ411-IN5-KOP₂ a été testée par culture en 50 mL. De la méthionine

250 mg/L a été ajoutée pour les bactéries B834. Des cultures en 500 mL de bactéries *E. coli* BL21Star transformées par le plasmide pJ411-IN5-KOP₂ ont été utilisées pour les expériences de production décrites dans les parties III. 3. et III. 4. ou par le plasmide pJ411-IN5-KOP₃ pour celles de la partie III. 5.

Lyse des bactéries et fractionnement.

Pour les premiers essais d'expression et de purification de KOP chez *E. coli* décrits dans les parties II., III. 1 et III. 2., la lyse des bactéries a été effectuée par sonication en PBS (tampon phosphate salin) pH 7.4, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) 5 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, glycérol 10 % v/v, tritonX100 1 % et 5 µL de benzonase (Sigma-Aldrich, 250 unités/µL). Le PBS utilisé ne contient pas de KCl qui est connu pour précipiter le SDS. Le lysat a ensuite été fractionné par centrifugation à 15000 g pendant 30 minutes à 4 °C et la fraction insoluble a été lavée par du PBS pH 7.4, glycérol 10 % v/v et β-mercaptoéthanol 2.8 mM.

Dans les expériences ultérieures, la lyse a été réalisée grâce à une presse de French à 1500 psi en PBS pH 7.4, EDTA 5 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, 5 µL de benzonase et lysozyme 0.1 g/L. Le lysat a été fractionné par ultracentrifugation à 150000 g et la fraction insoluble a été lavée par du PBS pH 7.4 et β-mercaptoéthanol 2.8 mM.

Solubilisation des corps d'inclusion de KOP.

La solubilisation a été initialement testée par incubation 30 minutes sur vortex en PBS pH 7.4, glycérol 10 % v/v, β-mercaptoéthanol 2.8 mM additionné de : SDS 1 % ; urée 2 M, 4 M ou 8 M ; SDS 0.8 % et urée 2 M ; SDS 0.2 %, DDM 0.8 % et CHS 0.015 % ou SDS 0.2 %, DDM 0.8 %, CHS 0.015 % et Urée 0.8 M. Après centrifugation 20 minutes à 20000 g et à température ambiante, les fractions solubles et insolubles ont été analysées par western-blot avec anticorps primaires dirigés contre l'étiquette poly-histidine.

Pour les premiers essais de purification (parties III. 1 et III. 2.), les corps d'inclusions ont été solubilisés pendant 30 minutes sur roue à température ambiante en PBS pH 7.4, glycérol 10 % v/v, β-mercaptoéthanol 2.8 mM, SDS 0.8 %, urée 2 M puis la fraction insoluble a été éliminée par centrifugation à 15000 g et température ambiante pendant 20 minutes. Pour les expériences ultérieures, le pH a été élevé à 8.0 (puis à pH 8.4 dans la stratégie finale utilisée pour l'élimination d'IN5 et les essais de cristallisation), le glycérol n'a plus été utilisé et une ultracentrifugation à 150000 g a remplacé la centrifugation à 15000 g.

Purification et renaturation *in vitro* de KOP avec la stratégie initiale.

Les étapes de purification en présence de SDS ont été réalisées à température ambiante. La fraction solubilisée a été incubée pendant une heure sur roue en présence de résine TALON (GE Healthcare) puis le mélange a été incubé une heure supplémentaire après dilution par deux du SDS, de l'urée et du β -mercaptoéthanol par ajout de PBS. La résine a ensuite été lavée par du tampon de solubilisation dilué deux fois par du PBS puis par le premier tampon de renaturation (PBS pH 7.4, β -mercaptoéthanol 2.8 mM, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %).

La suite de la purification a été réalisée à 4 °C. La résine a été incubée pendant environ 16 heures après ajout du premier tampon de renaturation additionné de JD_{Tic} 10 μ M puis pendant environ 16 heures supplémentaires après lavage par le second tampon de renaturation : HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, imidazole 20 mM, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %, Naltrexone 100 μ M. Un essai a été réalisé avec du glutathion oxydé 1 mM ajouté au second tampon de renaturation mais cela n'a plus été utilisé par la suite. Le récepteur a ensuite été élué par passage de tampon HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, imidazole 380 mM, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %.

L'échantillon a ensuite été dessalé sur colonne PD10 (GE healthcare). Lorsqu'un test RMN de liaison de la dynorphine a été réalisé à la suite du dessalage, ce dernier a été effectué en ²H-MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) 1 mM pH 7.4, KCl 150 mM, DDM 0.025 %, CHS 0.005 %. Dans le cas contraire, le tampon utilisé est HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %.

Pour les premiers essais de purification présentés dans les parties III. 1. et III. 2., les digestions par la protéase TEV ont été effectuées par ajout d'un équivalent de protéase préalablement dialysée dans le tampon du récepteur puis le mélange a été incubé deux heures. Une purification inverse a alors été réalisée par incubation sur la nuit en présence de résine TALON puis filtration de cette dernière. Avec la protéine de fusion IN5-KOP₂, un protocole identique a été testé avec de la protéase 3C à 0.1 équivalent. Dans ce cas, la séparation d'IN5 et KOP a aussi été testée par chromatographie échangeuse d'ion avec une colonne pré-packée HiTrap Q HP (GE Healthcare) et un gradient de KCl de 50 à 500 mM dans un tampon ¹H-MES 10 mM pH 7.5, DDM 0.025 %, CHS 0.005 %. Elle a aussi été essayée par chromatographie d'exclusion de taille préparative sur colonne S200 et en tampon ¹H-MES 10 mM pH 7.5, DDM 0.025 %, CHS 0.005 %, KCl 150 mM.

Pour la reconstitution d'IN5-KOP₂ en micelles LMNG – CHS discutée dans la partie III. 4., l'échange de détergent a été réalisé sur résine TALON après l'étape de renaturation. La résine a été successivement lavée par des tampons HEPES 10 mM pH 7.4, KCl 150 mM, Naltrexone 100 µM avec les mélanges de détergent suivant : LMNG 0.2 % - CHS 0.01 % / DDM 0.05 % - CHS 0.01 % ; LMNG 0.2 % - CHS 0.01 % / DDM 0.01 % - CHS 0.002 % ; LMNG 0.05 % - 0.0025 CHS % / DDM 0.005 % - CHS 0.001 % puis LMNG 0.05 % - CHS 0.0025 %. Le DDM – CHS a alors été substitué par du LMNG 0.05 % - CHS 0.0025 % pour l'élution de la résine TALON et l'étape de dessalage.

Modifications de la purification de KOP pour l'élimination d'IN5 et pour les essais de cristallisation.

Le protocole détaillé de production de KOP chez *E. coli* avec la stratégie permettant l'élimination d'IN5 est présenté en *annexe*.

Les productions du récepteur pour les expériences avec élimination d'IN5 (partie III. 5.) et pour les essais de cristallisation (partie IV.) ont été réalisés avec la stratégie schématisée dans la **figure 6a**. Elles ont été faites à partir de corps d'inclusions solubilisés en PBS pH 8.4, β-mercaptoéthanol 2.8 mM, SDS 0.8 % et urée 2 M, comme décrit plus haut.

Pour l'élimination d'IN5, la protéine de fusion IN5-KOP₃ (ou IN5-KOP-T4L) a été purifiée en conditions dénaturantes par incubation sur roue avec la résine TALON pendant une heure dans le tampon de solubilisation puis sur la nuit après dilution deux fois par ajout de PBS. Après lavage par du tampon de solubilisation dilué deux fois par du PBS, la protéine de fusion a été éluée en présence d'imidazole 380 mM. L'échantillon a alors subi des dialyses successives avec un seuil de 14 kDa (Spectra/Por 3 dialysis membrane standar RC tubing, Thermo Fisher Scientific) contre du PBS pH 8.0. Quatre dialyses ont été faites durant alternativement 6 et 16 heures. Elles ont été suivies par des tests de digestion avec 1 à 5 équivalents de protéase 3C pendant deux heures. La protéine de fusion a finalement été clivée dans les conditions établies lors de ces tests et la réaction a été stoppée par ajout de SDS 0.8 %, d'urée 2 M et de β-mercaptoéthanol 2.8 mM. La fixation du récepteur sur résine TALON, sa renaturation et la fin de purification ont alors été réalisées comme décrit plus haut.

Les conditions de purification après renaturation ont été légèrement modifiées pour les essais de cristallisation. L'élution de la résine TALON a été réalisée en HEPES pH 7.5 50 mM, NaCl 300 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.03 %, CHS 0.006 %, imidazole 380 mM, JD_{Tic} 50 µM et le dessalage a été opéré dans le même tampon sans imidazole.

Purifications de KOP à partir de membranes de cellules SF9.

Le protocole détaillé de la purification ayant permis la reproduction des cristaux de KOP est présenté en *annexe*. Les autres purifications à partir de cellules SF9 ont été réalisées avec un protocole équivalent et certaines modifications de la composition des tampons, comme décrit ici.

Ces purifications ont été effectuées à partir de cellules d'insecte après expression de la protéine notée KOP-SF9 (pour les essais d'échange en LMNG – CHS et la mise en place du test SPA), ou du récepteur utilisé pour la cristallographie. L'expression de ces protéines a été réalisée par les équipes de Ray Stevens et Vadim Cherezov.

L'ensemble des opérations sont réalisées à 4 °C. Pour les expériences de cristallographie, les cellules SF9 ont été lysées par décongélation dans un tampon hypotonique HEPES pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche). Les membranes ont alors été lavées par fractionnement par ultracentrifugation à 150000 g pendant 30 minutes dans ce tampon puis deux fois dans un tampon hypertonique additionné de NaCl 1 M. KOP a ensuite été incubé pendant une heure dans le tampon hypotonique additionné de JD_{Tic} 50 μM et d'iodoacétamide 2 mg/mL. Le récepteur a ensuite été solubilisé pendant 3 heures en HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, DDM 1 %, CHS 0.2 % et JD_{Tic} 25 μM et la fraction insoluble a été éliminée par ultracentrifugation à 200000 g pendant une heure. La fraction soluble a été incubée sur la nuit en présence de résine TALON, de 30 mM d'imidazole et de NaCl 1 M. La résine a ensuite été lavée par un tampon HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 800 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %, ATP 10 mM, MgCl₂ 10 mM et JD_{Tic} 50 μM puis par un tampon HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %, imidazole 50 mM et JD_{Tic} 50 μM. Le récepteur a finalement été élué en HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.03 %, CHS 0.006 %, imidazole 250 mM et JD_{Tic} 50 μM puis dessalé dans le même tampon sans imidazole sur colonne midiG25 (GE healthcare). Les étiquettes Flag, HA et poly-histidine du récepteur ont alors été supprimées par digestion avec 0.1 équivalent de protéase TEV sur la nuit puis purification inverse par incubation pendant deux heures en présence de résine TALON et filtration de cette dernière.

Pour les expériences de SPA en DDM – CHS, la production du récepteur a impliqué les modifications suivantes. De la naltrexone 250 μM a été utilisée à la place de JD_{Tic} dans les étapes avant purification sur résine TALON. Elle a ensuite été substituée par de la dynorphine

A 1-13 1 μ M lors des lavages de la résine puis aucun ligand n'a été ajouté dans la suite de la purification. La solubilisation a été faite en tampon HEPES 100 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, DDM 2 %, CHS 0.4 % et l'incubation avec résine TALON en présence d'imidazole 20 mM et de NaCl 550 mM. La résine TALON a été lavée par un tampon HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, imidazole 20 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %, le récepteur a été élué dans ce tampon avec 200 mM d'imidazole qui a ensuite été éliminé par dessalage sur colonne PD10. L'étiquette poly-histidine a ici été conservée.

Pour les expériences de SPA en LMNG – CHS, le protocole en DDM – CHS a été modifié pour inclure des lavages supplémentaires de la résine avant élution. Ces lavages ont été réalisés avec des concentrations croissantes de LMNG – CHS (0.1 % - 0.01 %, 0.16 % - 0.016 %, 0.18 % - 0.018 %, 0.19 % - 0.019 % et enfin 0.2 % - 0.02 %) et décroissantes de DDM – CHS (0.025 % - 0.005 %, 0.01 % - 0.002 %, 0.005 % - 0.001 %, 0.0025 % - 0.0005 % et enfin 0 % - 0 %). La suite de la purification a été réalisée en substituant le DDM – CHS par du LMNG 0.02 % - CHS 0.002 %. Les tests RMN de liaison de la dynorphine avec le récepteur de cellule d'insecte en LMNG – CHS ont été réalisés avec le même protocole de purification.

Test de liaison de la dynorphine sur KOP par RMN.

Pour l'ensemble de ces tests, le tampon du récepteur a d'abord été échangé par plusieurs cycles de dilution – concentration pour un tampon ^2H -MES 20 à 50 mM pH 6.1, KCl 150 mM, DSS (acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique) 100 μ M, $^2\text{H}_2\text{O}$ 10 % v/v additionné du détergent utilisé dans la purification du récepteur considéré (à la concentration du tampon final du récepteur).

Un premier échantillon a été obtenu par mélange de dynorphine A 1-13 (500 μ M - 1.4 mM) et de récepteur avec un rapport molaire dynorphine / KOP de 0.0025, 0.005 ou 0.01. Lorsque de la dynorphine marquée a été utilisée (marquage ^{15}N sur G2, G3, F4, L5, R6, R7, I8, R9, L12 et ^{13}C sur R6, R7 et R9), des spectres 1D ^1H avec découplage ^{15}N et ^{13}C et 2D ^1H - ^{15}N HSQC avec découplage ^{15}N ont été enregistrés. Lorsque de la dynorphine non-marquée a été utilisée, seul un spectre 1D ^1H sans découplage a été enregistré. Le second échantillon a été obtenu par ajout de JD1c à 1 - 1.5 équivalent par rapport à la dynorphine et les mêmes spectres que dans le cas du premier échantillon ont été enregistrés.

Les spectres ont été enregistrés en tubes de 3 mm à 280 K et 600 MHz (fréquence de Larmor du ^1H) avec cryosonde TCi ou 700 MHz sans cryosonde. Pour ces deux champs, il s'agit de spectromètres Bruker Avance III HD.

Essais de cristallisation.

Les récepteurs ont été concentrés en présence de ligand à 20 μL (20 à 50 mg/mL) à l'aide d'une unité de concentration avec un seuil de 100 kDa afin de limiter la surconcentration du détergent. 1 μL a été dilué 20 fois pour analyse par chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne SepaxNanofilm SEC-250. Les reconstitutions en phase cubique lipidique LCP ont été opérées par mélange des 19 μL restant avec 14 μL de monooléine – cholestérol 9 pour 1 en masse préalablement chauffé à 42 °C, comme décrit étape par étape dans (199). Un robot NT8 (Formulatrix) a été utilisé pour dispenser 40 nL par puit du récepteur en LCP et 800 nL par puit de la solution de criblage. Les plaques utilisées (Marienfeld) sont constituées de deux plaques de verre et d'un espaceur formant 96 puits pour la cristallisation. Elles ont été incubées à 20 °C et imagées à l'aide d'un robot RockImager 1000 (Formulatrix) à la recherche de cristaux.

Pour l'expérience de référence avec KOP produit à partir de cellules SF9, un criblage a été réalisé avec les 96 conditions indiquées en *annexe* avec du citrate de sodium 100 mM à pH 5.0, 5.5, 6.0, et 6.5. Une plaque a également été utilisée pour explorer des conditions autour de celle précédemment décrites : citrate de sodium 100 mM à pH 5.8 à 6.4, PEG400 28 à 32% v/v, nitrate de potassium 350 à 450 mM. Ces conditions ont aussi été testées avec le récepteur produit chez *E. coli* ainsi que des plaques de criblage des 96 conditions indiquées en *annexe* avec du citrate de sodium 100 mM à pH 4.5 et 7.0.

GHSR a été produit chez *E. coli* par l'équipe de Jean-Louis Banères en présence de l'antagoniste JMV5327 à 5 μM et avec pour tampon final du Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, DDM 0.025 %, CHS 0.005%. Il a été reconstitué en LCP et la cristallisation a été testée par criblage des 96 conditions indiquées en *annexe* avec du citrate de sodium 100 mM à pH 4.3, 5.0 et 6.0, du MES 100 mM à pH 5.3, 5.7, 6.3 et 6.7, du Bis-Tris 100 mM à pH 7.1 et du Tris 100 mM à pH 7.5, 8.5, 9.0. Pour les expériences de LCP-FRAP, le récepteur en détergent a été incubé en présence de Cy3-mono N-hydroxylsuccinimidyl ester (GE healthcare) 25 mg/L pendant 3 heures à 4 °C et la sonde fluorescente libre a été éliminée par deux dessalages successifs sur colonne midiG25. Il a ensuite été reconstitué en LCP et la fraction de fluorescence récupérée après photo-blanchissement a été déterminée pour les 96 conditions indiquées en *annexe* avec les tampons suivants : citrate de sodium 100 mM à pH 4.3, 5.0 et 6.0, du MES 100 mM à pH 5.3 et 6.7, du Bis-Tris 100 mM à pH 7.1 et du Tris 100 mM à pH 7.5, et 9.0.

Liaison de ligand radioactif suivie par SPA.

Ces expériences ont été réalisées avec des billes SPA Copper Histag PVT (Perkin Elmer) en polyvinyltoluène contenant de la diphénylanthracine comme scintillateur. Des solutions 2X de billes SPA ont été préparées dans le tampon de chaque expérience additionné de glycérol 20 % v/v (2X) pour éviter la sédimentation des billes. Des mélanges contenant un compétiteur non-radioactif, le récepteur, les billes SPA et de la ³H-diprénorphine 20 nM (25.8 Ci/mmol) ont été introduits dans des plaques 96 puits blanches (Costar, Sigma-Aldrich). Chaque mélange a été réalisé en duplicat pour les expériences de recherche des conditions expérimentales ou en triplicat pour les expériences de détermination de l'affinité d'un compétiteur non-radioactif. Les échantillons ont été incubés pendant deux heures à température ambiante sous agitation orbitale puis la scintillation de chaque puit a été mesurée à 400-450 nm pendant deux minutes avec un compteur TopCount NXT (Packard, Perkin Elmer).

La faisabilité de cette expérience a d'abord été testée avec la construction KOP-SF9 en membranes de cellules SF9 lavées dans du Tris pH 7,4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.1 mM et glycérol 10 % v/v. Le signal de liaison spécifique a été obtenu par différence en l'absence et en présence de ¹H-diprénorphine 10 μM pour plusieurs quantités de billes SPA (120 ou 200 μg) et de KOP (90 ou 900 pM dans 100 μL). Un signal suffisant a été obtenu pour 200 μg de billes.

Pour le récepteur purifié en DDM – CHS à partir de cellules SF9, les quantités de billes SPA (50, 100, 200 ou 400 μg) et de récepteur (2, 20 ou 200 nM dans 100 μL) permettant un signal spécifique suffisant ont été testées en tampon Tris pH 7,4 50 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.010 %, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.1 mM, glycérol 10 % v/v. Les expériences de compétition par la ¹H-diprénorphine (1 pM à 20 μM) et la ¹H-dynorphine A 1-13 (10 pM à 100 μM) ont alors été réalisées avec 100 μg de billes SPA et le récepteur à 50 nM. Les expériences de compétition avec le récepteur en LMNG – CHS ont été réalisées dans les mêmes conditions avec un tampon Tris pH 7,4 50 mM, LMNG 0.02 %, CHS 0.002 %, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.1 mM, glycérol 10 % v/v.

Pour chaque compétiteur, la concentration inhibant la moitié de la liaison du ligand radioactif (IC₅₀) (197) a été déterminée par régression du signal de scintillation (Y) en fonction de la concentration de compétiteur (X) avec l'équation suivante :

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + 10^{X - \log_{10} IC_{50}}}$$

L'affinité (K_I) a alors été obtenue grâce à l'équation suivante (198) (qui prend en compte les corrections de Cheng–Prusoff et de Goldstein–Barrett) :

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L] (1 - \delta/2)}{K_D} + \delta/(1 - \delta)}$$

avec $[L]$ la concentration du ligand radioactif, K_D son affinité, $[R]$ la concentration du récepteur, $\delta = RL_0 / [L]$ et $RL_0 = ((K_D + [L] + RT) - (K_D + [L] + [R])^2 - 4 [R] [L]) / 2$.

Chapitre IV

Interaction de la ghréline avec son récepteur : implications structurales d'une modification post-traductionnelle essentielle

I. Contexte et résumé de la publication II : « Structure and dynamics of GPCR-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain »

La description structurale des mécanismes par lesquels les RCPG reconnaissent leurs ligands repose en grande partie sur les études cristallographiques qui permettent une caractérisation détaillée des sites de liaison orthostériques (5, 32). Nous avons vu dans le chapitre d'introduction que les ligands endogènes des RCPG sont de natures chimiques très diverses et comptent notamment des protéines et des peptides (16). La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'interaction avec ces ligands endogènes est importante du point de vue de la physiologie et facilite la conception de nouveaux ligands. Néanmoins, la co-cristallisation d'un RCPG avec un ligand peptidique se révèle souvent difficile et peu de données structurales sont disponibles dans le cas de tels complexes (16). De façon complémentaire à la cristallographie, la RMN en solution permet de caractériser ces ligands dans l'état lié à leur récepteur (16, 71, 113, 155).

Ce chapitre présente le travail que nous avons réalisé pour étudier la ghréline lors de l'interaction avec son récepteur GHSR (publication II (114)). Comme discuté dans l'introduction, cette hormone peptidique digestive et son récepteur sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la prise alimentaire, de la sécrétion d'hormone de croissance et de l'homéostasie du glucose (170). La structure 3D de GHSR n'ayant pas encore été déterminée expérimentalement, les informations sur l'interaction ghréline / GHSR proviennent d'études de mutagenèse du récepteur (200-202) qui ont révélé des résidus importants du site orthostérique, et d'études de relation structure – fonction de la ghréline (181-184). Ces dernières ont en particulier montré que la partie N-terminale du peptide est responsable de la liaison et de l'activation de GHSR et que l'acylation post-traductionnelle en position 3 ainsi que les résidus hydrophobes voisins (phénylalanine et leucine en positions 4 et 5) sont critiques pour l'interaction avec le récepteur. C'est aussi le cas de l'amine de l'extrémité N-terminale bien qu'il soit possible de modifier les résidus en positions 1 et 2.

Pour cette étude, nous avons utilisé le récepteur GHSR humain sauvage produit par expression chez *E. coli* par l'équipe de notre collaborateur Jean-Louis Banères (36, 74), avec la stratégie dont nous avons testé l'application à KOP (chapitre III). Le récepteur produit est entièrement fonctionnel à la fois en termes de liaison de la ghréline et d'activation des protéines G. L'expression bactérienne a en particulier permis de perdeutérier le récepteur afin de limiter la diffusion de spin dans les expériences de NOE transféré et de relaxation ¹⁵N utilisées pour déterminer la structure et la dynamique de la ghréline liée (155, 164). Pour cette étude, GHSR

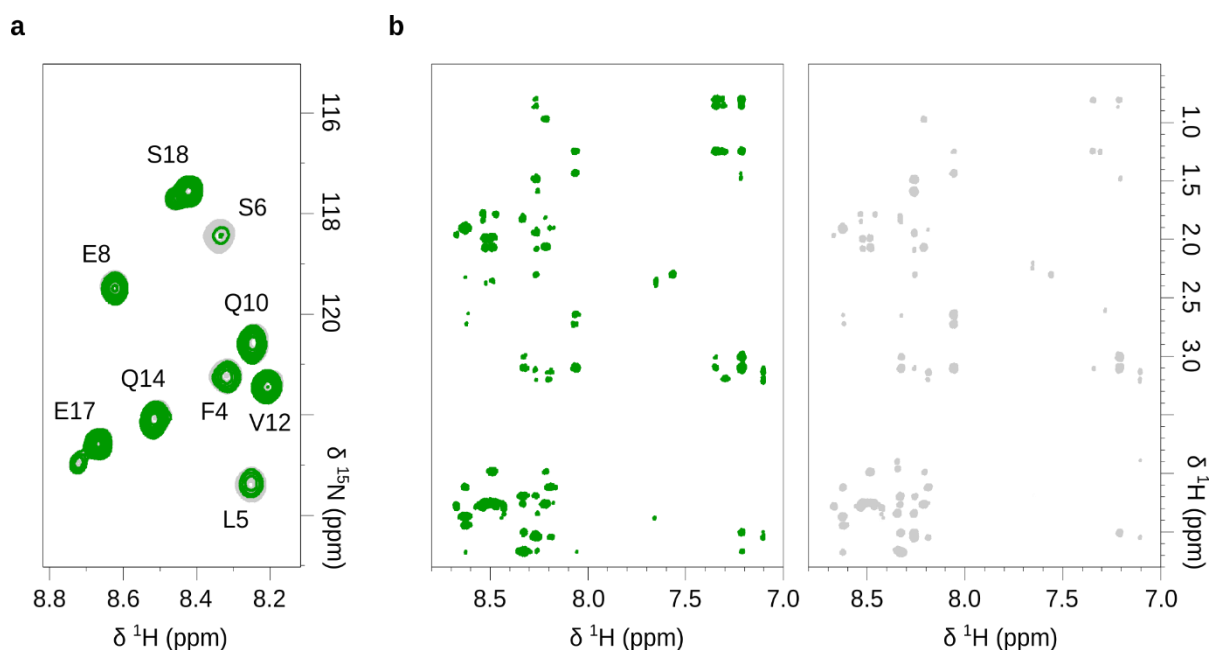
a été reconstitué en nanodisques lipidiques qui constituent un environnement plus proche de la membrane plasmique que les micelles de détergent. La stabilité de GHSR dans cet environnement est excellente et les expériences de RMN ont pu être réalisées sur 6 jours sans perte significative de récepteur (voir **figure supplémentaire 17**).

Les expériences de RMN que nous avons utilisées ont permis la caractérisation de la ghréline liée à son récepteur dans des conditions d'échange rapide entre les états lié et libre du peptide (**figure ci-après**). Comme précédemment réalisé pour le système dynorphine – KOP (113) (voir aussi le chapitre II (35) et l'*annexe* décrivant l'analyse des données RMN), la dynamique de la ghréline liée a été examinée par des mesures de relaxation transverse du ^{15}N et des expériences de NOE transféré ont été utilisées pour déterminer la conformation du peptide en interaction avec GHSR. Les résultats obtenus ont montré la structuration du motif hydrophobe de la ghréline (chaîne acyle, phénylalanine et leucine en positions 3, 4, et 5) « autour » de l'acylation post-traductionnelle ainsi qu'une flexibilité importante de la partie C-terminale du peptide. Nous avons aussi appliqué des expériences de différence de transfert de saturation (STD) qui ont confirmé l'interaction du motif hydrophobe avec GHSR sous forme d'un domaine rigide ainsi qu'une relative flexibilité de la partie en N-terminal de ce motif. Les résultats obtenus avec une forme désacylée de la ghréline (d'affinité détériorée d'environ un facteur 300) ont montré que ce peptide reste désordonné en présence de GHSR et suggèrent un rôle de « centre de structuration » pour l'acylation post-traductionnelle.

Nous avons aussi intégré ces données RMN à des simulations de dynamique moléculaire gros-grain par échange de réplique (CG-REMD) réalisées par Nicolas Floquet et ses collaborateurs (IBMM, Montpellier). Ces simulations ont permis la modélisation d'un processus de liaison de la ghréline impliquant une certaine flexibilité du peptide. Des simulations réalisées avec le peptide désacylé ont aussi indiqué que la chaîne acyle est nécessaire pour que la ghréline s'insère pleinement dans le site orthostérique. L'information structurale que nous avons obtenue par RMN peut également être utilisée dans une stratégie de modélisation tout-atome. Nous avons initié ce travail afin de proposer un modèle à résolution atomique du complexe ghréline – GHSR. La stratégie et les résultats préliminaires obtenus sont discutés en complément de la publication II.

L'observation d'une certaine flexibilité de la ghréline dans son état lié est une propriété qui a été aussi décrite pour la dynorphine liée à KOP (113). Cela nous a conduits à faire l'hypothèse d'une relation entre la dynamique des peptides liés et celle de leur RCPG. Pour y répondre, nous avons réalisé des expériences préliminaires afin d'examiner si l'état d'activation de KOP

influence la dynamique de la dynorphine. Ces expériences avec un mimétique de protéine G sont présentées dans le chapitre V et cette question constitue également une perspective du travail sur le système ghréline – GHSR.



Exemples de spectres RMN de la ghréline en présence de GHSR (rapport molaire GHSR/ghréline de 0.0015). Spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC (**a**) et 2D ^1H - ^1H NOESY avec un temps de mélange de 50 ms (**b**) en l'absence (en vert) ou en présence (en gris) du compétiteur orthostérique JMV5327. Les différences entre les spectres enregistrés avec GHSR apo et avec le récepteur bloqué par le compétiteur correspondent à la ghréline en interaction spécifique avec GHSR. La **table supplémentaire 4** liste les expériences RMN réalisées et les données obtenues sont téléchargeables au lien suivant : <http://cribligand.ipbs.fr/ghrelin-spectra.htm>.

II. Publication II.

L'article intitulé « Structure and dynamics of GPCR-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain » est présenté ici sous sa version finale pour publication dans *PNAS* avant édition par le journal.

Structure and dynamics of GPCR-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain

Guillaume Ferré^a, Maxime Louet^b, Oliver Saurel^a, Bartholomé Delort^b, Georges Czaplicki^a, Céline M’Kadmi^b, Marjorie Damian^b, Pedro Renault^b, Sonia Cantel^b, Laurent Gavara^b, Pascal Demange^a, Jacky Marie^b, Jean-Alain Fehrentz^b, Nicolas Floquet^b, Alain Milon^{a*} & Jean-Louis Banères^{b*}

^aInstitut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France.

^bInstitut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Montpellier, France.

*Correspondence should be addressed to Alain Milon, IPBS, Toulouse, France, alain.milon@ipbs.fr and Jean-Louis Banères, IBMM, Montpellier, France, jean-louis.baneres@umontpellier.fr

Keywords: GPCR ; ghrelin ; acylation ; NMR ; coarse-grain modeling.

PNAS, 2019. Authors’ version.

ABSTRACT

Ghrelin plays a central role in controlling major biological processes. Like other G protein-coupled receptor (GPCR) peptide agonists, the structure and dynamics of ghrelin bound to its receptor remain obscure. Using a combination of solution-state NMR and molecular modeling, we demonstrate that binding to the Growth Hormone Secretagogue Receptor is accompanied by a conformational change of ghrelin that structures its central region, including forming a well-defined hydrophobic core. By comparing its acylated and non-acylated forms, we conclude that the ghrelin octanoyl chain is essential to form the hydrophobic core and promote access of ghrelin to the receptor ligand-binding pocket. The combination of coarse-grained molecular dynamics studies and NMR should prove useful in improving our mechanistic understanding of the complex conformational space explored by a natural peptide agonist when binding to its GPCR. Such information should also facilitate the design of new ghrelin receptor-selective drugs.

SIGNIFICANCE STATEMENT

Deciphering the mechanisms involved in the recognition of natural ligands by their G protein-coupled receptors is a major issue in pharmacology, in particular for peptide-activated receptors for which structural data is sparse. Here, we combined state-of-the-art biophysical methods to solve the structure of a peptide hormone, ghrelin, in its receptor-bound state. In addition of being a prototype for GPCR peptide ligands, ghrelin is a major player in physiology. The data that emerged from this study clearly demonstrate that ligand conformational dynamics plays a central role in receptor:peptide interactions. They will also help future development of drugs targeting the ghrelinergic system.

INTRODUCTION

GPCRs comprise the largest family of cell-surface receptors and contribute to various central physiological processes (1). As such, they represent prominent therapeutic targets (2). Despite the wealth of structural information obtained during the last decade, few complexes between receptors and their natural agonists are known. This problem is particularly apparent for peptide ligands. Indeed, the structure of only a handful of all the class A GPCRs activated by endogenous peptides or proteins has been elucidated (3, 4), often with constrained ligands and/or modified receptors (3). Although limited, the existing structural data nevertheless demonstrate that GPCR peptide ligands adopt very diverse and complex modes of binding (3).

Ghrelin is a 28-amino acid peptide hormone that exerts a wide range of biological effects such as controlling growth hormone secretion, food intake, glucose metabolism and reward (5). These effects are all mediated by a class A GPCR, the Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) (6). A detailed description of the structure of ghrelin in its receptor-bound state is sparse but urgently needed, given its primary physiological role and therapeutic potential (5). Intriguingly, ghrelin requires post-translational octanoylation on the serine residue at position 3 for GHSR binding and activation, even though non-acylated ghrelin is the most abundant circulating form of the hormone (5). The role of ghrelin octanoyl chain is actually unknown, although different roles have been proposed such as partitioning into the membrane to increase the local concentration near the receptor or stabilizing the peptide conformation for optimal docking to GHSR. Here, by combining solution-state NMR to molecular modeling, we provide a detailed description of the structure and dynamics of ghrelin bound to its receptor and

illuminate the role of the octanoyl chain in structuring the hormone and promoting its binding to GHSR.

RESULTS

The ghrelin:GHSR complex. Wild-type human monomeric GHSR was expressed in *E. coli* and assembled into POPC/POPG nanodiscs (7). Active GHSR was then purified on a ligand-immobilized affinity column (8) (*Supporting Appendix*). The receptor used in all NMR experiments was thus fully functional with regard to ghrelin binding and G protein activation (*Fig. 1A,B*), with more than 90% of GHSR in our preparations competent to bind ligand, as assessed in a stoichiometric titration assay (*Fig. 1C*). Moreover, high affinity ghrelin binding similar to that measured in HEK cells could be recovered by reconstituting the isolated receptor in nanodiscs with its cognate Gq protein (*Fig. 1D*). The effect of the G protein on agonist affinity further assess the functional properties of the purified receptor. It also indicates that the properties of ghrelin bound to isolated GHSR assessed in this work are signatures of the natural agonist bound to the low-affinity, G protein-uncoupled, state of its GPCR.

To facilitate NMR analyses, we used a ghrelin peptide containing residues 1 to 18 (ghrelin 1-18), instead of full-length ghrelin (*Fig. 2A*), as the N-terminal region of ghrelin only has been shown to be sufficient for full GHSR binding and activation (9-12). This truncation did not have a major impact on either ghrelin affinity for GHSR or its ability to trigger Gq activation (*Fig. 1A,B*) (9). In addition, the C₈ fatty acid chain was attached to an Asp residue at position 3 instead of a Ser to increase the stability of the octanoylated version of the peptide (*Fig. 2A*). This modification does not affect the pharmacological profile of ghrelin (13), as the ester bond between the C₈-chain and Ser3 is not indispensable for ghrelin activity (11). Ghrelin 1-18 was synthesized with a number of residues labeled with ¹⁵N on their amide bonds and spanned the whole peptide sequence (*i.e.* S2, F4, L5, S6, E8, Q10, V12, Q14, E17, S18). Under our experimental conditions, ghrelin 1-18 was in fast exchange between its free and receptor-bound states on the chemical shift time scale (*i.e.* < 10 ms). Indeed, we observed broadening of site-specific ghrelin signals in the presence of GHSR and linear chemical shift variations as a function of the bound fraction (*Fig. 2B, SI Appendix, Fig. S1*), as previously observed for the dynorphin:μ-opioid receptor complex (14). We exploited these fast exchange conditions to utilize a large excess in ghrelin compared to GHSR (0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio). Under these fast exchange conditions, ¹⁵N transverse relaxation rates and ¹H cross relaxation

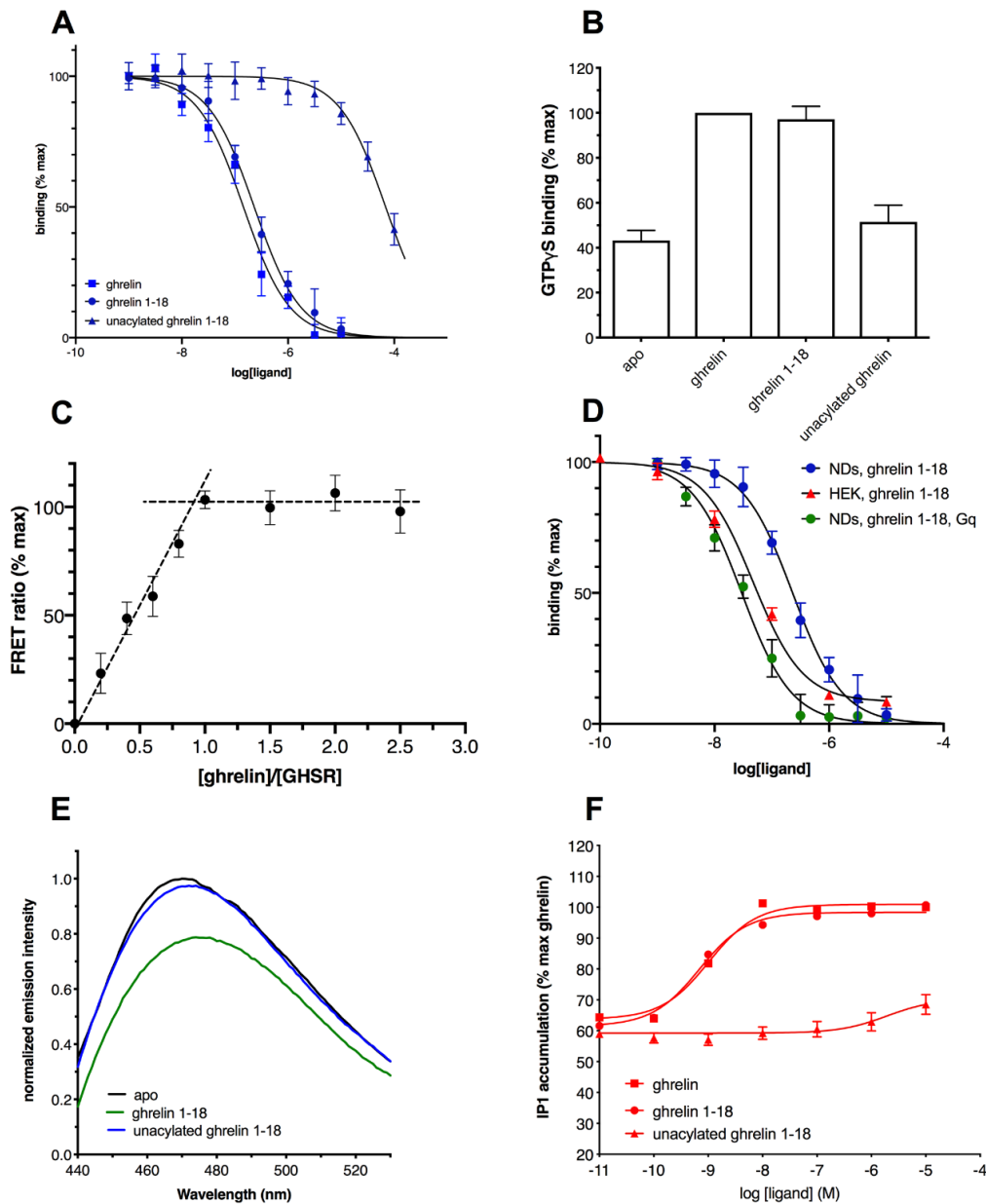


Figure 1. Functional properties of the isolated GHSR. (A) FRET-monitored competition assays of ghrelin, ghrelin 1-18 and unacylated ghrelin 1-18 for binding GHSR assembled into nanodiscs. (B) GTP γ S binding to G α q β 1 γ 2 catalyzed by GHSR-containing nanodiscs in the absence of ligand, in the presence of 10 μ M ghrelin, of 10 μ M ghrelin 1-18 or of 500 μ M unacylated ghrelin 1-18. (C) FRET-monitored stoichiometric titration of a 20 μ M fluorescent ghrelin solution with increasing concentrations of GHSR-containing nanodiscs. (D) FRET-monitored competition assays of ghrelin 1-18 for binding GHSR assembled into nanodiscs (NDs) in the absence or in the presence of G α q β 1 γ 2 compared to the HTRF-monitored competition binding assay of ghrelin 1-18 on GHSR expressed in stable HEK293 cell lines. (E) Fluorescence emission spectra of bimeans attached to C304^{7,34} of GHSR in nanodiscs in the absence of ligand or in the presence of 10 μ M ghrelin or of 500 μ M unacylated ghrelin. (F) Ghrelin, ghrelin 1-18 and unacylated ghrelin-induced IP1 production in GHSR-expressing HEK293 cells. Except for (E), data are the mean \pm SEM of three measurements.

rates were weighted averages of their values in the free and bound states. Due to GHSR nanodisc slow tumbling motion, these values are 3 to 4 orders of magnitude higher in the bound than free state. Thus, the former very likely dominated the measured averages, as confirmed with our results (Fig. 2C, SI Appendix, Fig. S2). To account for non-specific binding, we systematically duplicated each NMR experiment in the presence of an orthosteric GHSR ligand, JMV5327. This non-peptide compound (15) dissociates slowly from the isolated receptor, which prevents ghrelin from binding to its orthosteric site (SI Appendix, Fig. S3).

Receptor-bound ghrelin structure, dynamics and interaction mapping. First, we measured amide nitrogen ^{15}N transverse relaxation rates (^{15}N R_2) which are direct reporters of peptide internal mobility in its receptor-bound state (14). We carried out these measurements with a perdeuterated receptor, as perdeuteration is straightforward in the *E. coli* expression system we used (16) and prevents spin diffusion in ^{15}N relaxation and trNOE NMR experiments (17, 18). We observed significant differences in ^{15}N R_2 of ghrelin between apo- and JMV5327-loaded GHSR (Fig. 2C). Specifically, we found considerably higher rates for residues F4 to E8 in the absence of the competing compound. This ^{15}N transverse relaxation rate profile indicates that the N-terminal region encompassing the functionally important residues F4 (in part), L5 and S6 is rigidified in the GHSR-bound state while the peptide backbone becomes more and more flexible (*i.e.* unfolded) toward the C-terminus.

Complementary information on side-chain dynamics was provided by the 1D proton spectrum line shape analysis (Fig. 2B, SI Appendix, Fig. S1). We observed significantly broadened signals corresponding to ghrelin protons G1- H_α , S2- H_β , F4 aromatic ring, L5 side-chain methyl, S6- H_\square and C₈-chain in the presence of the receptor and in the absence of JMV5327, compared to signals from other residues such as H9, V12, Q10, Q13, Q14, R11, and R15. Taken together, these data clearly demonstrate a specific structuration of a hydrophobic core in the N-terminal part of ghrelin upon receptor binding, while the C-terminal region of the peptide encompassing residues from E8 to S18 remains flexible.

Then, we used proton transferred NOE (trNOE) experiments to determine the structure of ghrelin bound to GHSR (14, 17-20). We conducted NOESY experiments at several mixing times with the ghrelin samples in the presence of perdeuterated GHSR and in the absence or presence of JMV5327. As was the case for ^{15}N R_2 relaxation rates, ^1H - ^1H cross relaxation rates leading to NOEs were dominated by slow tumbling motion contributions, reflecting the bound state (14). We fit the evolution of the NOESY cross peaks integrals with mixing time (build-

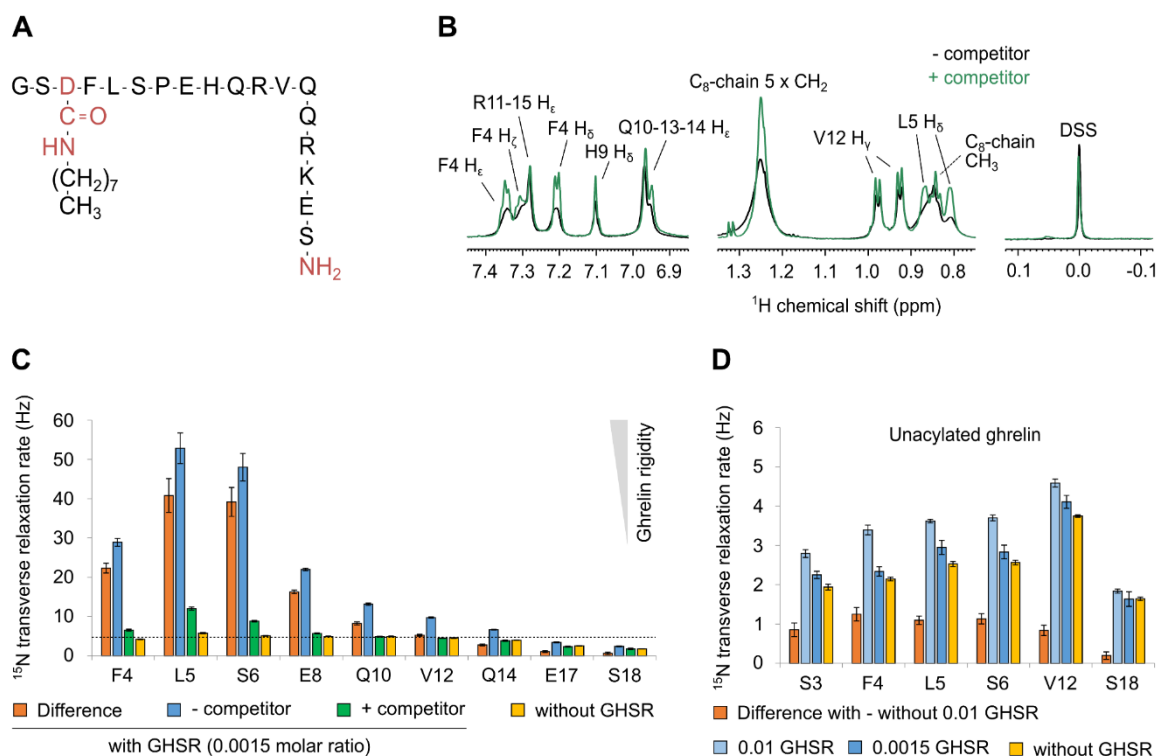


Figure 2. Acylated and unacylated ghrelin structural dynamics in the bound state. (A) Primary structure of the ghrelin peptide studied in the present work. Differences with the human wild type peptide (deletion of residues 19 to 28, amidification of the C-terminus, amidated aspartate at position 3) are shown in red. **(B)** 1D ¹H spectrum of ghrelin with GHSR and with (green) or without (black) JMV5327. **(C)** ¹⁵N transverse relaxation rates (R_2) of ghrelin backbone amides. *Blue*: apo GHSR (0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio), *green*: GHSR loaded with JMV5327 (0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio), *orange*: apo minus JMV5327-loaded difference, *yellow*: without GHSR. The dashed line corresponds to the ¹⁵N R_2 of non-acylated ghrelin V12 with GHSR (0.01 molar ratio). The relaxation rate difference (in orange) is proportional to the bound fraction and to the order parameter S^2 , which describes the amplitudes of NH motions in the bound state. **(D)** ¹⁵N R_2 of non-acylated ghrelin 1-18 backbone amides with apo GHSR (*light blue*: 0.01 GHSR-to-ghrelin molar ratio; *blue*: 0.0015 molar ratio), without GHSR (*yellow*), and difference in ¹⁵N R_2 (apo receptor at 0.01 GHSR-to-ghrelin molar ratio minus no receptor; *orange*).

up curves) using bi-exponential functions according to the isolated spin pair approximation (21) (SI Appendix, Fig. S2). Inter-proton proximities in the bound state were distributed throughout the peptide sequence with a higher density in the rigidified N-terminal part where several medium-range NOE contacts were observed (SI Appendix, Fig. S2). Importantly, we observed several NOE contacts between the C₈-chain terminal methyl and the peptide chain, namely at S6 and H9. We used derived distance restraints from the NOE build-up curves for structure

calculation by simulated annealing with AMBER14 (22) (SI Appendix, Table S1). We calculated an ensemble of ten receptor-bound ghrelin structures which were in best agreement with the experimental data (Fig. 3A, PDB entry number 6H3E). The peptide C-terminus including residues S18 to R11 was disordered, while the peptide center from Q10 to S6 progressively adopted a rigid structure. In the N-terminal region, critical residues L5, F4 and the D3-linked C₈-chain formed a well-defined hydrophobic core (Fig. 3B). In this structure ensemble, the C₈-chain was aligned with the peptide backbone, pointing toward its C-terminus, and was surrounded by F4 aromatic ring and L5 side-chain. Interestingly, this ensemble recapitulated well the ¹⁵N transverse relaxation rates: the relative order parameters profile calculated from ¹⁵N R₂ data is in good agreement with the one calculated based on the NMR conformers ensemble (SI Appendix, Fig. S4). One exception is F4 NH, indicating some additional flexibility for this amide group. S2 and G1 remained more disordered than the peptide hydrophobic core in the structure ensemble. Although we could not measure ¹⁵N relaxation rates for the serine at position 2, as its NH was in fast exchange with water protons and thus not visible in the HSQC spectra, evidence for the relative mobility of this residue came from the lack of intense NOEs and from the STD profile.

Finally, we obtained a complementary picture of ghrelin interaction with GHSR using saturation transfer difference (STD) epitope mapping experiments (23, 24) with a protonated receptor sample. STD amplification factors depend both on ligand:receptor contacts and ligand dynamics, so they provided an additional description of the ligand binding pattern (24). We measured STD in the absence and presence of JMV5327 and analyzed the differences in STD amplification factors for signals spanning the whole peptide sequence (Fig. 4). Specifically, protons within the hydrophobic core, *i.e.* D3-H_β, C₈-chain methylenes and methyl, F4 aromatic ring and L5 methyls, gave the strongest STD signal indicating spatial proximity with GHSR protons, and confirming they were in a rigid domain. Consistent with G1 and S2 partial disorder in the NMR structure ensemble, we observed medium STD signals for G1-H_α, S2-H_α and -H_β protons. Overall, these results confirm and extend STD data obtained with GHSR in bicelles, where the S3 and F4 residues of ghrelin showed a strong STD signal (25), indicative of a tight interaction with the receptor.

Ghrelin binding pathway. To further delineate the possible ghrelin binding pathway, we used a protocol previously validated with different peptide-binding GPCRs (26). This protocol, here named CG-REMD, combined MARTINI coarse grain (CG) force field with Replica Exchange Molecular Dynamics (REMD), starting from free ghrelin in the water phase and GHSR

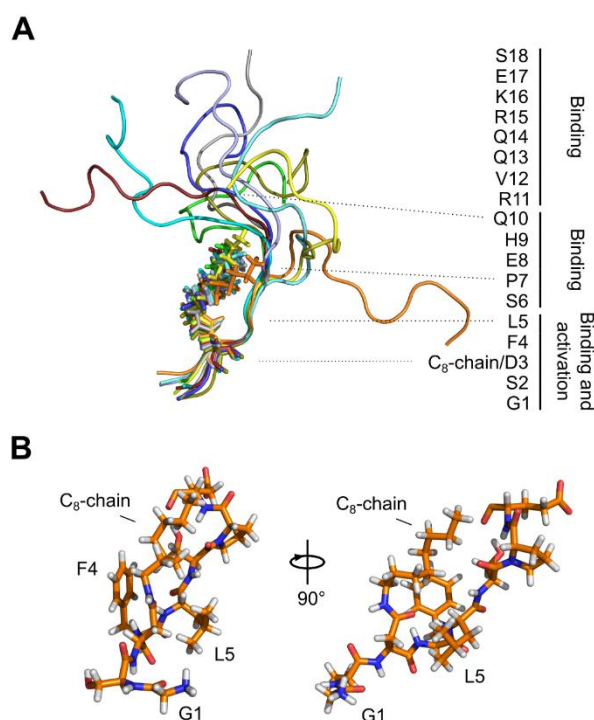


Figure 3. Receptor-bound ghrelin structure. (A) Overlay of the ten best GHSR-bound ghrelin conformations. The C₈-chains are shown in all-atom stick representation. The peptide sequence annotation schematizes the structure-activity relationship data from the literature. (B) All-atom stick representation of the N-terminal region of the best ghrelin conformer. Only residues G1 to E8 are shown.

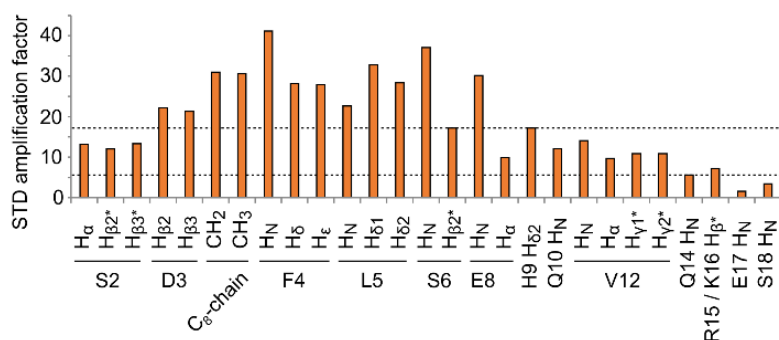


Figure 4. Map of ghrelin interaction area with its receptor. Saturation transfer difference (STD) amplification factors of ghrelin bound to GHSR, with $A_{STD} = (I_0 - I_{sat}) / I_0 \times [\text{ghrelin}] / [\text{GHSR}]$ (23). This number reports on the efficiency of magnetization transfer from the receptor to the peptide. It depends on proximity between receptor and peptide protons, as well as on the internal dynamics within the complex. The difference in amplification factors in the absence and presence of JMV5327 is plotted here. Backbone amide protons and other protons signals were isolated from 2D ¹⁵N-¹H and 1D ¹H STD experiments, respectively. For signals noted with a * stereospecific assignment was not performed. Dashed lines report on S6 H β medium STD signal and Q14 H_N low STD signal. G1-H α STD is similar to S2-H α and -H β STDs. However, its amplification factor could not be measured precisely due to partial overlapping with other signals on the 1D proton spectra.

embedded in a lipid bilayer. Incorporating the full set of NMR restraints to the peptide at this initial stage prevented ghrelin from entering its binding pocket, possibly because it could not adopt the intermediate conformations required for navigating its binding pathway. This implies that ghrelin conformational dynamics are essential for GHSR binding. Hence, we considered only the restraints that maintained the octanoyl group along the peptide main chain. These restraints prevented the insertion of the acyl chain into the membrane that could limit ghrelin:GHSR interaction events (SI Appendix, Fig. S5). At the end of the simulations, the ghrelin conformations in contact with the receptor were clustered based on their structural similarities (SI Appendix). Among the ten most populated clusters, eight were systematically found in each of the three independent CG-REMD simulations we carried out, indicating a good convergence of sampling (SI Appendix, Fig. S6). We thus considered only these eight clusters (SI Appendix, Table S2 and Fig. S7). Ghrelin was in close contact with the orthosteric pocket of the receptor in all these eight clusters but one (cluster 7) where the hydrophobic core was embedded into the membrane. Among the remaining clusters, in only one (cluster 6) ghrelin had its N-terminus oriented toward the bottom of the receptor binding pocket (SI Appendix, Fig. S7 and Movie S1), as expected based on previous pharmacological studies (11), with a conformation closely resembling the NMR-derived structure ensemble (Fig. 5A, purple curve). The conformation derived from this cluster was the only consistent with most of the NOE restraints selected for CG modeling (Figs. S8,9). The only exception to the NMR measurements involved F4 that was found to be shifted away from D3 and L5 in the modelling.

To further refine the ligand:receptor model, we performed additional 30 μ s CG Molecular Dynamics simulations starting from cluster 6 and incorporating the full set of NMR restraints. Ghrelin then explored in a few nanoseconds a restricted conformational space encompassing the whole set of NMR conformers (Fig. 5A, red curve) and a deeper position in the receptor binding pocket (Fig. 5B). This position could correspond to the final bound state of ghrelin (named here “bound state”), and cluster 6 thus to an intermediate site in the binding pathway (named here “intermediate state”).

Importantly, in the “bound state”, ghrelin kept a certain level of internal flexibility (Fig. 5C, SI Appendix, Movie S2), in line with the dynamic features determined by NMR. To better describe this flexibility, we analyzed all possible interaction pairs between ghrelin and GHSR in this state (Fig. 6, SI Appendix, Table S3). Despite its deep location in the receptor binding pocket, ghrelin G1 residue explored several interaction partners, in particular E124^{3.33} (superscript indicates Ballesteros-Weinstein numbering (27)) (Figs. 5B,6), which is described as a major

interaction spot for ghrelin terminal amine (28). In the same way, S2 showed different putative partners, which agrees with its relative degree of flexibility shown by our NMR data. The most stable peptide:receptor interactions involved the hydrophobic core, consistent with its rigidification in the GHSR-bound state. Finally, weaker interactions were found for S6 and P7, and no stable interaction was found for all other residues (E8, H9, Q10, R11 and V12), in agreement with our NMR structure ensemble and order parameters profile.

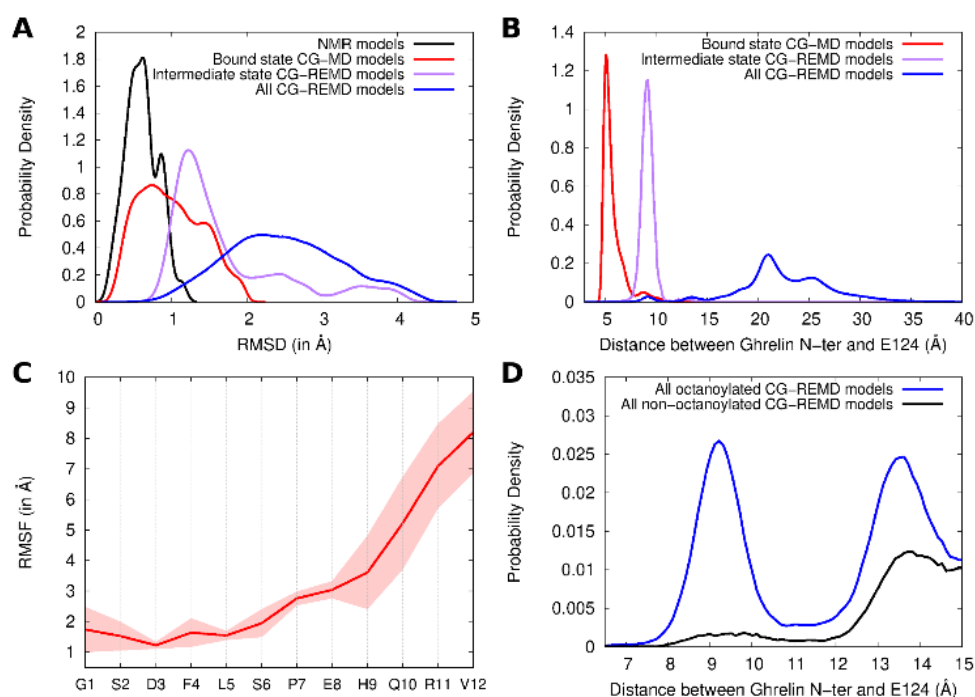


Figure 5. Conformation and flexibility of ghrelin bound to GHSR. (A) Root Mean Square Deviation (RMSD) profiles of coarse-grain models from the NMR structure ensemble (black), the “bound state” model (red), the “intermediate state” model (purple) and all models in contact with GHSR from CG-REMD simulations (blue). The RMSD is a metric to measure structural deviation of a conformation from a reference structure, here the NMR structure ensemble. (B) Probability densities of the distance between the ghrelin N-terminus and the side chain bead of E124^{3,33} in the different models. (C) Root Mean Square Fluctuation (RMSF) profile of ghrelin backbone during restrained CG-MD simulations. The RMSF shows the position variability of each residues along the trajectory (see movie S2). Conformations were aligned on the receptor pocket to account for the global flexibility of ghrelin inside its binding cavity. The standard deviation inferred from the two CG-MD simulations is represented as a transparent area around the mean (red line). (D) Probability densities of the distance between octanoylated and non-octanoylated ghrelin N-terminus and the side chain bead of E124^{3,33}. Densities are shown in the interval 6.5-15 Å for clarity (full density profiles in SI Appendix, Fig. S11).

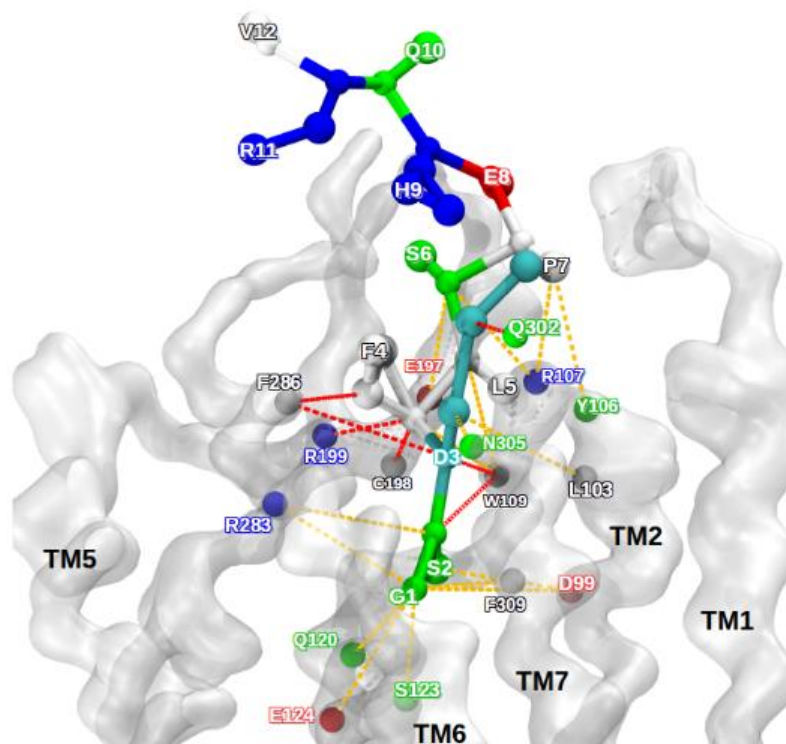


Figure 6. Interaction pattern between ghrelin and GHSR in the “bound state” model. Ghrelin is represented as balls and sticks. The receptor backbone is shown as a transparent white surface. The colors of the amino-acids correspond to their physical and chemical properties (cyan: octanoylated aspartate, white: hydrophobic, green: polar, red: negatively charged and blue: positively charged). Dashed colored lines represent the contacts between the receptor and the ghrelin along the two trajectories. Red contacts represent strong persistent contacts. Orange contacts indicate transient and weaker contacts. This qualitative determination of contact used distances from the center of CG-beads for all snapshots of the CG-MD trajectories.

Role of the octanoyl chain in ghrelin structure and binding. Removing the C₈-chain induces a dramatic deterioration of ghrelin potency and affinity for GHSR (9, 11, 12). In agreement with this data, we found here that the non-acylated form of ghrelin 1-18 weakly bound to the purified receptor in nanodiscs (Fig. 1A). Absence of the octanoyl chain also impeded GHSR activation, based on the absence of fluorescence changes of bimeane attached to the isolated receptor (Fig. 1E), on the absence of any GHSR-catalyzed GTP γ S binding to G α_q (Fig. 1B) and on the very limited IP1 production in GHSR-transfected HEK cells (Fig. 1F). Overall, these data indicate that non-acylated ghrelin 1-18 is likely unable to stabilize an active GHSR conformation, although it can bind the receptor with a very low affinity ($K_i = 34.4 \pm 4.2 \mu\text{M}$, versus $115.3 \pm 13.0 \text{ nM}$ for the acylated version; Fig. 1A).

To examine the possible effects of the acyl chain on ghrelin structure that could be responsible for these pharmacological features, we duplicated the ^{15}N R_2 measurements with ghrelin 1-18 devoid of the C_8 -chain. We found that ^{15}N R_2 in the presence of GHSR (0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio, *i.e.* the ratio used with acylated ghrelin) was nearly identical to those of the peptide free in solution. Increasing the GHSR-to-ghrelin molar ratio to 0.01 yielded a small increase in R_2 , of approximately 1 Hz, compared with the 40 Hz increase observed with acylated ghrelin at a 0.0015 molar ratio (Fig. 2D). The difference in ^{15}N R_2 between samples in the absence and presence of GHSR exhibited a flat profile from S3 to V12. These data indicate that non-acylated ghrelin residues 3 to 12 remain largely disordered under our experimental conditions even though the concentration used (1.37 mM for the sample with 0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio, *i.e.* about 40-fold over the measured K_i value) should yield the peptide mostly bound to the receptor (over 95%). We also recorded non-acylated ghrelin 2D ^1H - ^1H NOESY for 100 and 300 ms mixing time in the presence of the receptor (0.0015 and 0.01 GHSR-to-ghrelin molar ratio). Consistent with the ^{15}N R_2 measurements, we did not observe any of the trNOEs important for the structure of acylated ghrelin, in particular the backbone “medium-range” (S3H_α - L5H_N and S6H_α - E8H_N) and hydrophobic core-corresponding (S3H_α - F4H_δ , S3H_α - F4H_ϵ , S3H_β - F4H_δ , F4H_N - $\text{L5H}_{\delta 1/2}$, F4H_α - $\text{L5H}_{\delta 1/2}$, F4H_δ - $\text{L5H}_{\delta 1/2}$, F4H_ϵ - $\text{L5H}_{\delta 1/2}$, F4H_ϵ - L5H_N and F4H_ϵ - L5H_α) protons pairs (SI Appendix, Fig. S10). Overall, these results highlight the essential participation of the C_8 -chain in structuring the hydrophobic core of ghrelin and in the associated rigidity of the central region of the peptide after receptor binding.

To then assess the possible origin of these effects, we analyzed the binding of non-acylated ghrelin to GHSR using the CG modeling protocol described above. The conformations thus obtained were more uniformly distributed than those obtained for the acylated peptide (SI Appendix, Table S2). Five of the eight clusters described for the octanoylated peptide were also observed with the non-acylated one, but the latter was close to the receptor binding pocket in very few conformations (Fig. 5D, SI Appendix, Fig. S11). In particular, cluster 6 (“intermediate state”) was almost unpopulated (SI Appendix, Table S2). Overall, our simulations reveal that the non-acylated peptide can explore positions at the receptor surface common with acylated ghrelin, but that the octanoyl chain strongly facilitates access to deeper binding pockets.

DISCUSSION

By integrating solution-state NMR spectroscopy data with advanced molecular modeling, we provide here a detailed description of the conformational features of ghrelin bound to GHSR. The molecular picture obtained illustrates the complex conformational space GPCR peptide ligands explore when navigating from their free- to their receptor-bound states.

Our data indicate a binding mode where only the N-terminal region of ghrelin becomes rigid through a direct interaction with GHSR with the occurrence of a well-defined hydrophobic core composed of the octanoyl moiety, F4 and L5, whereas the C-terminal portion of the peptide remains highly disordered. Interestingly, we observed the specific ordering of the N-terminal region in CG modeling, despite starting with a ghrelin peptide in solution with a very minimal set of NMR-derived restraints. Associated with the absence of a well-defined structure in the absence of GHSR (29), this strongly indicates that this structuration is intricately associated with the binding process. This mode of interaction is fully consistent with previous structure-activity relationship studies. The specific rigidification of the N-terminal region of ghrelin upon binding to GHSR, as well as the receptor:ligand contacts inferred from STD, directly correlate with the first five residues of ghrelin being sufficient to bind and activate GHSR (9-12). In the same way, the mobility in the ghrelin C-terminal region is consistent with binding data that found no change in affinity when deleting residues 10 to 14 of ghrelin (9). Finally, partial disorder at S2 and the lack of persistent interactions between this residue and the receptor indicates that the G1-S2 residues explore different positions relative to the hydrophobic core of ghrelin, which is consistent with the proposed role of these two residues as a spacer between the two important functional motifs of ghrelin, the N-terminal amine and the hydrophobic core (9, 11). Ghrelin rigidity after binding to its receptor was also proposed in the ghrelin:GHSR model inferred from Rosetta modeling based on solid-state NMR chemical shifts (25). However, this model proposed a helical segment for residues 9 to 18 of ghrelin, which is not consistent with our results indicating this region is disordered. Helical propensity in this region was also proposed in the model of membrane-associated ghrelin obtained through a similar approach (29). Whether this difference arises from the distinct lipid models used (bicelles *versus* our nanodiscs) or from the experimental conditions (*e.g.* -30°C for the solid-state NMR experiments *versus* our buffered solution at 7°C) is an open question.

Our combined NMR and CG modeling data with non-acylated ghrelin highlight the paramount role of the octanoyl chain in ghrelin structure and binding to GHSR. Specifically, the C₈-chain

appears necessary for folding of the ghrelin hydrophobic motif. Moreover, its presence is necessary for ghrelin to access its final orthosteric binding site in GHSR, as well as for negotiating certain intermediate poses within the transmembrane bundle. This strongly suggests that the C₈-chain acts as a dynamic, apolar structural hub that stabilizes the peptide hormone in a specific receptor-bound conformation. Based on our data, we can propose a multi-step model for ghrelin binding: initial interactions at the receptor surface occurs with and without the octanoyl chain, while the latter is required for engaging deeper binding sites. The role of the acyl chain in structuring a hydrophobic core rather than in mediating a highly specific receptor-ligand interaction agrees with observation that unspecific C₈-chain bulky hydrophobic substitutions preserve ghrelin binding and activity (9, 11). The preference for an eight-carbon fatty acid most likely arises from the acyl chain selectivity of the modifying enzyme (30). In contrast, polar or charged modifications within the C₈-chain are strongly detrimental to both affinity and potency (9), likely because they disturb the ghrelin hydrophobic core. C₈-chain attachment to S6 also significantly affected affinity and potency of the ghrelin peptide (9). Our structure, in which the C₈-chain interacts with F4 and L5 side-chains and points toward the peptide C-terminus, indicates that displacing the C₈-chain towards the C-terminal end should prevent its interaction with these side chains, which in turn should inhibit formation of the hydrophobic core. Overall, this represents an original mechanism to explain the crucial role of this unique modification of the ghrelin peptide on the binding process and energetics.

Our data not only provide a detailed description of the structural features of ghrelin bound to GHSR, but also illustrate an interesting mechanism where ligand conformational dynamics could represent a central component in the binding of endogenous peptide ligands to their GPCR. Our data also directly demonstrate some degree of conformational and positional local dynamics of the peptide even when it has reached its ligand-binding pocket. It is then tempting to speculate that the degree of ligand dynamics in the bound state is intricately tied to the conformational flexibility of the receptors themselves, which explore a complex conformational landscape with multiple states (31-34). This would extend the concept of conformational multiplicity of GPCRs to ligand:receptor concerted dynamics, and even to a global picture of concerted dynamics within the full signaling complex (35), if one considers the proposed conformational dynamics of G proteins associated with their receptor (36-38). This dynamic picture of the interaction between GPCRs and conformationally labile ligands and its relationship to signaling output underscores relevant experimental strategies, such as the one used here, that can illuminate these dynamics.

MATERIALS AND METHODS

All experimental methods are detailed in [SI Appendix](#).

Receptor production, ligand synthesis and labeling. Monomeric GHSR was produced as previously published (7). All peptides were produced by solid-phase peptide synthesis.

NMR experiments. NMR data were acquired with the peptides and GHSR in a 20 mM perdeuterated MES pH 6.5, 100 mM KCl, 100 μ M DSS, 10 % v/v $^2\text{H}_2\text{O}$ buffer at 280 K on a Bruker Avance III HD 700 MHz (^1H Larmor frequency). Experiments on GHSR-bound octanoylated ghrelin were carried out at a 0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio. Each experiment was performed with two independent receptor samples, namely the apo- and JMV5327-loaded GHSR, to remove non-specific binding contributions.

NMR data analysis. ^{15}N transverse relaxation rates (R_2) were extracted by mono-exponential decay fitting from R_2 CPMG experiments. For each labeled ghrelin amide group, the difference in R_2 (apo minus JMV5327-loaded GHSR) is directly proportional to the receptor-bound order parameter S^2 (14). Integrals of 2D ^1H - ^{15}N STD-HSQC signals and isolated 1D ^1H STD signals were extracted and amplification factors $A_{\text{STD}} = (I_0 - I_{\text{sat}}) / I_0 \times [\text{ghrelin}] / [\text{GHSR}]$ (23) were calculated. Signals from 2D ^1H - ^1H NOESY and 3D ^1H - ^1H - ^{15}N NOESY-HMQC spectra were assigned and integrated for every mixing time. The build-up curves were obtained by bi-exponential fitting ([SI Appendix, Fig. S2](#)) (14, 21). Structure calculation was performed by simulated annealing under build-up curves-derived distance restraints.

Coarse-grained modeling of ghrelin-GHSR complex. Coarse grain modeling of the complex was carried out as described previously starting from a GHSR homology model based on the crystal structure of NTS1R in complex with neurotensin (4GRV) (39) and a MARTINI representation of the ghrelin peptide obtained by converting the all-atom model, including the octanoyl chain, which parameters were assigned by analogy with a C_8 lipid chain from the MARTINI forces field, with two elastic bonds added to keep the octanoyl group in close contact with the peptide main chain ([SI Appendix, Fig. S12](#)).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, Université Montpellier, Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE11-0011). The PICT - Genotoul platform of Toulouse was funded by CNRS, Université de Toulouse – UPS, IBiSA, European structural funds, and the Midi-Pyrénées

region. We thank MESO@LR, CINES (DARI project n° A0020707530) and PRACE (project n° 2017174234) for calculation resources. We thank CHEMISYST Labex for financial support for PR and Université de Montpellier for BD. We also thank Life Science Editors for editorial assistance.

REFERENCES

1. Lagerstrom MC & SchiOTH HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7(4):339-357.
2. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, SchiOTH HB, & Gloriam DE (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16(12):829-842.
3. Wu F, Song G, de Graaf C, & Stevens RC (2017) Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *J Mol Biol* 429(17):2726-2745.
4. Koehl A, *et al.* (2018) Structure of the micro-opioid receptor-Gi protein complex. *Nature* 558(7711):547-552.
5. Muller TD, *et al.* (2015) Ghrelin. *Molecular metabolism* 4(6):437-460.
6. Howard AD, *et al.* (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273(5277):974-977.
7. Damian M, *et al.* (2012) High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem* 287(6):3630-3641.
8. Damian M, *et al.* (2015) Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(5):1601-1606.
9. Bednarek MA, *et al.* (2000) Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 43(23):4370-4376.
10. Matsumoto M, *et al.* (2001) Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 284(3):655-659.
11. Matsumoto M, *et al.* (2001) Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 287(1):142-146.
12. Van Craenenbroeck M, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, & Perret J (2004) Ala-scan of ghrelin (1-14): interaction with the recombinant human ghrelin receptor. *Peptides* 25(6):959-965.
13. Leyris JP, *et al.* (2011) Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a. *Anal Biochem* 408(2):253-262.
14. O'Connor C, *et al.* (2015) NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(38):11852-11857.
15. Maingot M, *et al.* (2016) New ligands of the ghrelin receptor based on the 1,2,4-triazole scaffold by introduction of a second chiral center. *Bioorg Med Chem Lett* 26(10):2408-2412.
16. Casiraghi M, Damian M, Lescop E, Baneres JL, & Catoire LJ (2018) Illuminating the Energy Landscape of GPCRs: The Key Contribution of Solution-State NMR Associated with Escherichia coli as an Expression Host. *Biochemistry* 57(16):2297-2307.
17. Milon A, Miyazawa T, & Higashijima T (1990) Transferred nuclear Overhauser effect analyses of membrane-bound enkephalin analogues by ¹H nuclear magnetic resonance: correlation between activities and membrane-bound conformations. *Biochemistry* 29(1):65-75.

18. Catoire LJ, *et al.* (2010) Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2. *J Am Chem Soc* 132(26):9049-9057.
19. Bersch B, Koehl P, Nakatani Y, Ourisson G, & Milon A (1993) ¹H nuclear magnetic resonance determination of the membrane-bound conformation of senktide, a highly selective neurokinin B agonist. *J Biomol NMR* 3(4):443-461.
20. Clore GM & Gronenborn AM (1983) Theory of the Time-Dependent Transferred Nuclear Overhauser Effect - Applications to Structural-Analysis of Ligand Protein Complexes in Solution. *Journal of Magnetic Resonance* 53(3):423-442.
21. Vogeli B (2014) The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 78:1-46.
22. Case DA *et al.* (2014) AMBER 14. *University of California, San Francisco.*
23. Mayer M & Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society* 123(25):6108-6117.
24. Yong KJ, *et al.* (2018) Determinants of Ligand Subtype-Selectivity at alpha1A-Adrenoceptor Revealed Using Saturation Transfer Difference (STD) NMR. *ACS Chem Biol* 13(4):1090-1102.
25. Bender BJ, *et al.* (2019) Structural Model of Ghrelin Bound to its G Protein-Coupled Receptor. *Structure* 27(3):537-544.
26. Delort B, *et al.* (2017) Coarse-Grained Prediction of Peptide Binding to G-Protein Coupled Receptors. *J Chem Inf Model* 57(3):562-571.
27. Ballesteros JAW, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences, S.C. Sealfon, ed. (Academic Press):*366-428.
28. Holst B, *et al.* (2009) Overlapping binding site for the endogenous agonist, small-molecule agonists, and ago-allosteric modulators on the ghrelin receptor. *Mol Pharmacol* 75(1):44-59.
29. Vortmeier G, *et al.* (2015) Integrating solid-state NMR and computational modeling to investigate the structure and dynamics of membrane-associated ghrelin. *PLoS One* 10(3):e0122444.
30. Darling JE, *et al.* (2015) Structure-Activity Analysis of Human Ghrelin O-Acyltransferase Reveals Chemical Determinants of Ghrelin Selectivity and Acyl Group Recognition. *Biochemistry* 54(4):1100-1110.
31. Casiraghi M, *et al.* (2016) Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J Am Chem Soc* 138(35):11170-11175.
32. Nygaard R, *et al.* (2013) The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* 152(3):532-542.
33. Manglik A, *et al.* (2015) Structural Insights into the Dynamic Process of beta2-Adrenergic Receptor Signaling. *Cell* 161(5):1101-1111.
34. Okude J, *et al.* (2015) Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the mu-Opioid Receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(52):15771-15776.
35. Hilger D, Masureel M, & Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 25(1):4-12.
36. Furness SGB, *et al.* (2016) Ligand-Dependent Modulation of G Protein Conformation Alters Drug Efficacy. *Cell* 167(3):739-749.
37. Gregorio GG, *et al.* (2017) Single-molecule analysis of ligand efficacy in beta2AR-G-protein activation. *Nature* 547(7661):68-73.
38. Damian M, *et al.* (2018) GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(17):4501-4506.
39. White JF, *et al.* (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490(7421):508-513.

DETAILED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Peptide synthesis and characterization. Peptides were synthesized by solid-phase synthesis starting from Agilent Amphisphere 40 RAM resin using Fmoc chemistry, HATU/DIEA system for coupling and piperidine/DMF for deprotection. The aspartyl residue at position 3 was introduced as Fmoc-Asp[NH-(CH₂)₇-CH₃]-COOH which was prepared in solution. For ¹⁴N amino acids, a double coupling with 5 equivalents of reagents during 10 min was used for each step, with the exception of Fmoc-Arg¹²(Pbf)-OH and Fmoc-Asp³(NHC₈)-OH which were coupled twice for 30 min. For ¹⁵N amino acids, a single coupling with two equivalents of reagents during two hours was used, with the exception of Fmoc-Ser⁶(tBu)-OH and Fmoc-Val¹³-OH that were coupled overnight. The final deprotection was performed with a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) mixture for 3 hours and the peptides purified by RP-HPLC. The latter was run on a Gilson PLC 2250 purification system instrument using a preparative column (Waters DeltaPak C18 Radial-Pak Cartridge, 100 Å, 40-100 mm, 15 µm particle size, flow rate 50.0 mL/min). Buffer A was 0.1% TFA in water, and buffer B was 0.1% TFA in acetonitrile. Identity and purity of the peptides were evaluated by mass spectrometry (Figs. S13-15). The LC/MS system consisted of a HPLC-micromassZQ (Waters) or UPLC Acquity H-Class (Waters) coupled to a Synapt G2-S (Waters) equipped with an ESI source. Analyses were carried out using a Phenomenex Kinetex column (C18, 100 Å, 100 x 2.1 mm, 2.6 µm). A flow rate of 0.5 mL/min and a gradient of 0-100% B in 5 min were used: eluent A, water/0.1% HCO₂H; eluent B, ACN/0.1% HCO₂H. Positive-ion electrospray (ESI+) mass spectra were acquired from 100 to 1500 m/z with a scan time of 0.2 s. Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. MALDI mass spectrometry experiments were operated on the Ultraflex III instrument from Bruker Daltonics. Each sample was analyzed from CHCA or SA matrix deposits, in positive ion mode. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm was operated at a 66.7 Hz frequency with a laser focus of 29 %. Data were acquired with the Flex Control software (version 3.0, Bruker Daltonics). Spectra were integrated with the Flex Analysis software (version 3.3, BrukerDaltonics), the centroid algorithm was used to assign peaks. An acceleration voltage of 25.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 21.95 kV (IS2) and a lense voltage of 9.6 kV. The reflectron mode was used for the ToF analyser (voltages of 26.3 kV and 13.8 kV). The delayed extraction time was 30 ns. Acquisitions were performed using a reflector detector voltage of 1.722 kV. MS data were processed with the Flex Analysis software (version 3.3, Bruker Daltonics). External calibration was performed with commercial peptide mixture (Calibration peptide standard II, protein I, Bruker Daltonics,

Wissembourg, France). Fragmentation experiments were performed under laser induced dissociation (LID) conditions with the LIFT cell voltage parameters set at 19.0 kV (LIFT 1) and 3.7 kV (LIFT 2) for a final acceleration of 29.5 kV (reflector voltage) and a pressure in the LIFT cell around 4×10^{-7} mbar. The precursor ion selector was set manually to the first monoisotopic peak of the molecular ion pattern for all analyses. MS/MS data were processed with the Flex Analysis software (version 3.3, Bruker Daltonics). Mass lists were generated according to the following parameters: SNAP as peak detection algorithm, S/N threshold 3.

GHSR sample preparation and characterization. Wild-type human GHSR was produced and assembled in nanodiscs as previously described (1, 2). Briefly, the receptor was expressed in *E. coli* inclusion bodies (BL21(DE3) strain) as a fusion with the α_5 integrin fragment (1). Perdeuterated receptor was produced by growing bacteria in deuterated M9 minimal medium using the protocol we described for the BLT2 leukotriene B4 receptor (3). GHSR was then purified under denaturing conditions (*i.e.* in the presence of 0.8% SDS) and refolded from its SDS-unfolded state in amphipol A8-35 by precipitating SDS as its potassium salt (1). Amphipol was then exchanged to 0.1% n-dodecyl- β -D-maltoside containing 0.02% cholesteryl hemisuccinate with the receptor immobilized on a Ni-NTA matrix (1, 3). The monomeric receptor was then assembled into lipid nanodiscs composed of POPC/POPG (3:2 molar ratio) initially solubilized in 48 mM sodium cholate and MSP1E3D1(-) (1). A mixture of POPC and POPG was used because it limited aggregation of the receptor-containing nanodiscs (Fig. S16). Besides providing a membrane-like environment that is important for maintaining the functional and structural features of GHSR, nanodiscs are also particularly well suited for solution state NMR experiments because of better receptor stability compared to detergent micelles (1, 4) (Fig. S17). Active receptor fractions were finally purified using affinity chromatography with an immobilized ligand. To this end, the biotinylated version of the JMV2959 antagonist was immobilized on a streptavidin column following the manufacturer instructions. The protein mixture after lipid disc reconstitution was directly loaded on the column and the bound proteins were recovered by washing the column with 0.1 mM of a low affinity antagonist (JMV4101) (1). The latter was finally removed through extensive dialysis and GHSR containing discs were separated from protein aggregates through a size-exclusion chromatography step on a Superdex 200 increase 10/300 GL column (GEHealthcare). Importantly, as stated above, our production procedure involved a final affinity chromatography step with the immobilized JMV2959 antagonist. This step allowed isolation of only the fractions capable of ligand binding that were used in further work. Accordingly, the receptor was fully

functional with regard to ligand binding and G protein activation (Fig. 1). Overall, this indicated that the receptor preparations used in all the NMR experiments described was fully representative of the native receptor, as far as ghrelin binding and Gq activation were considered. This in agreement with our previous reports repeatedly demonstrating that bacterially expressed GHSR displays native-like properties after ligand-affinity purification (1, 2, 5).

Functional assays. GHSR ligand-binding assays were performed by measuring the fluorescence energy transfer signal between the purified receptor labeled with the lumi4-Tb NHS derivative at its N-terminus and full-length ghrelin labeled with dy647 on an additional cysteine at the C-terminal end of the peptide (2, 6). For the stoichiometric titration, a 20 μ M solution of labeled ghrelin (*i.e.* about 30-fold over the K_d value) was titrated with increasing concentrations of GHSR-containing nanodiscs. GTP γ S binding experiments with the purified receptor were carried out using the Bodipy-FL GTP γ S analog (1, 7). Ligand binding and IP1 measurement assays in HEK293-transfected cells were carried out as described (8).

NMR experiments and ghrelin resonance assignment. The peptides were dissolved in a 20 mM perdeuterated MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) pH 6.5, 100 mM KCl, 100 μ M DSS (2,2 dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid), 10 % v/v $^2\text{H}_2\text{O}$ buffer (NMR buffer). The buffer after GHSR purification (25 mM Na-HEPES, 150 mM KCl, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) was exchanged for the NMR buffer using dilution-concentration cycles with a 10 kDa cutoff spin filter. Independent samples with the orthosteric competitor JMV5327 were prepared by incubating GHSR nanodiscs with a 10-fold molar excess of the ligand for 24 hours prior to buffer exchange. Experiments on GHSR-bound octanoylated ghrelin were carried out with a 0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio. 2.06 μ M perdeuterated GHSR and 1.37 mM ^{15}N -FLV peptide were used to record 1D ^1H , 2D ^1H - ^1H TOCSY and 2D ^1H - ^1H NOESY with 25, 50, 100, 200 and 500 ms mixing time. 1.73 μ M perdeuterated receptor and 1.15 mM ^{15}N -SFLEQV peptide were used to record 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC, 2D ^1H - ^{15}N HSQC with variable ^{15}N transverse relaxation delay from 0 to 170 ms under 900 μ s inter-pulse delay spin-echo CPMG for ^{15}N transverse relaxation rate (^{15}N R_2) measurement (performed in constant time to avoid sample heating inhomogeneity) and 3D ^1H - ^1H - ^{15}N NOESY-HMQC with 50, 100, 200 and 500 ms mixing time. In the case of 3D NOESY spectra, an additional 25 ms (with respect to 1,000 ms) mixing time was used for the sample without competitor (with respect to the sample with JMV5327). 2D ^1H - ^{15}N STD-HSQC and 1D ^1H STD experiments were recorded on samples with 2.06 μ M protonated receptor and 1.37 mM ^{15}N -SFLEQV peptide with 86 Hz irradiation

during 3 s at -1.5 ppm for on-resonance spectra and 30 ppm for off-resonance spectra. ^1H resonances were assigned from NOESY and TOCSY experiments, and then ^{15}N resonances were derived from amide ^1H resonances and ^1H - ^{15}N spectra (assigned chemical shifts deposited on the BMRB, accession code **34303**). For non-acylated ghrelin, 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC, ^{15}N R_2 measurement and 2D ^1H - ^1H NOESY with 100 and 300 ms mixing time spectra were acquired on samples with 2.06 μM deuterated receptor and 1.37 mM peptide (0.0015 GHSR-to-ghrelin molar ratio sample) or with 5.69 μM deuterated receptor and 566 μM peptide (0.01 GHSR-to-ghrelin molar ratio sample). For ghrelin and non-acylated ghrelin without GHSR, samples with respectively 1.15 mM or 1.37 mM peptide were used to record 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC and ^{15}N R_2 measurements. For free ghrelin in solution, the H9 side-chain pKa was determined to be equal to 6.31 ± 0.08 by pH titration (pH 5.0 to 7.9) of the H9 $\text{H}_{\delta 2}$ resonance in 20 mM deuterated MES, 100 mM KCl, 100 μM DSS, 10 % v/v $^2\text{H}_2\text{O}$ (Fig. S18). Using fully deuterated buffer, pH* titration (pH* stands for apparent pH in a deuterated buffer) was used to determine pKa* 6.43 ± 0.04 for H9 side-chain from H9- $\text{H}_{\delta 2}$ and H9- $\text{H}_{\epsilon 1}$ resonances and pKa* 8.42 ± 0.04 for ghrelin N-terminal from G1- H_{α} resonance. As we observe pKa* - pKa = 0.12 for H9 side-chain (due to deuterium effect on pH measurement), we estimated pKa ~ 8.2 for ghrelin N-terminal according to Rubison (9). Table S4 gives a summary of the most important spectra, which can be downloaded at <http://cribligand.ipbs.fr/ghrelin-spectra.htm>.

^{15}N relaxation, trNOE, and STD analyses. The strategy used in the work is the same as the one used in (10) and was described in details in this publication. Briefly, it is based on the existence of a fast exchange between the peptide ligand free and bound states. “Fast” here means fast on the chemical shift time scale, *i.e.* an off rate higher than 100 s^{-1} (as seen by the linear variation of the chemical shifts with the bound fraction). Under these conditions, both ^{15}N relaxation rates and ^1H - ^1H cross relaxation rates (NOEs and STDs) are weighted averages of the respective rates in the bound and free states. Due to its longer correlation time, the contribution of the bound state dominates, although it represents only 0.0015 of the total population of peptide. The contribution of the free state (and of non-specific binding to the receptor surface or to the nanodiscs) is nevertheless not negligible, and is subtracted by measuring a second set of experiments in the presence of a high-affinity competitive ligand (JMV5327) which prevents ghrelin from accessing its orthosteric binding site on GHSR (see Fig. S17).

It can be shown that: $R_{2s} = R_2 - R_{2ns} = k \cdot (0.5d^2 + (1/6)c^2) \cdot x_b \cdot \tau_c \cdot S^2$, where R_2 and R_{2ns} are the ^{15}N relaxation rates without and with JMV5327 respectively, d and c are the dipolar and

chemical shift anisotropy constants, x_b is the peptide bound fraction (0.0015), τ_c is the correlation time characterizing the reorientation time scale of the peptide-receptor-nanodisc complex, and S^2 is the order parameter of the NH bond vector, a number which quantifies the amplitudes of internal motion of the various NHs. The comparison of R_{2s} among the peptide sequence is thus a direct comparison of their amplitude of motion. It is thus a very direct reporter of the peptide conformational flexibility in the receptor-bound state.

Transferred NOEs follow similar rules, the ^1H - ^1H cross relaxation rates in the bound state being measured by subtracting the NOE rates with and without JMV5327. NOE build-up curves for every pair of protons giving a cross peak in the NOESY experiments were fitted by a biexponential function, and as illustrated in Fig. S2. The differences of initial build-up rates determined without and with JMV5327 were then used as the input for the structure calculation protocol as described below.

^{15}N relaxation rates R_{2s} , NOEs and STDs (saturation transfer differences) are all reporters of intramolecular motions in the bound state, but in slightly different ways: ^{15}N relaxation is dominated by the dipolar coupling between a ^{15}N nucleus and the nucleus of the covalently linked proton. The ^{15}N - ^1H distance involved is thus constant over time, so that R_{2s} purely depends on the ^{15}N - ^1H amplitude of motion in the bound state (given by S^2). ^1H - ^1H cross relaxation rates extracted from trNOEs depend both on the ^1H - ^1H distances and on the internuclear vector dynamics. They should thus be used with great caution for parts of the peptide that remain flexible in the bound state (which was done in this work, see next paragraph). STDs are also based on dipolar couplings between a receptor and a peptide proton. Therefore, they depend both on peptide to receptor distances in the bound state and on the dynamics of these internuclear vectors. Therefore, we expect weaker STDs for peptide protons that are on a flexible part of the peptide (as shown in Fig. 4).

^1H NOE data analysis and structure determination of GHSR-bound ghrelin. NMR distance restraints were obtained from the analyses of NOE build-up curves (Fig. S2). According to the isolated spin pair approximation (11), these curves were obtained by fitting data with $I(\tau_m) = a \cdot \exp[-(\rho - \sigma)\tau_m] \cdot [1 - \exp(-2\sigma\tau_m)]$, where $I(\tau_m)$ is NOESY cross peak integral at mixing time τ_m , a is an amplitude factor, ρ is the self-relaxation rate and σ is the cross-relaxation rate between the two protons. Poor quality and ambiguous signals were rejected. NOE build-up curves with and without competitor were fitted to obtain the difference of σ rates, $\Delta\sigma$, which refers to cross relaxation rate in the bound state. Interatomic distances in

the bound state were derived from $\Delta\sigma$ by taking the intra-residue αN_i signals as reference (reference distance set to 2.75 Å). Then, ^1H - ^1H NOE signals were classified in several groups to produce distance restraints for structure calculation as “flat bottom” energy potentials. The lower distance limit was 1.8 Å for every restraint. For inter-residue αN restraints, the upper limit was 2.5, 3.0 or 4.0 Å based on $\Delta\sigma$ -derived distance estimation. For other restraints, the upper limit was 5 Å. When a methyl group was involved, the upper limit was increased by 1 Å and the restraint was applied to the carbon atom. Structure calculation was performed by simulated annealing-coupled molecular dynamics simulations under the NMR-derived distance restraints using AMBER14 force-field (12). In addition, amino-acid residues chirality and peptide bond ω dihedral angles restraints have been used. 1,000 equivalent simulations were performed from an extended peptide structure neutralized by chloride ions in a water periodic box. The systems were subjected to an initial minimization step, and then a 150 ps molecular dynamics run in several stages of variable temperature and restraints ponderation. The temperature was first increased to 1,000 K within 10 ps, then kept at 1,000 K during 40 ps, and finally slowly decreased to 300 K within 50 ps then to 100 K within the last 50 ps. The restraint ponderation (*i.e.* the weight given to restraints with respect to other terms in the force field) was increased from 1% to 5% within the first 10 ps, then from 5% to 20% within 10 ps, 20% to 100% within 20 ps and kept at 100% for the last 110 ps. After the simulated annealing stages, the systems were minimized again and the ghrelin structures from 1,000 calculations were ranked by residual restraints violations. The structure ensemble was refined through an iterative process by distance restraints modification based on results of the structure calculations, corresponding restraints violations and backward analysis of NMR data. Backbone restraints were examined and some of them were relaxed to 3.0, 4.0 or 5.0 Å upper limit. For equivalent protons and stereo-chemically inequivalent protons bound to the same carbon, constraints were initially applied to both protons. Stereospecific restraints were selected within the initial restraints set from structure-based stereospecific assignment performed for some protons in ghrelin rigid part. With regard to F4 aromatic equivalent protons, the initial results led to a first aromatic ring orientation which permitted either to assign the restraint to a specific proton or to a carbon between the two equivalent protons. Concerning the C₈-chain, only NOE signals involving the amide and methyl protons were used as restraints in initial calculations because methylene groups are equivalent. In a second stage of refinement, several NOEs were assigned to specific methylenes based on the first structural ensembles. The influence of H9 imidazole tautomeric and protonation states was tested. As no structural differences were observed, only the ϵ tautomer was chosen to be reported because it is the most probable form in solution in

these conditions, considering that the side-chain pKa is 6.31 ± 0.08 (13). However, we do not exclude that another H9 protonation form is favored when bound to GHSR. The final structure ensemble deposited in the PDB database (PDB code **6H3E**) is composed of 10 structures aligned on atoms of residues D3 to P7. These 10 structures were selected within the 50 best ones in terms of residual restraints violation out of 1,000 calculations. Structures with significant geometric distortions were eliminated as well as structures incompatible with stereospecific assignment of L5 protons. Structures that did not satisfy the observed NOE signals involving C₈-chain methylene groups were also rejected. Order parameters S^2 within the ten NMR structures ensemble have been determined for comparison with ¹⁵N relaxation data. For each conformer's labeled residue, the angle θ between the N-H vector and the mean N-H vector over the ten conformers was calculated. Order parameters were then obtained using $S^2 = \langle (3\cos^2(\theta) - 1)/2 \rangle^2$. As the differences in R_2 (apo minus JMV5327-loaded GHSR) are proportional to bound state ghrelin S^2 in our experimental conditions (10), they have been normalized by their maximal value to be compared with relative order parameters S^2/S^2_{\max} of the NMR structure ensemble (Fig. S4).

Coarse-grained modelling of ghrelin-GHSR complex. GHSR was built by comparative modelling using Modeller v9.20 (14). The Uniprot sequence Q92847 was mapped onto the X-ray structure of the rat Neurotensin Receptor (NTS1) co-crystallized with the neurotensin peptide (PDB id: **4GRV**) (15). This receptor was used as a template as it displays the highest sequence identity with GHSR among all crystallized GPCRs (in the 30% range). The N-terminal part (residues 1 to 29) and the last 28 amino-acids of the C-terminal part of the ghrelin receptor were truncated due to the lack of structural information in the template. The model therefore comprised residues 30 to 308, with a disulfide bridge applied between cysteine residues 116 and 198 (16). The model presenting the best objective function score was then converted to the MARTINI coarse-grained representation (17, 18) using the CHARMM-GUI server (19). We chose the elastic network ElnDyn (20) to maintain the global structure of the receptor during the simulations and set the elastic constants to the default value of $500 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$ with lower and upper cutoffs of 5 Å and 9 Å respectively. The receptor was aligned along its z-axis and inserted into a membrane model composed of palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), as no difference in the ghrelin binding profile was observed for the recombinant receptor in POPC-only or POPC/POPG nanodiscs (Fig. S19). The starting conformation of the ghrelin peptide used in all simulations was taken from the most extended model inferred from NMR data (conformer number 7 in the deposited PDB structure). As

shown by NMR, the C-terminal part of GHSR-bound ghrelin remains flexible; hence, only residues 1 to 12 of the peptide were modeled to reduce the number of degrees of freedom and optimize the exploration of all possible conformations. As for the receptor, the all-atom model of the ghrelin peptide was converted to the MARTINI representation, including the octanoyl chain, which parameters were assigned by analogy with a C₈ lipid chain from the MARTINI forces field. Only two elastic bonds were applied to the peptide allowing it to keep its flexibility and ensure a good sampling of its conformations; these backbone-backbone restraints allowed conservation of the global shape of the bound peptide as described by NMR and involved the residue pairs L5/E8 and S6/H9. Two other elastic bonds were artificially added to our model, in agreement with the NMR data, which kept the octanoyl group in close contact with the peptide main chain. These intra-molecular restraints involved the last bead of the octanoyl group and the residues S6 and H9 of the peptide, respectively (Fig. S12). They were absolutely required as simulations performed with no constraints on the octanoyl chain and a POPC lipid bilayer in the absence of the receptor led to the systematic binding of the peptide to the membrane and to a full insertion of the octanoyl group in the bilayer (see Fig. S5 for the membrane binding properties of the octanoylated ghrelin peptide, in the absence of receptor, with or without these two additional restraints). Under these conditions, the ghrelin peptide would be unable to interact with the binding pocket of the receptor, as the escape from the membrane would be nearly impossible with the used temperature range and simulated period (10 μs for each temperature). For both CG-MD simulation used to refine ghrelin receptor-bound conformation (referred as “intermediate state” model in the Results section) and analysis of CG models NOE violations, 33 restraints were selected out of the set used for NMR structure calculation. This selection consisted in eliminating the restraints between atoms pairs within CG particles or between covalently linked CG particles. For the simulation performed with the non-octanoylated peptide, the octanoylated serine was reverted back to a standard serine with the Pymol software (21) and the same backbone:backbone restraints as those used for the octanoylated peptide were applied. In order to create an extracellular compartment and avoid the interaction between the peptide and the intracellular part of the receptor due to the periodic boundary conditions, a double system comprising two receptors, two peptides and two membranes, was designed. The system moiety comprising the receptor and the membrane was duplicated and rotated by 180° along the z- and x-axes, respectively, and the two peptides were subsequently added into the box in a way they faced the extracellular parts of the two receptors. Not to bias the system, the peptides were randomly positioned at least 20 Å away from any of the two receptors and between each other. The double system was finally solvated and

neutralized by addition of 22 chloride ions. Replica Exchange Molecular Dynamics (REMD) were run within the GROMACS simulation software version 5.1.2 (22). The full protocol has already been described in detail and validated in previous studies for two different peptide:receptor complexes (23). Briefly, three independent REMD simulations of the system with the octanoylated ghrelin were run at 50 different temperatures ranging from 300K to 450K (using an increment of 3K), each lasting with 10 μ s (for a total of 500 μ s). Using such a temperature scheme, we showed a good convergence of the obtained data after analysis, and an exchange ratio between adjacent replica of about 0.15, a value proposed to be optimal (24). Following the same protocol, an additional simulation where the ghrelin peptide was non-octanoylated was run for 8.5 μ s at each temperature (for a total simulation time of 425 μ s). In all cases, the metropolis criterion used for the replica exchange was tested every 1,000 steps (20 ps). All replicas were heated and equilibrated at their respective temperature, first in the NVT and then in the NPT ensembles. We used an integration step of 20 fs and truncated the non-bonded interactions at 12 Å, following the MARTINI standard protocol. Temperature was coupled to the system with the velocity rescale thermostat, and the Berendsen barostat was used for pressure control in NPT simulations. The conformational clustering was performed using the Gromacs package 5.1.2. We used the default gromos method with a RMSD threshold of 3.5 Å. The RMSD was computed only on the first fifth residues of ghrelin including both main-chain and side-chain beads. Prior the clustering, all the conformations extracted from the trajectories (including all temperatures) were aligned on the receptor binding pocket defined by residues 99,103, 106, 107, 109, 111, 116, 119, 120, 123, 124, 179, 184, 190, 197, 198, 199, 200, 213, 222, 279, 283, 286, 287, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 298, 301, 302, 305, 306, 309 and 313. With regard to the analysis of ghrelin contacts within the receptor, strong and mild interactions were considered if the mean distance + 1 standard deviation was lower than 6.0 Å and 8.0 Å respectively. It is important to note that the radius of regular CG beads is about 2.6 Å, thus a very close contact would be expected around 5.0 Å.

NOE used as restraints in structure calculation*

Total number	150
Residues S2-H9	100
Intra-residue	84
Inter-residue*	66
Sequential ($ i-j = 1$)	56
Non-sequential ($ i-j > 1$)	10

Structure ensemble statistics

Residual distance restraints violation	
Mean number of violations $>0.2 \text{ \AA}$ +/-SD	1.0 +/- 0.82
Mean maximal deviation +/-SD (\AA)	0.24 +/- 0.065
Amber energies +/-SD (kcal/mol)	
Total	-183,909 +/- 288
Van der Waals	47,666 +/- 126
Electrostatic	-247,841 +/- 416
Standard deviations from idealized geometry	
Bond lengths (\AA)	0.013
Bond angles ($^\circ$)	2.2
RMSD to the mean coordinates (\AA)*	
Residues 1-2 backbone heavy atoms	0.99
Residues 3-7 backbone heavy atoms	1.22
Residues 8-18 backbone heavy atoms	12.77
Residues 1-2 side-chain heavy atoms	1.94
Residues 3-7 side-chain heavy atoms	1.64
Residues 8-18 side-chain heavy atoms	12.67
C ₈ -chain heavy atoms	1.71
Ramachandran plot statistics (%)**	
Favored	57
Allowed	39
Outliers	4

Table S1. Receptor-bound ghrelin structure statistics. *To reflect the structural information given by NOE contacts with the C₈-chain, the latter is considered as a residue on its own rather than a part of the D3 side-chain. Contacts with F4 are thus considered as non-sequential. **Ramachandran statistics as analyzed by Protein Data Bank validation tool.

	Octanoylated #1	Octanoylated #2	Octanoylated #3	Non-octanoylated
Cluster 1	14.03	14.19	13.75	6.26
Cluster 2	12.28	13.41	13.70	1.78
Cluster 3	7.37	5.62	7.25	2.97
Cluster 5	2.05	2.52	2.26	1.68
Cluster 6	2.00	2.44	2.44	0.15
Cluster 7	1.59	1.47	1.26	0.96
Cluster 8	1.32	3.35	1.83	1.39
Cluster 9	1.30	1.84	1.87	3.51

Table S2. Populations in percentage of the total simulation time of the most populated clusters obtained in the CG-REMD simulations with octanoylated and non-octanoylated ghrelin. For octanoylated ghrelin, three independent simulations were carried out (labeled here #1, #2, #3) to assess for convergence of sampling (see above in the detailed experimental procedures section). Among the ten most populated clusters, eight were systematically retrieved in these three independent simulations and were considered here. Cluster numbering corresponds to that of the first CG-REMD simulation. The “intermediate state”, *i.e.* cluster 6, is highlighted in grey. For non-octanoylated ghrelin, the populations of the most representative conformations were more uniformly distributed. Five of the eight clusters described for the octanoylated peptide were also found among the 10 most populated clusters with the non-acylated peptide. The “intermediate state” (cluster 6) was almost unpopulated for non-octanoylated ghrelin.

Contact	Mean Distance in Å	F _{mut} ghrelin
G1 _{BB} -D99 _{SC} ^{2.60}	6.2 ± 1.5	68 (D99 ^{2.60} K)/3.2 (D99 ^{2.60} N) (25)
G1 _{BB} -Q120 _{SC} ^{3.29}	5.7 ± 0.9	6.5 (Q120 ^{3.29} A) (25) /6.8 (Q120 ^{3.29} A) (26)
G1 _{BB} -S123 _{SC} ^{3.32}	5.6 ± 0.9	0.9 (S123 ^{3.32} A) (25)/2.3 (S123 ^{3.32} A)
G1 _{BB} -E124 _{SC} ^{3.33}	6.3 ± 1.3	250 (E124 ^{3.33} Q) (25)/150 (E124 ^{3.33} Q) (26)
G1 _{BB} -R283 _{SC} ^{6.55}	6.0 ± 1.1	38 (R283 ^{6.55} Q) (25)/55 (R283 ^{6.55} Q) (26)
G1 _{BB} -F309 _{SC} ^{7.39}	6.5 ± 1.4	0.9 (F309 ^{7.39} L) (26)
S2 _{BB} -D99 _{SC} ^{2.60}	5.9 ± 0.8	68 (D99 ^{2.60} K)/3.2 (D99 ^{2.60} N) (25)
S2 _{BB} -W109 _{SC}	5.2 ± 0.4	-
S2 _{SC} -Q120 _{SC} ^{3.29}	6.0 ± 1.6	6.5 (Q120 ^{3.29} A) (25)/6.8 (Q120 ^{3.29} A) (26)
S2 _{BB} -R283 _{SC} ^{6.55}	6.7 ± 1.2	38 (R283 ^{6.55} Q) (25)/55 (R283 ^{6.55} Q) (26)
D3 _{SC} -L103 _{SC} ^{2.64}	5.6 ± 0.7	-
D3 _{BB} -W109 _{SC}	5.0 ± 0.4	-
D3 _{BB} -F286 _{SC} ^{6.58}	5.0 ± 0.5	25 (F286 ^{6.58} A) (26)
D3 _{SC} -Q302 _{SC} ^{7.32}	5.2 ± 0.5	-
D3 _{SC} -N305 _{SC} ^{7.35}	6.0 ± 1.5	8.5 (N305 ^{7.35} A) (25)
F4 _{BB} -W109 _{SC}	5.4 ± 0.8	-
F4 _{BB} -E197 _{SC}	5.2 ± 0.4	1 (E197A), 2 (E197D), 2.5 (E197Q), 6.4 (E197N) (27)
F4 _{BB} -C198 _{BB}	5.2 ± 0.6	-
F4 _{BB} -R199 _{BB}	5.3 ± 0.4	0.7 (R199A), 1.4 (R199L), 2.1 (R199E) (27)
F4 _{SC} -F286 _{SC} ^{6.58}	5.0 ± 0.6	25 (F286 ^{6.58} A) (26)
L5 _{BB} -W109 _{SC}	6.2 ± 0.6	-
L5 _{BB} -E197 _{SC}	5.4 ± 0.6	1 (E197A), 2 (E197D), 2.5 (E197Q), 6.4 (E197N) (27)
S6 _{BB} -R107 _{SC}	6.3 ± 1.1	-
S6 _{BB} -E197 _{SC}	6.4 ± 1.4	1 (E197A), 2 (E197D), 2.5 (E197Q), 6.4 (E197N) (27)
P7 _{SC} -Y106 _{SC} ^{2.67}	6.3 ± 1.6	-
P7 _{SC} -R107 _{SC}	5.4 ± 0.9	-

Table S3. GHSR residues contacting ghrelin in the “bound state” model. The mean and standard deviation of distance between the center of CG-beads are listed together with the effect on ghrelin potency of mutants from the literature. It is important to note that the radius of regular CG beads is about 2.6 Å, thus a very close contact would be expected around 5.0 Å. A two-letter code is used to discriminate between backbone (BB) and side chain (SC) contacts. Superscripts indicate Ballesteros-Weinstein numbering for conserved GPCR residues (28). F_{mut} indicates the fold shift in potency compared to the wild-type receptor, with blue coloring indicating positions for which the mutation results in at least a tenfold decrease in potency. It should be stressed, however, that the effect of mutations on receptor activity is a very complex phenomenon that is not necessarily restricted to the direct impact of the substitutions on receptor:peptide interactions.

Exp. number	NMR spectrum	Sample	GHSR / ghrelin molar ratio	¹⁵ N
1-2	1D ¹ H	1.37 mM ghrelin + 2.06 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	FLV
3-4	2D ¹ H ¹⁵ N SOFAST-HMQC	1.15 mM ghrelin + 1.73 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	SFLEQV
5-7	2D ¹⁵ N R ₂ measurement	1.15 mM ghrelin +/- 1.73 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	SFLEQV
8-17	2D ¹ H ¹ H NOESY	1.37 mM ghrelin + 2.06 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	FLV
18-27	3D ¹ H ¹ H ¹⁵ N NOESY-HMQC	1.15 mM ghrelin + 1.73 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	SFLEQV
28-33	1D ¹ H STD 2D ¹ H ¹⁵ N STD- HSQC	1.37 mM ghrelin + 2.06 μM GHSR +/- JMV5327	0.0015	SFLEQV
34-36	2D ¹⁵ N R ₂ measurement	1.37 mM unacylated ghrelin + 2.06 μM GHSR 566 μM unacylated ghrelin + 5.69 μM GHSR 1.37 mM unacylated ghrelin	0.0015 0.01 0	SFLV
37-40	2D ¹ H ¹ H NOESY	1.37 mM unacylated ghrelin + 2.06 μM GHSR 566 μM unacylated ghrelin + 5.69 μM GHSR	0.0015 0.01	SFLV

Table S4. Summary of the most important NMR spectra acquired within this work. All these spectra are available in a Bruker format and can be downloaded from the link:<http://cribligand.ipbs.fr/ghrelin-spectra.htm>. They can be processed directly within topspin 3.5 or higher.

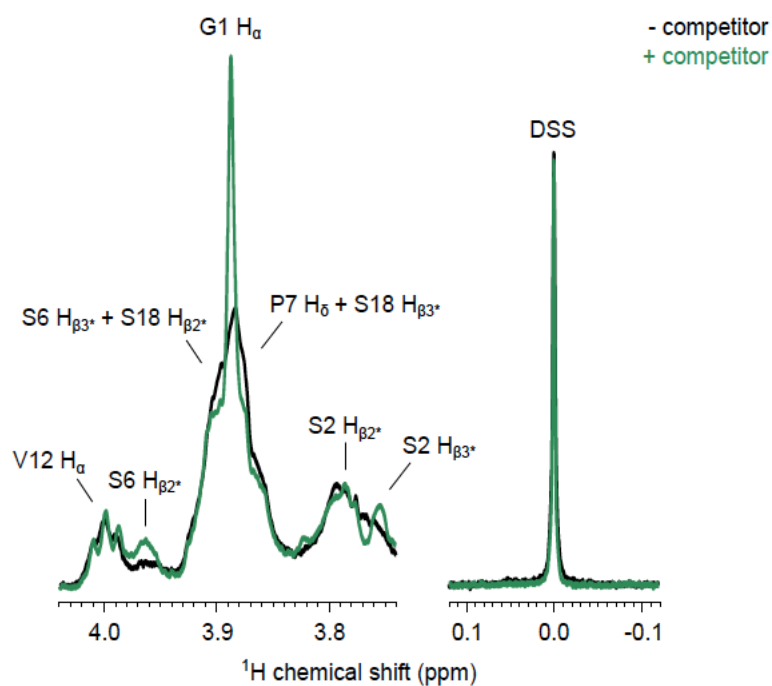


Figure S1. Ghrelin structural dynamics in the bound state. Zoom in the G1 region of the 1D ¹H spectrum of ghrelin in presence of GHSR-containing nanodiscs and in the absence (black curves) or presence (green curves) of JMV5327 (competitor). Note the specific line broadening of G1-H_α, S6-H_β and S2-H_β, compared for instance with V12-H_α and the DSS reference.

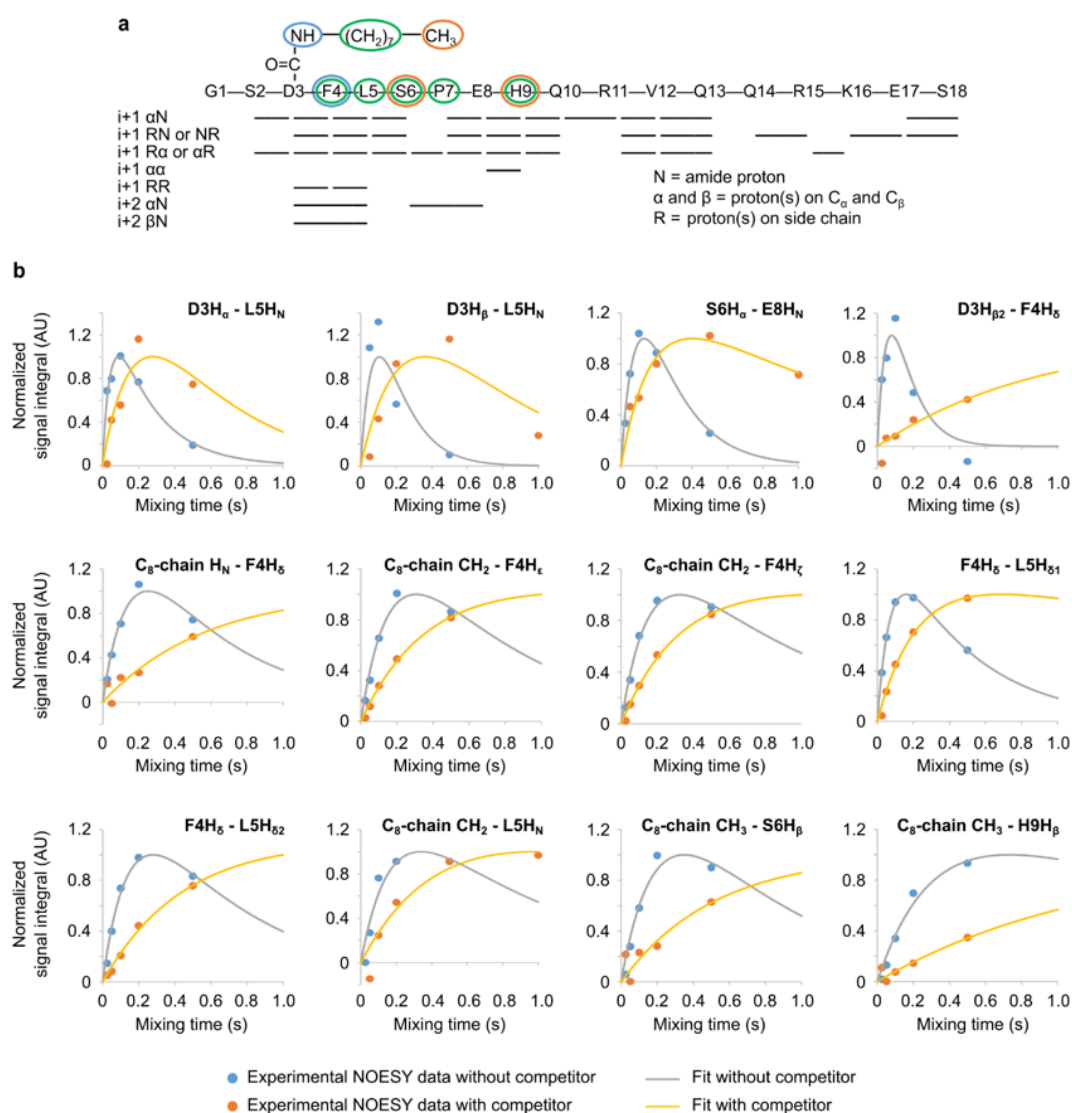


Figure S2. NOESY data of ghrelin in interaction with GHSR. (a) Mapping of spatial proximities (distances less than 5 to 6 Å) in ghrelin 1-18 structure when bound to GHSR as observed in NOESY experiments. trNOEs along the peptide sequence are shown as lines and the ones between the peptide and the C₈-chain are color-coded. (b) Build-up curves of some NOEs important for solving the receptor-bound ghrelin structure. Points are experimental data acquired from NOESY signals integration and lines are the function obtained by bi-exponential fitting with $I(\tau_m) = a \cdot \exp(-(\rho + \sigma) \cdot \tau_m) \cdot (1 - \exp(-2\sigma\tau_m))$ (11). Data for the samples without and with JMV5327 are represented after normalization by the bi-exponential function maximum for each sample. The structural information is given by the difference in cross-relaxation constants $\Delta\sigma$ (Hz) between the two samples, σ (Hz) corresponding to the bi-exponential function growing rate.

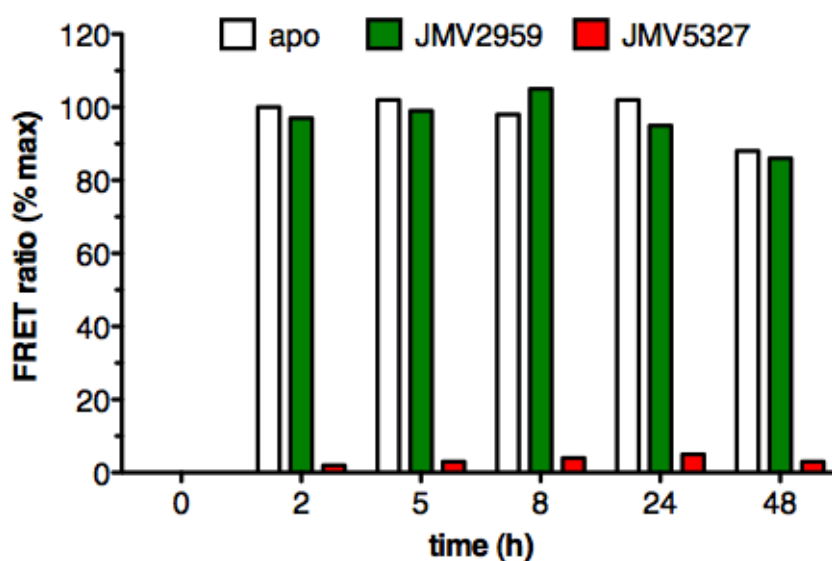


Figure S3. Ghrelin binding to GHSR in the presence of orthosteric synthetic ligands. Competition between ghrelin 1-18 and either JMV2959 or JMV5327 for binding GHSR-containing nanodiscs. Both JMV compounds are triazole-based non-peptide compounds (29, 30). Although it is not used in the NMR experiments, the reference GHSR antagonist JMV2959 is presented to illustrate the advantage of using a slow-dissociating ligand such as JMV5327 to prevent peptide binding over the length of the NMR experiments. Binding of ghrelin was monitored through the FRET signal between C-terminally dy647-labeled ghrelin and JMV-loaded GHSR labeled with Lumi-4 Tb at its N-terminus (2), with a GHSR-to-ghrelin molar ratio of 0.0015.

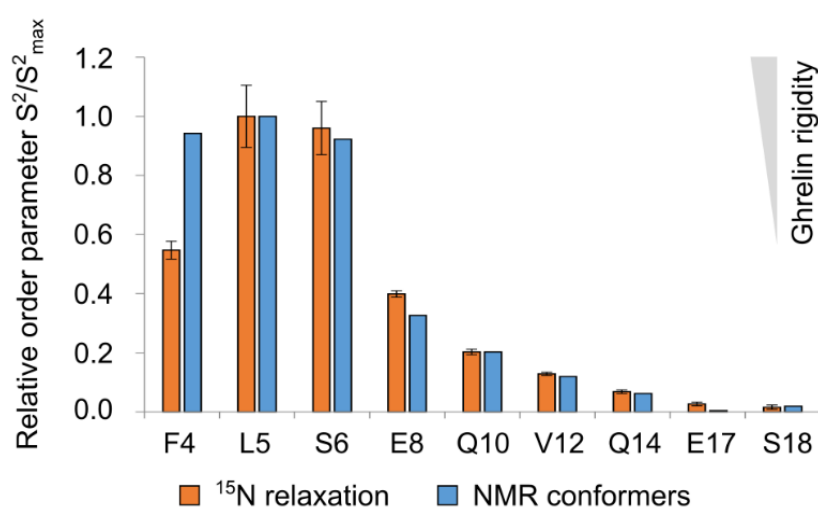


Figure S4. Comparison of ¹⁵N relaxation-derived relative order parameters with the NMR structure ensemble. Relative order parameters S^2/S^2_{\max} of receptor-bound ghrelin NH groups determined from ¹⁵N R_2 relaxation rates are shown in orange. As described in the detailed experimental procedures section (paragraph “¹H NOE data analysis and structure determination of GHSR-bound ghrelin”), ¹⁵N R_2 relaxation rates have been normalized to L5 rate to be compared with S^2/S^2_{\max} calculated from the NMR structural ensemble (in blue) deposited in the PDB (**6H3E**) and shown in [Fig. 3](#).

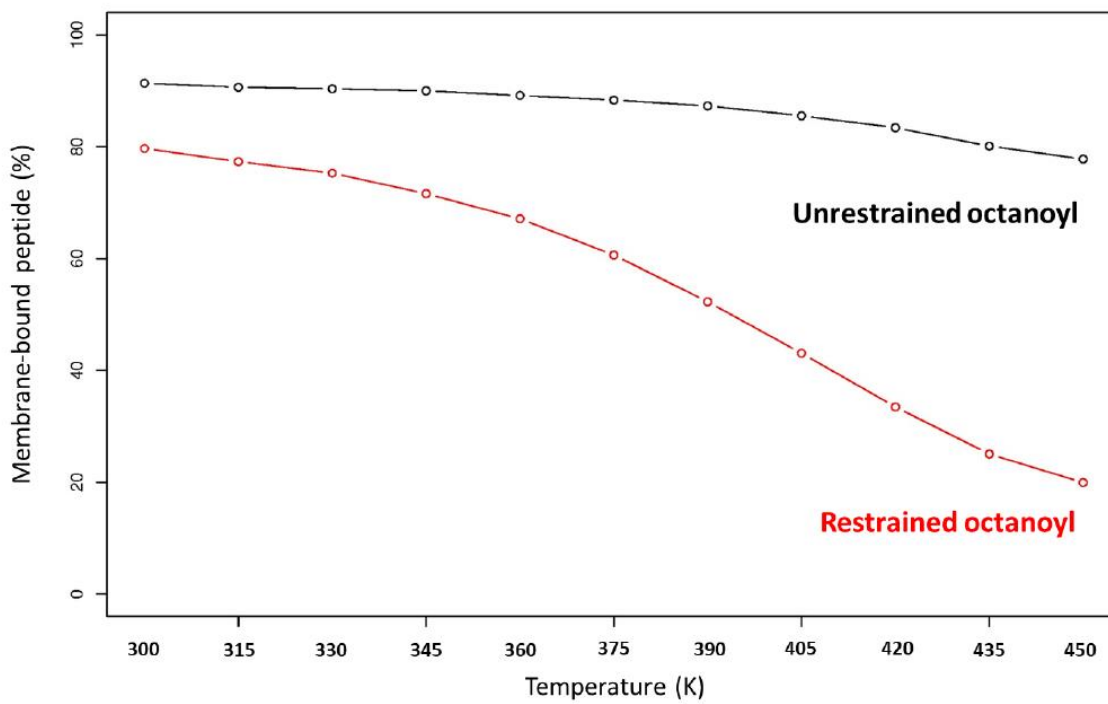


Figure S5. Binding of octanoylated ghrelin to a POPC membrane model as a function of the temperature. These CG-REMD simulations were performed in the absence of the receptor with (red) or without (black) applying the two elastic bonds that maintain the octanoyl group along the peptide main chain (see Fig. S12). Each point results from the analysis of 50,000 snapshots. For each snapshot, the peptide was considered as bound to the membrane when the octanoyl group established at least five contacts with the aliphatic chains of surrounding lipids. Restraining the acyl chain along the peptide, as observed in the NMR structure, reduces its tendency to stay in the lipid membrane. Hence, the CG-REMD simulations were performed with these constraints in order to increase the probability of receptor binding over reasonably short time scales.

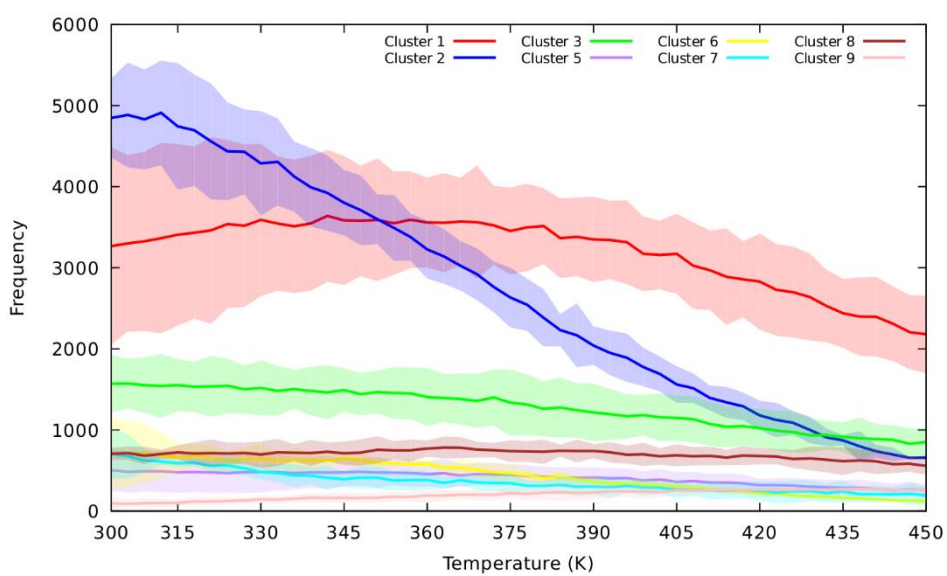


Figure S6. Cluster population as a function of temperature. The means over the three independent simulations are represented as colored lines, the transparent areas represent the standard deviations for each curve. Only the 8 clusters common to the three independent simulations were considered and are represented. Cluster numbering corresponds to that of the first CG-REMD simulation.

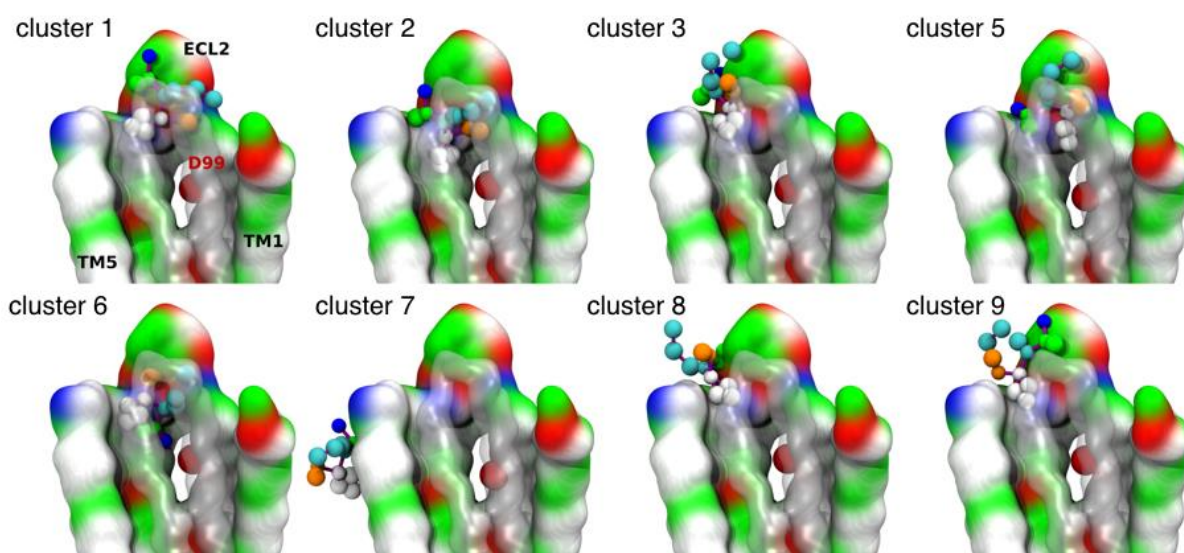


Figure S7. Representation of the representative structures of the 8 clusters retrieved in the three CG-REMD simulations of ghrelin after alignment on the receptor pocket. The receptor backbone is represented as a colored surface, the colors corresponding to the physical and chemical properties of the amino-acids (white: hydrophobic, green: polar, red: negatively charged and blue: positively charged). The backbone of TM helices 6 and 7 and ECL3 was drawn as a transparent white surface. D99^{2,60} side chain close to the receptor binding pocket is given as a reference and represented as a red ball. The first 5 N-terminal residues of the octanoylated ghrelin are represented as colored balls and sticks (G1: blue, S2: green, D3: cyan, F4: white and L5: orange). Bonds between CG-beads were represented as purple. Only the 8 clusters common to the three independent simulations were considered and are represented. Cluster numbering corresponds to that of the first CG-REMD simulation. Cluster 6 corresponds to the “intermediate state” (see text).

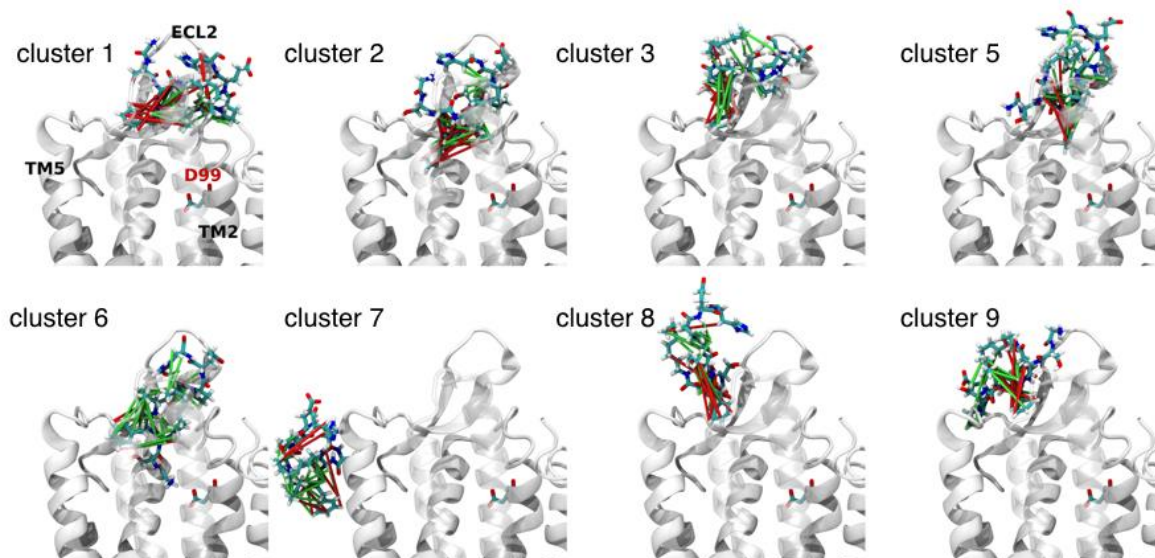


Figure S8. Representation of the NOE violations after backward mapping of the 8 representative conformations retrieved in the three CG-REMD simulations. The receptor is represented as white cartoon, ghrelin is represented as sticks and colored by atom type. TM helices 6 and 7 are put as transparent white. For the sake of clarity, only residues 1 to 9 of ghrelin are represented. The green and red lines between atom pairs represent non-violation and violation of NOE restraints, respectively. Cluster 6 corresponds to the “intermediate state” (see text) that gives significantly less violations than the other clusters, meaning it is in better agreement with the NMR structures than the other ones. Only the 8 clusters common to the three independent simulations were considered and are represented. Cluster numbering corresponds to that of the first CG-REMD simulation. Cluster 6 corresponds to the “intermediate state” (see text).

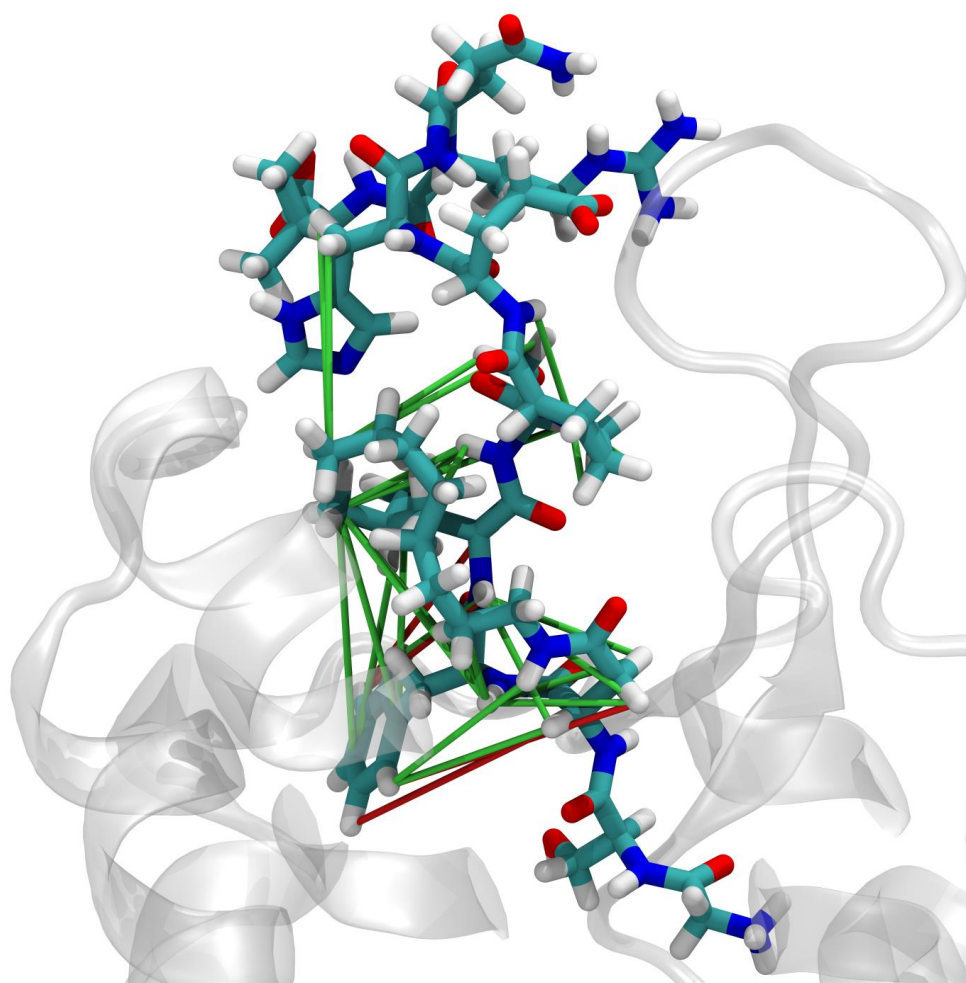


Figure S9. Close view of the NOE restraint violations after backward mapping of the representative conformation retrieved in the three CG-REMD simulations for the “intermediate state” (cluster 6). The receptor is represented as white cartoon, while ghrelin is represented as sticks and colored by atom type. TM helices 6 and 7 are represented in transparent white. For clarity, only residues 1 to 9 of ghrelin are represented. The green and red lines between atom pairs represent non-violation and violation of NOE restraints, respectively. The four distances violated all involve F4 that is shifted towards the bottom of the receptor binding pocket, away from D3 and L5. Consistently, this state does not report on two NOE contacts that were observed by NMR between the F4 aromatic ring and the C₈-chain methylene groups.

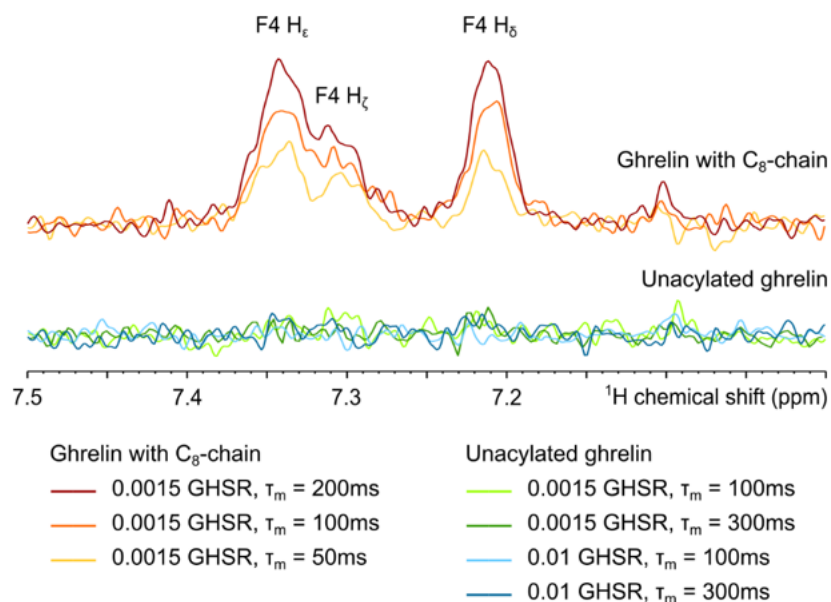


Figure S10. Ghrelin L5H_{δ2}–F4 aromatic NOE contacts. NOESY slice of ghrelin spectra at L5H_{δ2} chemical shift (0.866 ppm) (aromatic region). In presence of GHSR at 0.0015 receptor-to-ghrelin molar ratio, acylated ghrelin spectra display NOE contacts for F4H_ε-L5H_{δ2}, F4H_ζ-L5H_{δ2} and F4H_δ-L5H_{δ2}. These contacts are characteristic of ghrelin hydrophobic core formed by F4, L5 and the C₈-chain. Signals evolve with the mixing time (τ_m) as illustrated by build-up curves in Fig. S2 where the F4H_δ-L5H_{δ2} one is shown. In the presence of either 0.0015 or 0.01 GHSR, non-acylated ghrelin spectra do not show any NOE signal for F4H_ε-L5H_{δ2}, F4H_ζ-L5H_{δ2} and F4H_δ-L5H_{δ2}.

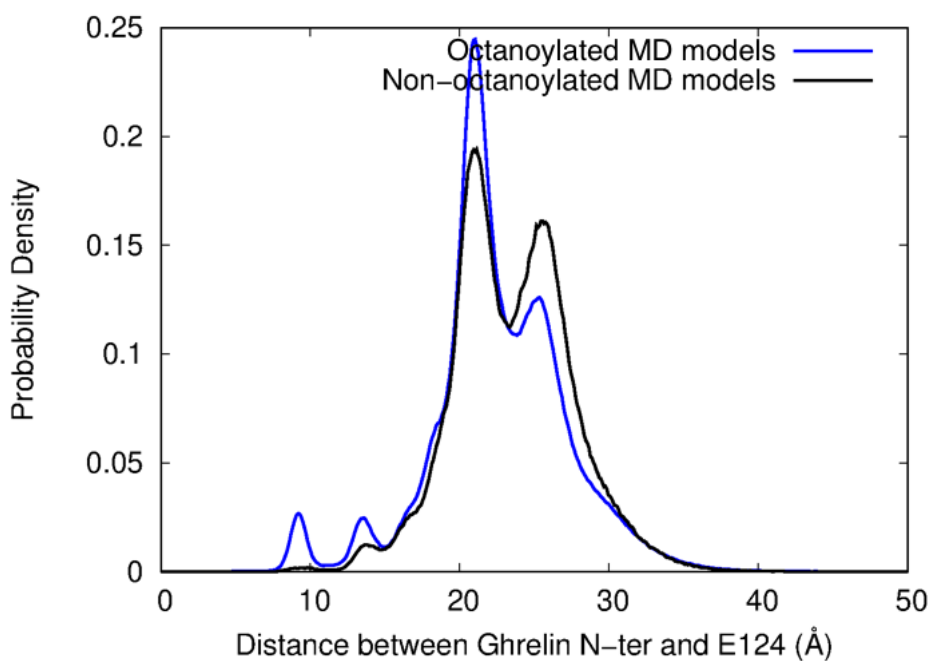


Figure S11. Non-acylated ghrelin binding. Full view of the probability densities of the distance between ghrelin N-terminus and the side chain bead of E124^{3.33} in the receptor binding pocket for the ghrelin models with (blue) and without the acyl chain (black). Note that acylation shifts the ensemble of poses toward the GHSR binding pocket, and promotes the existence of poses with a distance lower than 10 Å.

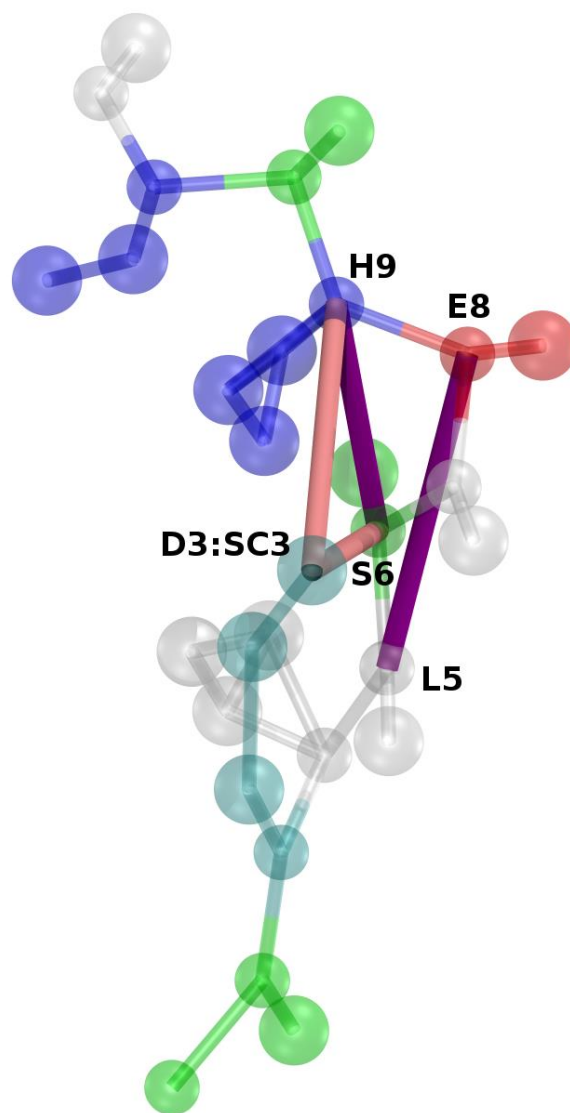


Figure S12. Representation of the four ghrelin restraints added during the CG-REMD simulations. The two rubbers used to maintain the peptide backbone are represented as purple sticks. The two additional restraints which keep the acyl chain in close contact with the ghrelin backbone are represented as pink sticks. Ghrelin itself is represented as balls and sticks and is colored according to the physical and chemical properties of the amino-acids (cyan: octanoylated aspartate, white: hydrophobic, green: polar, red: negatively charged and blue: positively charged).

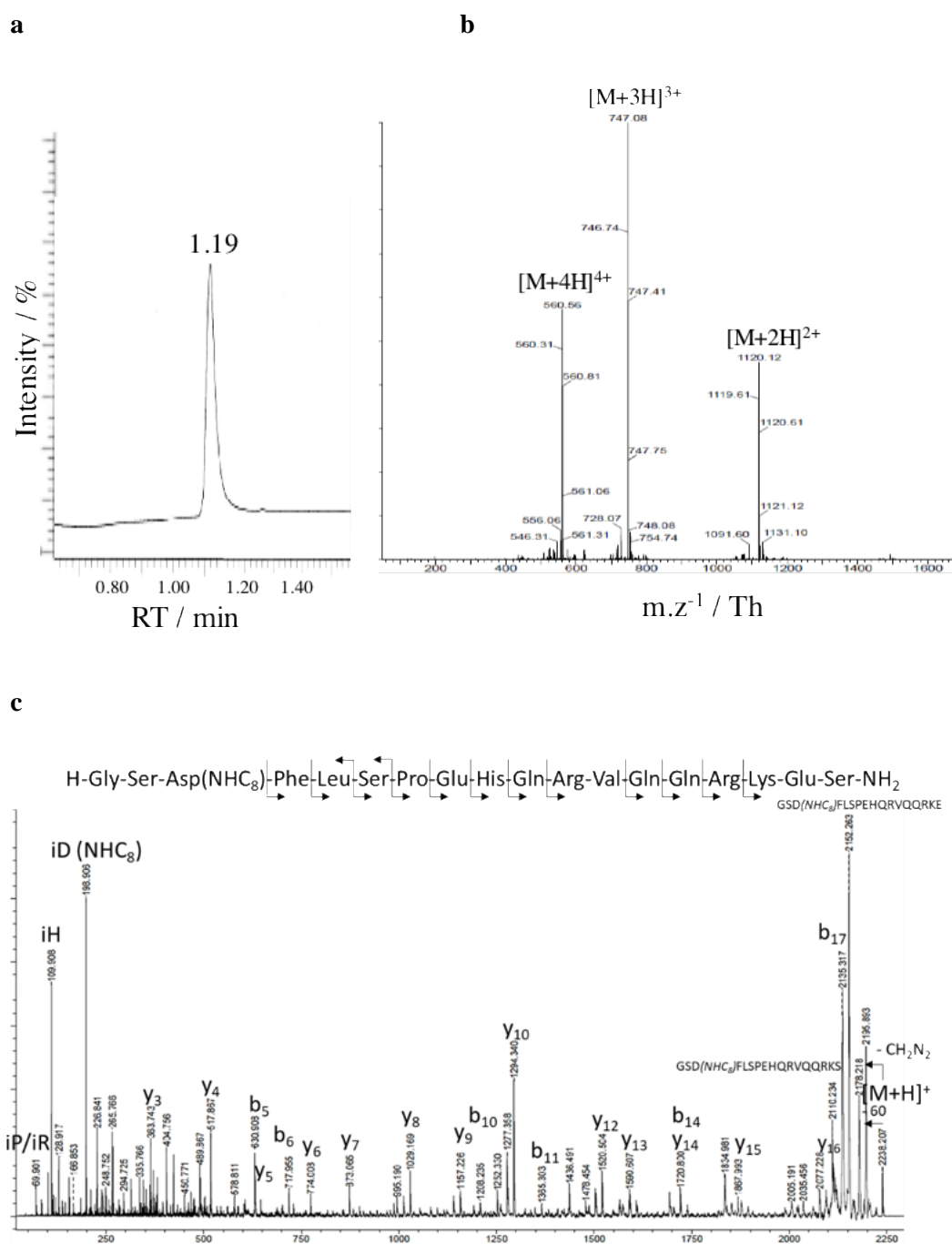


Figure S13. Synthetic acylated ghrelin (1-18) characterization. (a) Preparative RP-HPLC (retention time in min. of the peak is indicated), (b) LC/MS and (c) MALDI MS-MS profiles of synthetic ghrelin 1-18.

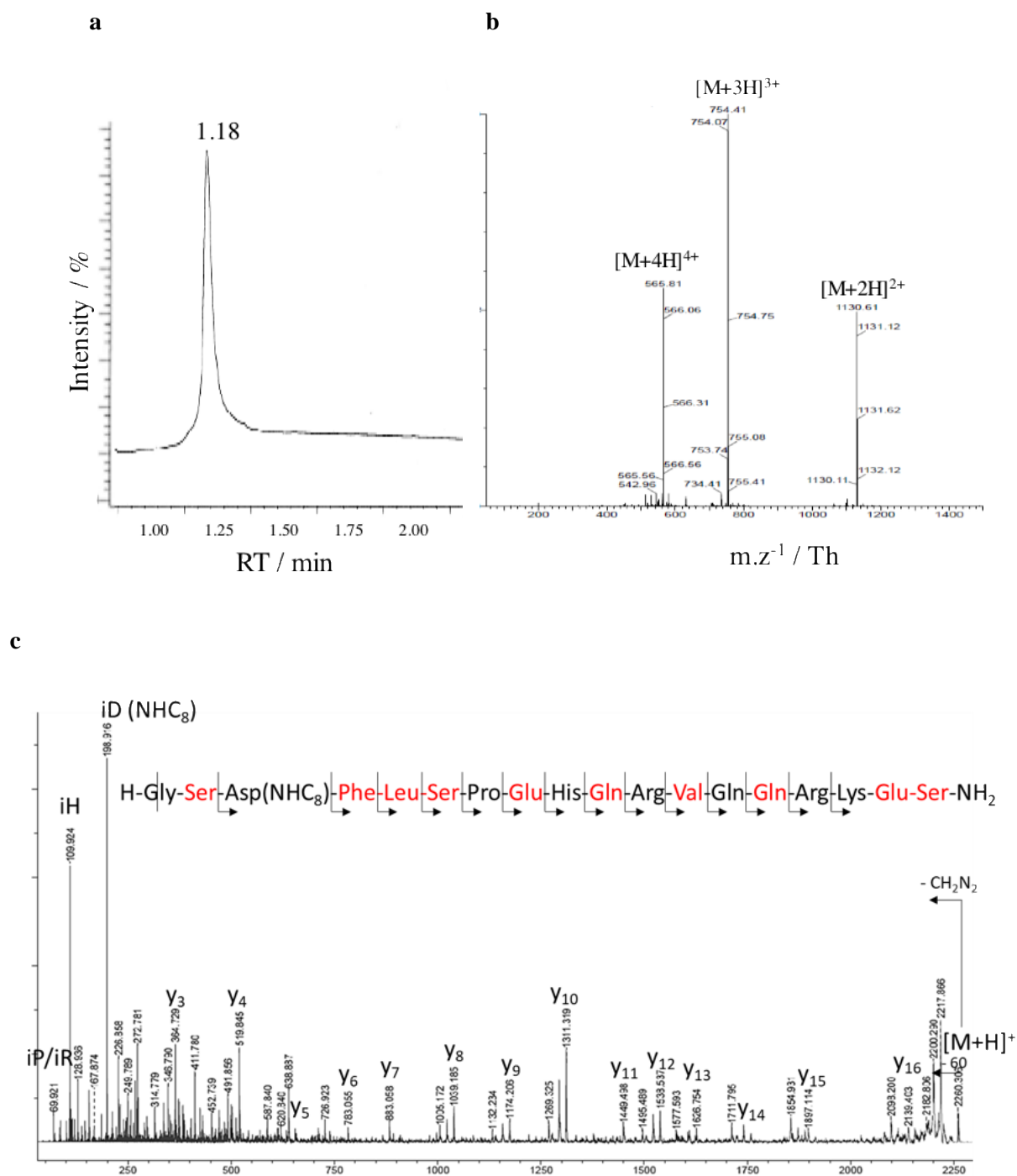


Figure S14. Synthetic acylated ¹⁵N-labeled ghrelin (1-18) characterization. (a) Preparative RP-HPLC, (retention time in min. indicated), (b) LC/MS and (c) MALDI MS-MS profiles of synthetic ¹⁵N-labeled ghrelin 1-18 (labeled residues indicated in red in (c)).

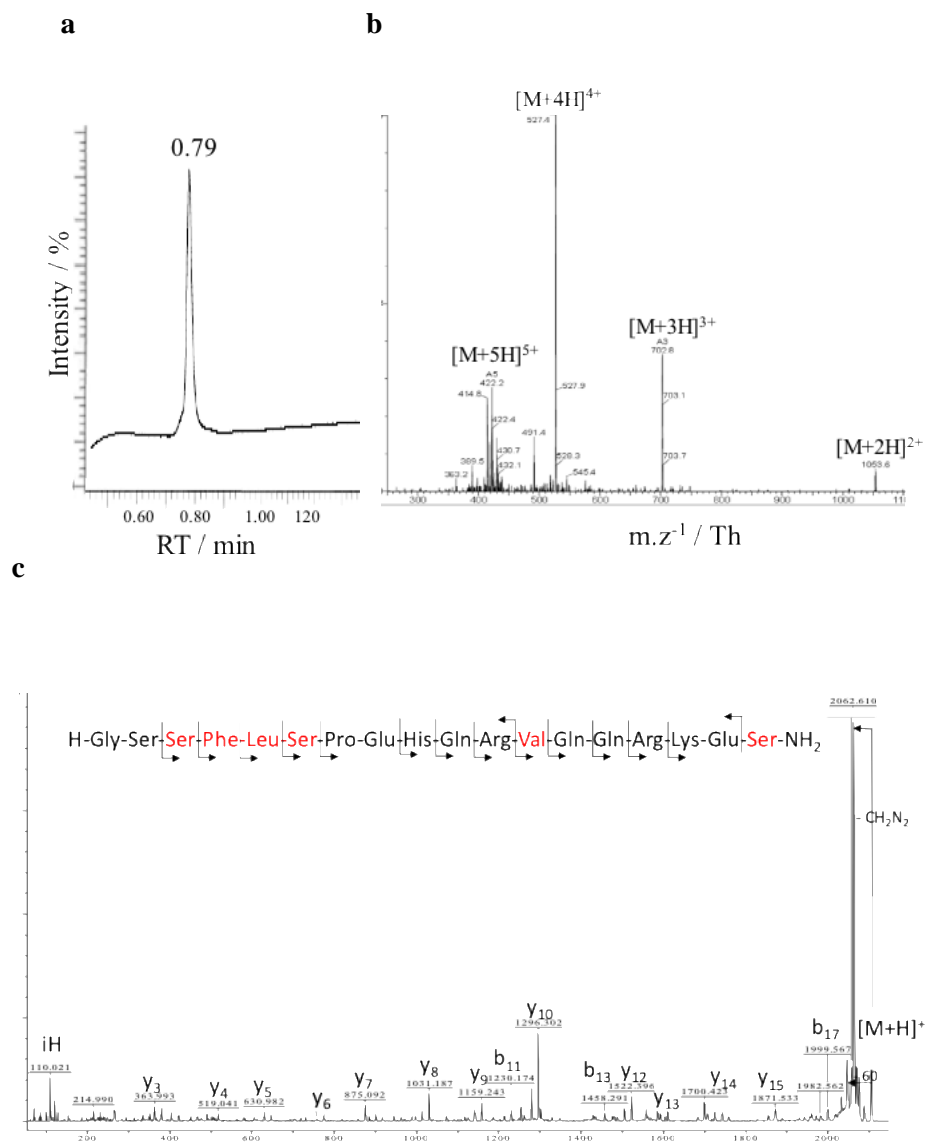


Figure S15. Synthetic non-acylated ghrelin (1-18) characterization. (a) Preparative RP-HPLC (retention time in min. indicated), (b) LC/MS and (c) MALDI MS-MS profiles of ¹⁵N-labeled non acylated ghrelin 1-18 (labeled residues indicated in red in (c)).

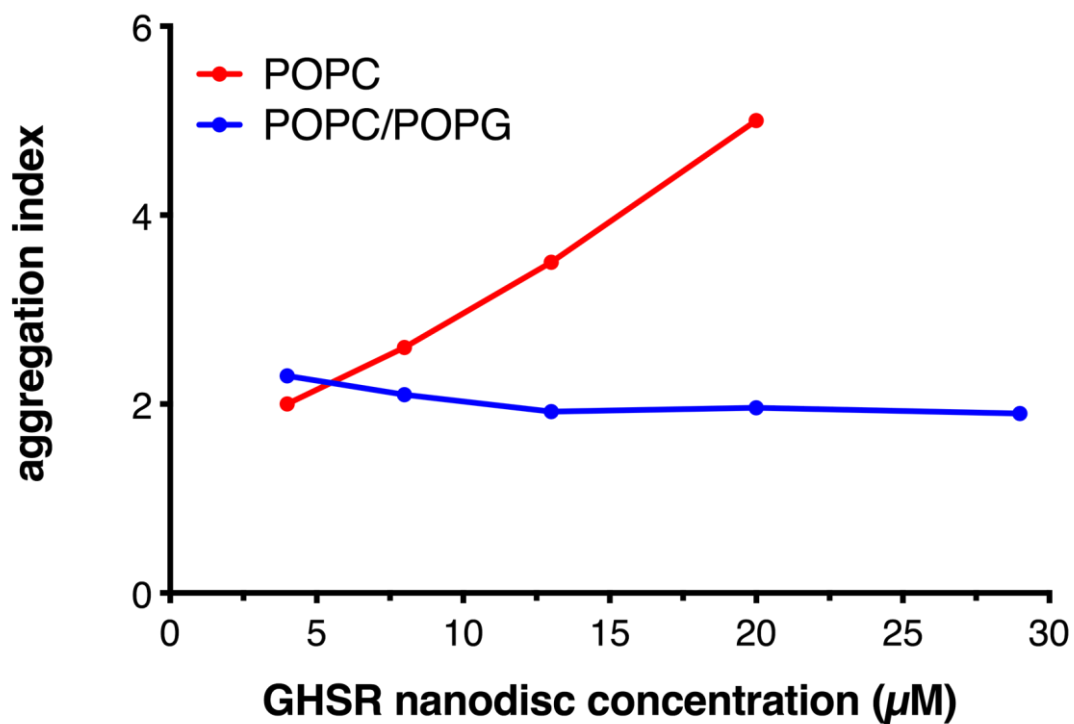


Figure S16. Impact of the lipid composition on the aggregation of GHSR-containing nanodiscs. Aggregation index of GHSR-nanodiscs formed of only POPC or of a mixture of POPC and POPG (3:2 molar ratio) as a function of the nanodisc concentration. Aggregation was monitored with light scattering using a spectrofluorimeter (Cary Eclipse, Varian). The aggregation index is the ratio of the intensity measured at 280 nm (light scattering, due to aggregation) to that measured at 340 nm (Trp emission, related to total receptor concentration), both with an excitation set at 280 nm (31).

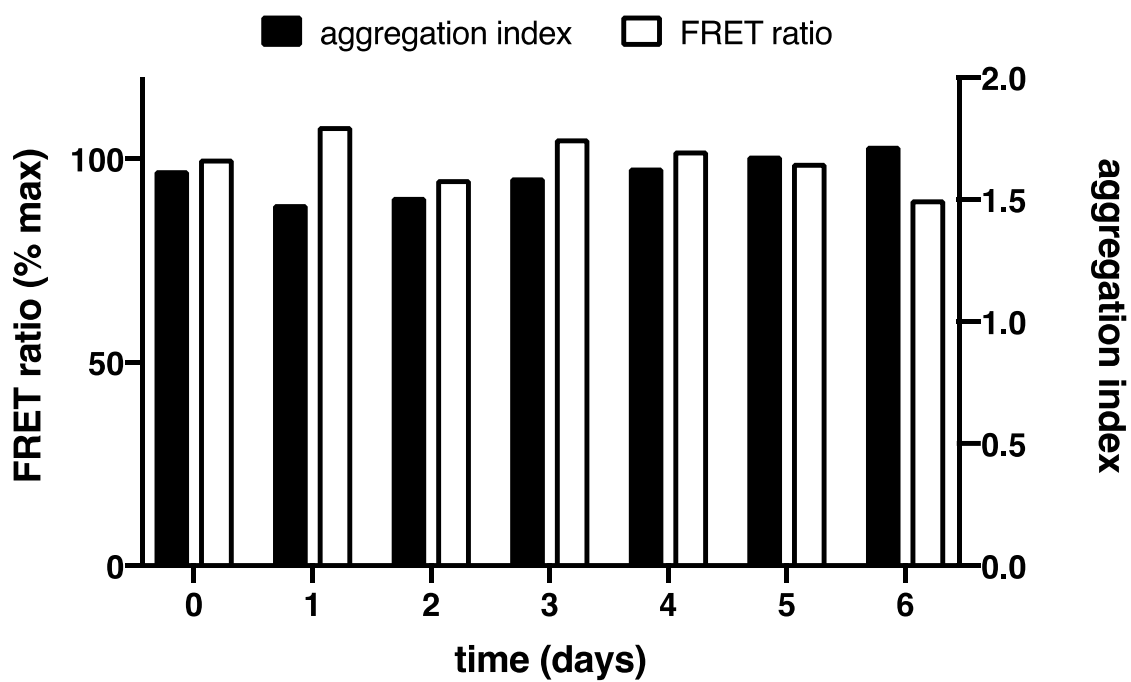


Figure S17. Stability of GHSR in nanodiscs. Changes in the aggregation index and in the FRET ratio (amount of bound ghrelin) between labeled ghrelin and GHSR as a function of time under the NMR conditions ($\sim 1 \mu\text{M}$ receptor concentration, $10 \mu\text{M}$ ghrelin, 20 mM MES pH 6.5, 100 mM KCl buffer). The aggregation index was calculated as described in [Fig. S16](#).

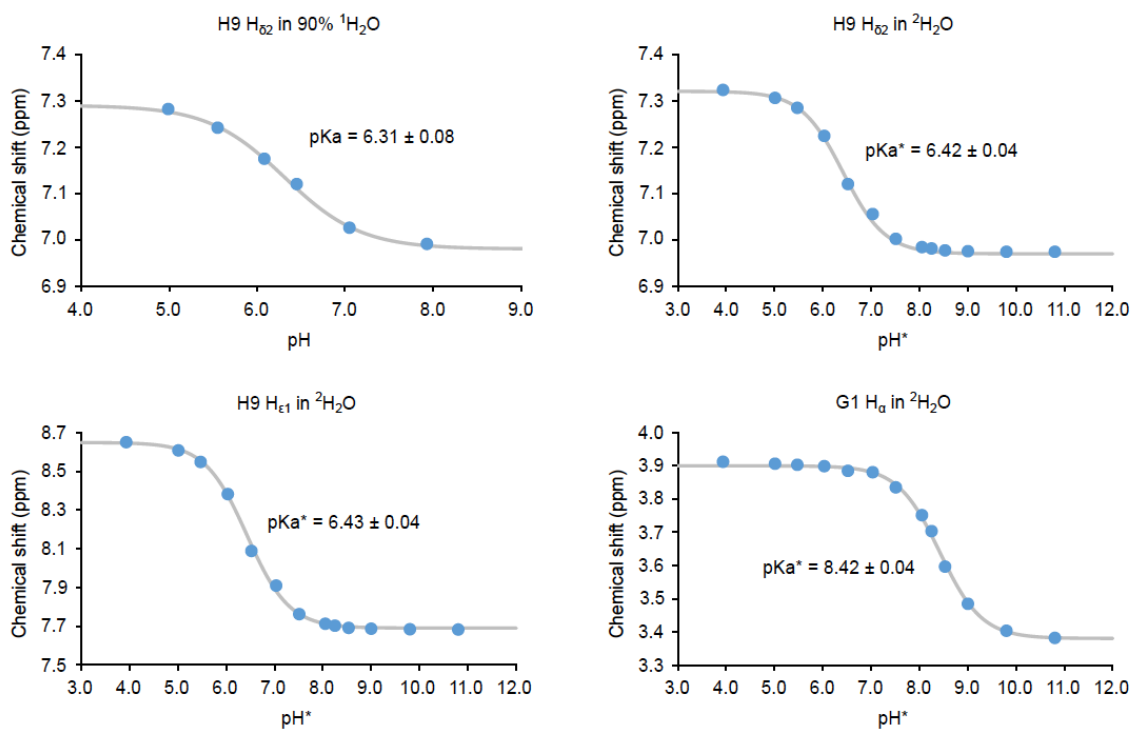


Figure S18. Ghrelin N-terminal and H9 side-chain pKa determination. Chemical shift variation with pH for H9- $\text{H}_{\delta 2}$ in 10% v/v $^2\text{H}_2\text{O}$ (top, left), H9- $\text{H}_{\delta 2}$ in $^2\text{H}_2\text{O}$ (top, right), H9- $\text{H}_{\epsilon 1}$ in $^2\text{H}_2\text{O}$ (bottom, left), G1- H_{α} in $^2\text{H}_2\text{O}$ (bottom, right). pH* and pKa* refers to apparent pH measured in $^2\text{H}_2\text{O}$ buffer and the corresponding apparent pKa. Ghrelin N-terminal pKa was estimated to be ~ 8.2 , after correcting for the isotope effect on pH measurement as described in (9).

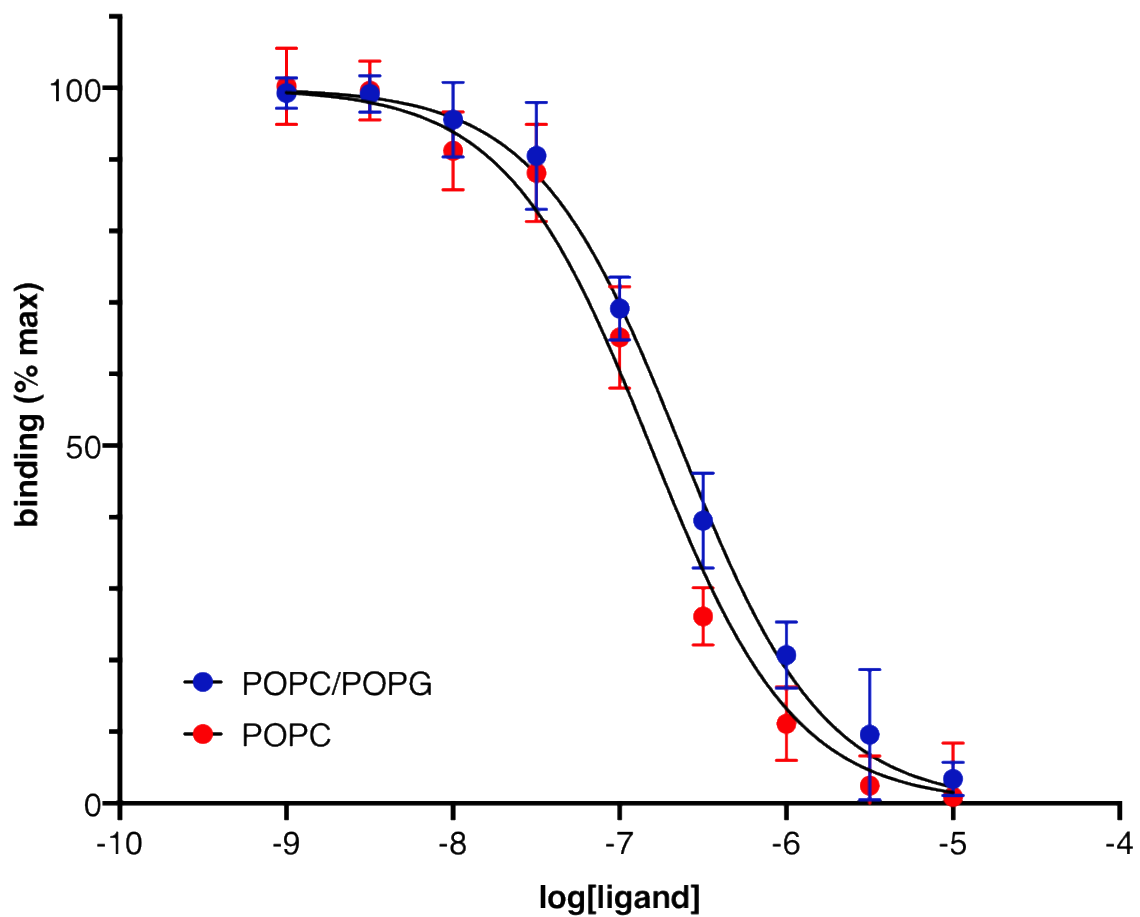


Figure S19. Effect of the lipid composition on ghrelin binding to GHSR. FRET-monitored competition assays of ghrelin 1-18 for binding GHSR assembled into nanodiscs composed of POPC only or of POPC and POPG (3:2 molar ratio) (2).

Movie S1. Ghrelin binding pathway. Timeline of one representative binding event of octanoylated ghrelin to its receptor as observed along the CG-REMD simulations that shows receptor-induced conformational selection of ghrelin.

Movie S2. Ghrelin dynamics in the “bound state”. Movie of one 30 μ s “bound-state” CG-MD trajectory, where the ghrelin N-terminus interacts with the bottom of the binding pocket, and including the full set of NOE restraints. As stated in the results section, ghrelin adopted the “bound state” in very few nanoseconds.

REFERENCES

1. Damian M, *et al.* (2012) High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem* 287(6):3630-3641.
2. Damian M, *et al.* (2015) Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(5):1601-1606.
3. Casiraghi M, *et al.* (2016) Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J Am Chem Soc* 138(35):11170-11175.
4. Denisov IG & Sligar SG (2017) Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem Rev* 117(6):4669-4713.
5. Mary S, *et al.* (2012) Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21):8304-8309.
6. Damian M, *et al.* (2018) GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(17):4501-4506.
7. McEwen DP, Gee KR, Kang HC, & Neubig RR (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal Biochem* 291(1):109-117.
8. M'Kadmi C, *et al.* (2015) Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *J Biol Chem* 290(45):27021-27039.
9. Rubinson KA (2017) Practical corrections for p(H, D) measurements in mixed H₂O/D₂O biological buffers. *Anal Methods-Uk* 9(18):2744-2750.
10. O'Connor C, *et al.* (2015) NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(38):11852-11857.
11. Vogeli B (2014) The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 78:1-46.
12. Case DAB, V.; Berryman, J.T.; Betz, R.M.; Cai, Q.; Cerutti, D.S.; T.E. Cheatham, III, T.E.; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Gusarov, S.; Homeyer, N.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Lee, T.S.; LeGrand, S.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K.M.; Paesani, F.; Roe, D.R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Salomon-Ferrer, R.; Seabra, G.; Simmerling, C.L.; Smith, W.; Swails, J.; Walker, R.C.; Wang, J.; Wolf, R.M.; Wu, X.; Kollman, P.A. (2014) AMBER 14. *University of California, San Francisco*.
13. Tanokura M (1983) 1H-NMR study on the tautomerism of the imidazole ring of histidine residues. I. Microscopic pK values and molar ratios of tautomers in histidine-containing peptides. *Biochim Biophys Acta* 742(3):576-585.
14. Webb B & Sali A (2016) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 54:5 6 1-5 6 37.

15. White JF, *et al.* (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490(7421):508-513.
16. Ueda T, *et al.* (2011) Mutational analysis of predicted extracellular domains of human growth hormone secretagogue receptor 1a. *Regul Pept* 166(1-3):28-35.
17. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, & de Vries AH (2007) The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B* 111(27):7812-7824.
18. Periole X & Marrink SJ (2013) The Martini coarse-grained force field. *Methods Mol Biol* 924:533-565.
19. Qi Y, *et al.* (2015) CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *J Chem Theory Comput* 11(9):4486-4494.
20. Periole X, Cavalli M, Marrink SJ, & Ceruso MA (2009) Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *J Chem Theory Comput* 5(9):2531-2543.
21. Delano W (2002) Pymol: An open-source molecular graphics tool. . *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.*:82-92.
22. Abraham MJM, T. ; Schultz, R. ; Pall, S. ; Smith, J.C. ; Hess, B. ; Lindhal, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X* 1-2:19-25.
23. Delort B, *et al.* (2017) Coarse-Grained Prediction of Peptide Binding to G-Protein Coupled Receptors. *J Chem Inf Model* 57(3):562-571.
24. Rathore N, Chopra M, & de Pablo JJ (2005) Optimal allocation of replicas in parallel tempering simulations. *J Chem Phys* 122(2):024111.
25. Holst B, *et al.* (2007) Identification of an efficacy switch region in the ghrelin receptor responsible for interchange between agonism and inverse agonism. *J Biol Chem* 282(21):15799-15811.
26. Holst B, *et al.* (2009) Overlapping binding site for the endogenous agonist, small-molecule agonists, and ago-allosteric modulators on the ghrelin receptor. *Mol Pharmacol* 75(1):44-59.
27. Mokrosinski J, Frimurer TM, Sivertsen B, Schwartz TW, & Holst B (2012) Modulation of constitutive activity and signaling bias of the ghrelin receptor by conformational constraint in the second extracellular loop. *J Biol Chem* 287(40):33488-33502.
28. Ballesteros JAW, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences, S.C. Sealfon, ed. (Academic Press)*:366-428.
29. Moulin A, *et al.* (2013) The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids* 44(2):301-314.
30. Maingot M, *et al.* (2016) New ligands of the ghrelin receptor based on the 1,2,4-triazole scaffold by introduction of a second chiral center. *Bioorg Med Chem Lett* 26(10):2408-2412.
31. Nomine Y, *et al.* (2001) A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Eng* 14(4):297-305.

III. Complément de la publication II : perspectives de modélisation tout-atome du complexe ghréline – GHSR.

Les informations issues des expériences de RMN sur la structure et la dynamique de la ghréline liée à GHSR peuvent être utilisées dans la modélisation tout-atome du complexe peptide – récepteur. Ce travail est réalisé dans l'équipe par Georges Czaplicki et ma participation consiste en des discussions sur la stratégie à suivre, l'intégration des données expérimentales et l'analyse des modèles obtenus. La stratégie utilisée est proche de celle qui a été précédemment appliquée au système dynorphine – KOP (113) (voir aussi le chapitre II (35)).

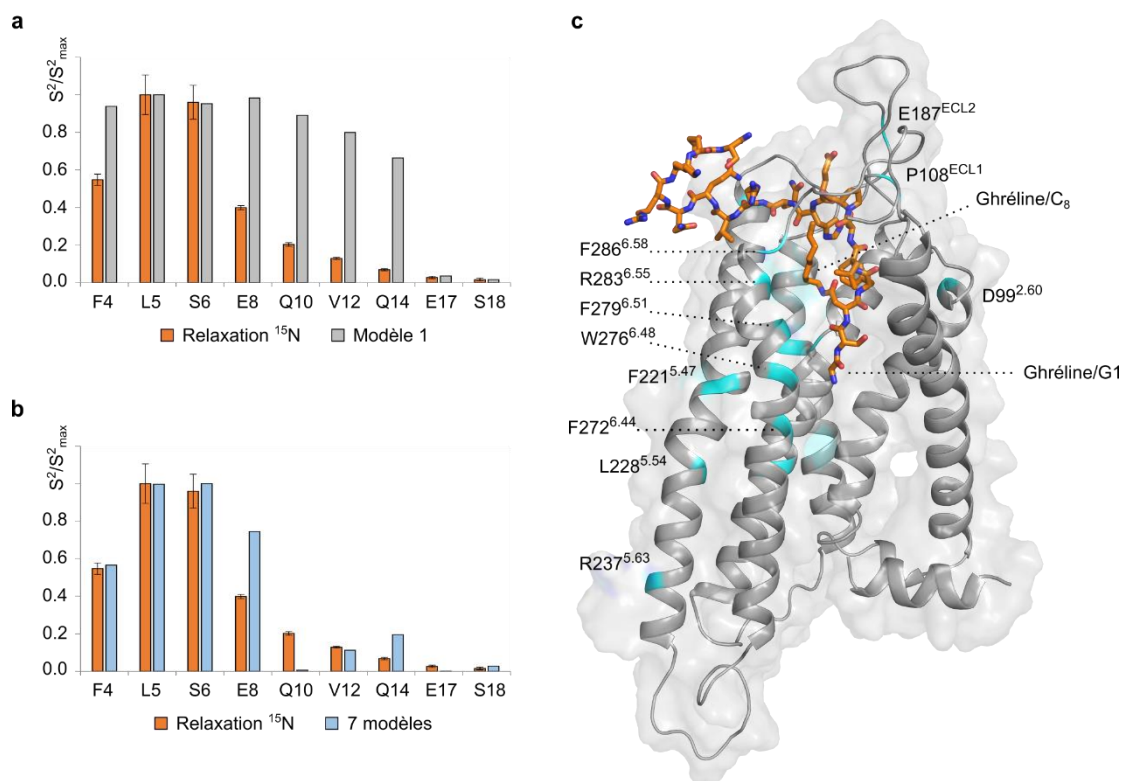
Dans le cas de GHSR, il n'y a pas de structure connue et il est donc nécessaire d'élaborer un modèle par homologie. Après cette étape, la structure obtenue est soumise à une dynamique moléculaire de 150 ns (AMBER16) avec le récepteur en bicouche lipidique (POPC / POPG / cholestérol en rapports molaires 6 / 4 / 1). Des structures représentatives sont alors générées par « clustering » au long de la trajectoire après équilibration et comparées à des structures expérimentales de RCPG homologues pour validation. Les récepteurs utilisés pour comparaison sont le récepteur à la neurotensine NTSR1 de rat (35 % d'identité) pour lequel une structure a été résolue en complexe avec un fragment de la neurotensine ((58), PDB 4GRV) et le récepteur κ opioïde KOP humain (27 % d'identité) pour lequel des structures inactivée et activée sont disponibles ((49, 54), PDB 4DJH et 6B73). Pour les essais préliminaires discutés ici, la modélisation par homologie a été réalisée à partir de la structure de KOP inactivé (PDB 4DJH) et nous testons actuellement d'autres structures de départ pour la modélisation par homologie.

On peut alors réaliser le « docking » de la ghréline à partir du modèle de récepteur obtenu (Autodock Vina). Différentes informations expérimentales peuvent être utilisées pour restreindre le nombre de degrés de liberté du système en traitant certaines parties du peptide et de GHSR comme rigide ou flexible. Les données de relation structure – fonction de la ghréline (181-184) et nos expériences de RMN ont montré que la partie N-terminale du peptide est responsable de l'interaction avec GHSR. Nous réalisons donc ici le docking avec les 9 premiers acides aminés de la ghréline. Sur la base de nos données RMN, le peptide est aussi maintenu dans la structure déterminée de l'état lié pour les résidus 3 à 8 et le reste du peptide est traité comme flexible. Sur la base d'études précédentes de mutagenèse du récepteur (200-202), les chaînes latérales des résidus du site orthostérique importants pour la liaison de la ghréline sont traitées comme flexibles et le reste du récepteur comme étant rigide. Après clustering des poses obtenues et sélection des modèles où la ghréline est insérée avec son extrémité N-terminale pointant vers le fond du site orthostérique (comme indiqué par les données de mutagenèse et de

relation structure – fonction), la partie C-terminale du peptide est ajoutée (jusqu’au résidu 18 comme dans nos expériences de RMN). Les complexes ghréline – GHSR sélectionnés sont alors soumis à une dynamique moléculaire de 150 ns (AMBER16) avec le récepteur en bicouche lipidique et en appliquant à la ghréline les contraintes RMN utilisées pour la détermination de sa structure dans l’état lié. La flexibilité de la ghréline liée au sein d’un modèle ou pour une combinaison de plusieurs modèles peut alors être évaluée par un profil de paramètre d’ordre relatif S^2/S^2_{\max} comparé à celui obtenu à partir des données RMN de relaxation ^{15}N (comme décrit dans la publication II).

Dans les premiers essais effectués, la dynamique moléculaire d’un complexe représentatif a été étendue à 2 μs (noté modèle 1). Le profil S^2/S^2_{\max} du modèle 1 (**figure ci-après, a**) montre que la flexibilité de la ghréline y est moins importante que celle révélée par les expériences de relaxation du ^{15}N . En revanche, il est possible de sélectionner un sous-ensemble des modèles pour obtenir un profil S^2/S^2_{\max} moyen qui reproduit au mieux les données expérimentales (ici 7 modèles, **figure ci-après, b**). Cela suggère que la seule trajectoire du modèle 1 ne permet pas de prendre en compte l’interconversion de plusieurs poses de la ghréline dans le site orthostérique alors qu’elle peut être décrite par un ensemble de modèles. Ce point a également été observé avec la trajectoire d’un autre modèle sur 2 μs pour laquelle les résultats ne sont pas présentés ici.

La perspective de ce travail est donc de proposer un modèle de l’interaction ghréline – GHSR constitué d’un ensemble de poses du peptide, ici illustrées par une structure représentative du modèle 1 (**figure ci-après, c**). Ces poses pourront être testées par des expériences de mutagenèse dirigée, chaque pose suggérant des contacts avec des acides aminés spécifiques. La piste de réflexion que nous souhaitons souligner ici est que, de même que les récepteurs possèdent une espace conformationnel complexe, « l’état lié » d’un peptide peut se concevoir comme une combinaison de plusieurs positions et orientations du peptide en échange entre elles. Ce modèle permettra la visualisation tridimensionnelle d’interactions possibles entre la ghréline et son récepteur et pourra aider à la conception de nouveaux ligands de GHSR.



Comparaison du profil de paramètres d'ordre relatifs S^2/S^2_{\max} de la ghréline liée issu des expériences RMN de relaxation ^{15}N aux S^2/S^2_{\max} de la trajectoire d'un modèle du complexe ghréline – GHSR (noté modèle 1) **(a)** et aux S^2/S^2_{\max} moyens de trajectoires de sept modèles de complexes ghréline – GHSR **(b)**. **(c)** Une structure représentative issue de la trajectoire du modèle 1 du complexe ghréline GHSR. L'hélice transmembranaire 7 n'est pas représentée pour faire apparaître la ghréline. Les principaux résidus du récepteur dont la mutation affecte la puissance de la ghréline sont indiqués en cyan. C₈ désigne la chaîne acyle de la ghréline.

Chapitre V

Vers l'étude des neuropeptides au sein de complexes de « haute affinité »

I. Contexte.

Nous avons vu dans le chapitre d'introduction que l'interaction des RCPG avec leurs partenaires stabilise certaines conformations des récepteurs et que la présence à la fois d'un agoniste et de la protéine G est nécessaire pour stabiliser un état pleinement activé. Cela traduit le couplage allostérique faible entre le site de liaison du ligand extracellulaire et celui de la protéine G. Il a aussi été observé que l'ajout de protéine G a pour effet d'améliorer l'affinité des agonistes pour leur récepteur (32, 68, 203, 204). L'état d'activation d'un RCPG influence donc l'interaction avec son ligand et on qualifie l'état activé par la protéine G d'état de « haute affinité ».

Pour les systèmes dynorphine / KOP et ghréline / GHSR en l'absence de protéine G, une partie des peptides est structurée dans l'état lié au récepteur et une partie reste désordonnée (113) (chapitre IV : publication II (114)). Nous avons donc voulu examiner si l'état d'activation de KOP implique des changements de dynamique et / ou de conformation de la dynorphine dans l'état lié. Il a été discuté dans le chapitre d'introduction que les structures connues de RCPG suggèrent une légère compaction du site orthostérique lors de l'activation (32). Cet élément pourrait aller dans le sens d'une rigidification supplémentaire des ligands peptidiques au sein des complexes ternaires avec la protéine G.

Nous avons cherché à appliquer les expériences de RMN utilisées dans la publication précédente de l'équipe sur la dynorphine liée à KOP (113) pour caractériser ce peptide lors de l'interaction avec le récepteur dans son état de haute affinité. Un point sur lequel nous avons porté une attention particulière est que la dynorphine possède un motif N-terminal Y1-G2-G3-F4-L5 qui est commun avec d'autres peptides opioïdes. Comme discuté dans le chapitre II (35), ce motif est qualifié de « message » et serait responsable de l'activation spécifique des récepteurs aux opioïdes. L'observation d'une flexibilité importante au niveau des résidus G2, G3 et F4 de la dynorphine liée à KOP (113) pose donc la question de l'effet de l'état d'activation du récepteur sur la dynamique de cette région.

Pour ce travail, nous avons bénéficié de la collaboration avec Vadim Cherezov dont l'équipe a participé à la détermination de la structure cristallographique de KOP stabilisé dans un état activé par un mimétique de protéine G (54). Nous avons pu utiliser différents outils développés au cours de ce travail, notamment le nanobody 39 (Nb39) mimétique de la protéine G.

II. Etude de la dynorphine liée à KOP activé par Nb39.

II.1. Production de Nb39, mimétique de la protéine G_i pour KOP.

Nb39 est un anticorps de camélidé (appelé « nanobody ») qui avait été précédemment obtenu par « phage display » pour déterminer la structure du récepteur μ opioïde MOP dans son état activé (53). Bien qu'initialement dirigé contre MOP, Nb39 permet aussi la stabilisation de la conformation activée de KOP (54). L'utilisation de Nb39 présente différents avantages pour les expériences que nous avons réalisées. En effet, les nanobodies sont des protéines globulaires de petite taille (~15 kDa) et assez stables qui peuvent être produites relativement facilement chez la bactérie (204, 205). Nous avons aussi mis en place la production de Nb39 dans le laboratoire avec pour perspective l'étude par RMN de la dynamique de KOP produit chez la bactérie. Pour cette application, la faible masse moléculaire de Nb39 est un avantage certain.

Nb39 a été produit comme précédemment décrit (53, 54) (**figure 1a**). Il a d'abord été exprimé chez *E. coli* par adressage au périplasma à l'aide de la séquence pelB qui est clivée par la bactérie après translocation au travers de la membrane plasmique. Cet adressage est nécessaire pour la formation d'un pont disulfure et pour une expression de la protéine sous forme soluble. En effet, on peut voir sur la **figure 1b** que la fraction de Nb39 pour laquelle la séquence d'adressage n'a pas été clivée (signe d'un défaut d'adressage) est insoluble. Le contenu du périplasma a alors été libéré hors des bactéries en formant des sphéroblastes par choc osmotique. Nb39 a finalement été purifié par chromatographie d'affinité sur résine TALON via son étiquette poly-histidine puis par chromatographie d'exclusion de taille. Le chromatogramme correspondant et le suivi par SDS-PAGE montrent une bonne pureté du Nb39 obtenu (**figures 1c et 1d**). Le rendement de production est d'environ 3 mg par litre de culture.

Au-delà de la structure cristallographique du complexe KOP / Nb39 présentant différents marqueurs de l'activation des RCPG, la capacité de Nb39 à stabiliser l'état activé de KOP a été précédemment validée par des expériences où un signal de BRET (bioluminescence resonance energy transfer) est obtenu si Nb39 interagit avec la face intracellulaire de KOP (54). Elles ont montré le recrutement de Nb39 en présence d'agonistes et pas en présence d'antagonistes. Des expériences de liaison de ligand radioactif ont également montré que l'ajout de Nb39 améliore l'affinité d'agonistes de KOP. Nous avons réalisé une expérience préliminaire de compétition de la liaison de la ³H-diprénorphine par la ¹H-dynorphine A 1-13 avec KOP en membrane de cellules SF9 (construction du chapitre III notée KOP-SF9). Le résultat indique que l'ajout de Nb39 a entraîné une diminution du K_I de la dynorphine de $1.4 \cdot 10^{-5}$ à $1.5 \cdot 10^{-6}$ M, soit une

augmentation de l'affinité du récepteur KOP pour son agoniste peptidique d'environ un facteur 10.

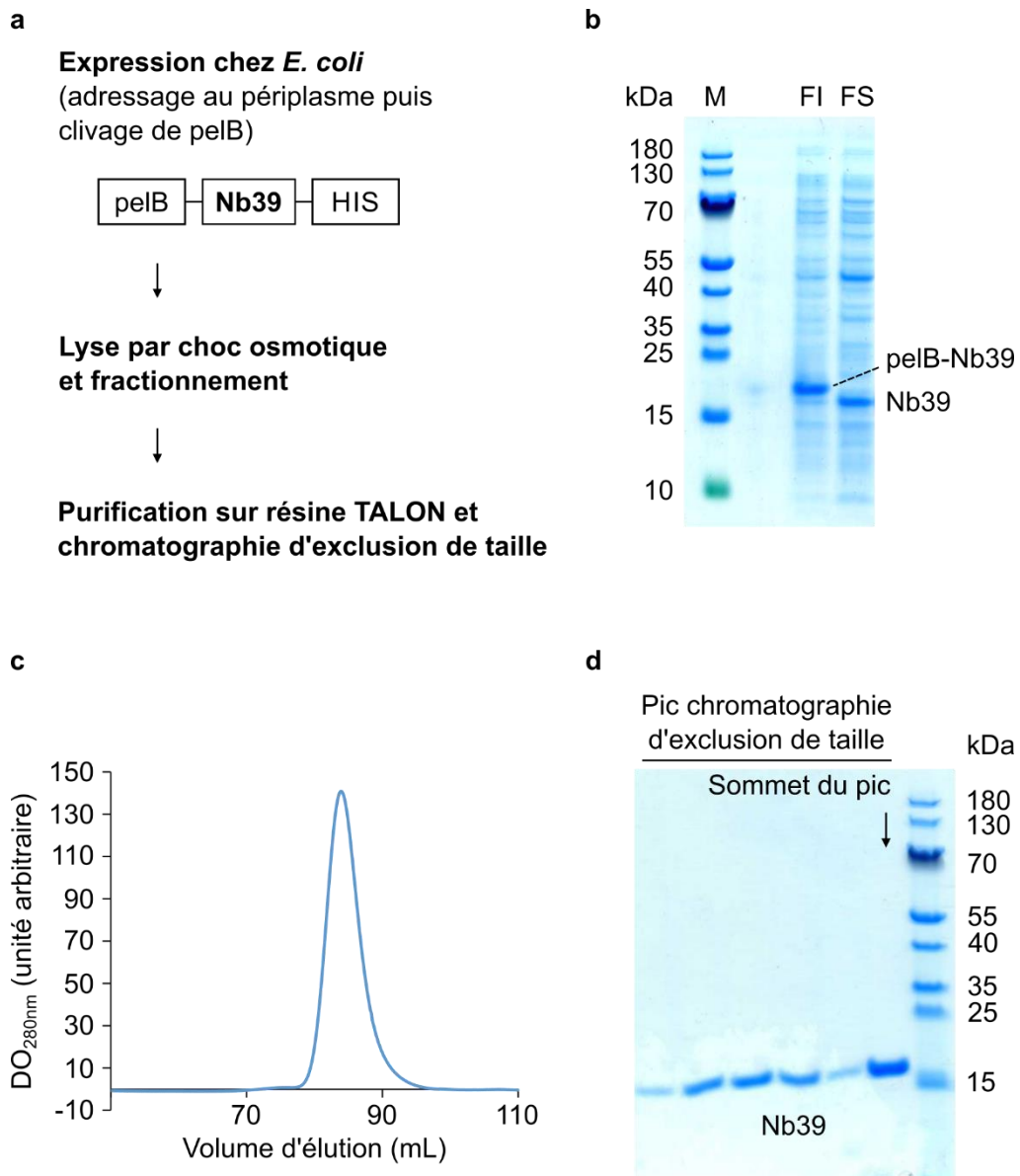


Figure 1. (a) Schéma de la stratégie de production de Nb39. (b) Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des fractions insoluble (FI) et soluble (FS) du lysat bactérien après expression de Nb39. (c) Chromatogramme d'exclusion de taille de Nb39. (d) Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des fractions du pic du chromatogramme présenté en c.

II.2. Production de KOP-BRIL pour les expériences de RMN.

Nous avons purifié KOP à partir de membranes de cellules SF9 fournies par l'équipe de Vadim Cherezov. La séquence du récepteur exprimé (**figure 2a**) est identique à celle utilisée pour l'étude du complexe KOP / Nb39 par cristallographie (notée KOP-BRIL). Le récepteur est KOP humain avec une délétion N-terminale de 53 acides aminés, une délétion C-terminale de 21 acides aminés, et la mutation stabilisatrice I135^{3,29}L. Des étiquettes HA, Flag et poly-histidine sont présentes en N-terminal d'un site TEV, et une séquence BRIL (apocytochrome b₅₆₂ thermostabilisé, résidus 1-106) est placée entre le site TEV et l'extrémité N-terminale de la séquence de KOP. Nous avons choisi d'utiliser cette construction afin de bénéficier de la caractérisation précédemment effectuée (54) qui a validé la capacité de KOP-BRIL à recruter Nb39 (structure cristallographique), à lier des ligands de KOP et à réaliser une activité de signalisation via la protéine G_i en membranes de cellules SF9.

La purification du récepteur a été réalisée en modifiant le protocole précédemment décrit (54) pour aboutir aux conditions désirées pour les expériences de RMN (**figure 2b**). De façon équivalente aux expériences du chapitre III à partir de membranes SF9, la stratégie utilisée consiste à extraire le récepteur des membranes SF9 par solubilisation en DDM – CHS puis à le purifier par chromatographie sur résine TALON et dessalage dans ces micelles de détergent. Les étiquettes N-terminales sont alors éliminées par digestion à la TEV et le récepteur clivé est purifié par chromatographie inverse sur résine TALON. Lors de ces étapes, KOP a été stabilisé par de la naltrexone puis de la dynorphine A 1-13 non-marquée au lieu du ligand utilisé pour la cristallisation (MP1104). Lors des expériences de RMN, l'échantillon contient ainsi une faible quantité de dynorphine ¹⁴N à laquelle est ajouté un large excès de dynorphine ¹⁵N. Le tampon final a été échangé pour les expériences de RMN. Pour une première série d'expérience, Nb39 a été ajouté avant cet échange. Pour la deuxième série d'expérience, Nb39 a été ajouté au cours des expériences de RMN pour titration par le nanobody.

Les résultats de ces purifications n'ont pas été très bons. En effet, les rendements obtenus sont très faibles : inférieurs à 40 - 90 µg de récepteur par litre de culture. L'analyse par SDS-PAGE (**figure 2c**) montre que la pureté des échantillons n'est pas satisfaisante non plus. Le récepteur est majoritaire mais on observe de nombreux contaminants protéiques. Il est possible que cette mauvaise pureté soit en partie due à une faible expression du récepteur, les contaminants étant alors présent en proportion plus importante. Il est aussi possible que la substitution du ligand MP1104 par la naltrexone et la dynorphine lors de la purification ait entraîné une moins bonne stabilisation de KOP, participant ainsi à diminuer le rendement de production.

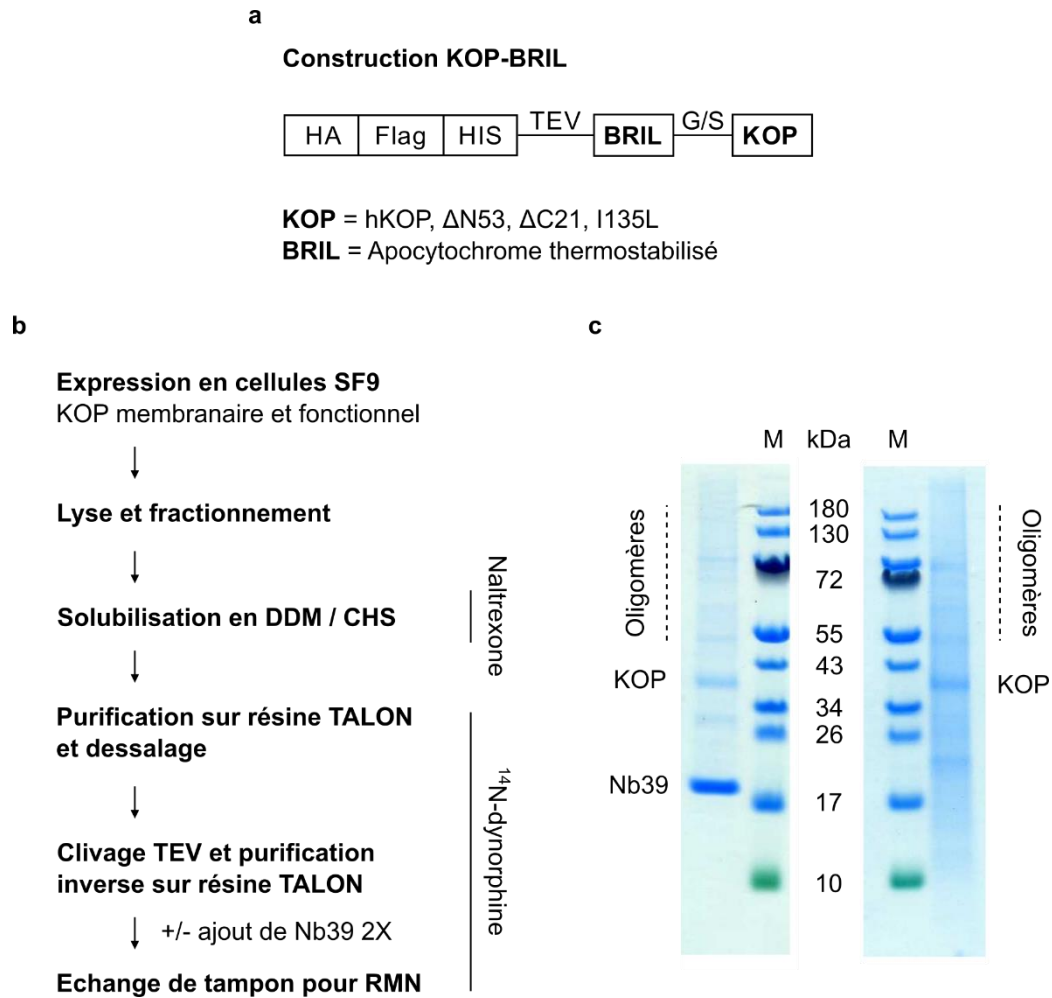


Figure 2. (a) Schéma de la séquence de KOP utilisée dans les expériences de ce chapitre. KOP est le récepteur humain avec délétion des 53 acides aminés N-terminaux et des 21 acides aminés C-terminaux et avec la mutation I135^{3,29}L. BRIL désigne l'apocytochrome b₅₆₂ thermostabilisé, HA, Flag et HIS les étiquettes HA, Flag et poly-histidine, TEV le site de digestion à la protéase du « tobacco etch virus » et G/S un espaceur glycine – sérine. (b) Schéma de la stratégie de purification du récepteur. (c) Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des échantillons obtenus à l'issue de deux purifications.

II.3. Résultats des expériences de RMN.

Malgré la difficile purification de KOP-BRIL, des expériences préliminaires de RMN ont été menées en vue de caractériser l'interaction de la dynorphine en absence et en présence de Nb39. Ces expériences sont dupliquées en présence d'un compétiteur afin d'éliminer la contribution de la liaison non-spécifique de la dynorphine, supprimant ainsi l'effet de contaminants sur les mesures RMN. La faible pureté du récepteur a cependant posé des difficultés. D'abord elle empêche de déterminer précisément la concentration de récepteur et donc de maîtriser précisément le rapport molaire KOP / dynorphine utilisé. Les concentrations de récepteur et rapports molaires indiqués dans ce qui suit ont été estimés d'après des mesures de DO_{280nm} et sont donc en partie faussés du fait de la présence de contaminants protéiques. Ensuite, une dégradation de la ^{15}N -dynorphine a été observée au cours des expériences de RMN, ce qui a aussi compliqué l'analyse des résultats. Des expériences RMN réalisées avec la dynorphine et les solutions de récepteur et de Nb39 ont montré que la source de dégradation provenait de l'échantillon de KOP. Cette dégradation est donc vraisemblablement liée à la mauvaise pureté du récepteur produit.

Une première série d'expériences a été réalisée avec pour objectif de tester si la dynorphine est en échange rapide entre ses états lié et libre en présence de Nb39, comme cela avait été précédemment observé en l'absence du nanobody (113). Un échantillon contenant 5 μM de KOP et deux équivalents de Nb39 a été titré par ajout successifs de dynorphine A 1-13 marquée au ^{15}N . Il a été fait de même avec un échantillon contenant le ligand MP1104 comme compétiteur orthostérique. Il s'agit du ligand ayant permis la cristallisation du complexe MP1104-KOP-Nb39 (54) qui a été choisi afin d'enregistrer les expériences de liaison non-spécifique avec le complexe KOP-Nb39 formé. Ces titrations ont été suivies par des spectres 2D 1H - ^{15}N BEST-HSQC et ont révélé un échange rapide entre les états lié et libre de la dynorphine. A un rapport molaire KOP / dynorphine de 0.01 (**figure 3a**), la comparaison des échantillons sans et avec compétiteur montre un élargissement préférentiel des signaux de la partie centrale du peptide (par exemple L5 par rapport à L12) et donc une intensité plus faible en l'absence de MP1104. Cet élargissement est aussi fonction du rapport molaire KOP / dynorphine et est cohérent avec la rigidification de la partie centrale du peptide lors de l'interaction (113). Un autre indicateur de l'échange rapide est la dépendance de la perturbation de déplacement chimique de la dynorphine au rapport molaire récepteur / peptide.

Une seconde série d'expériences a alors été réalisée afin de tester l'effet de l'ajout de Nb39 sur la dynamique de la dynorphine lors de son interaction avec KOP. L'ajout du nanobody à un

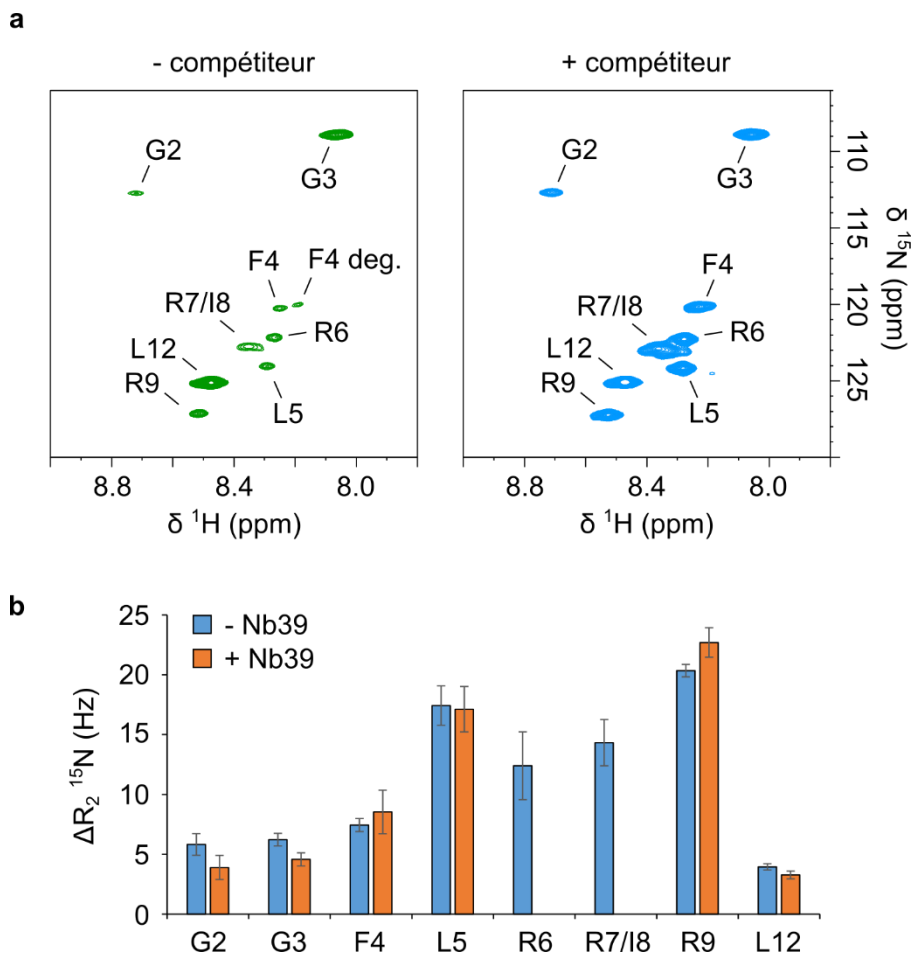


Figure 3. (a) Spectres 2D ^{15}N - ^1H BEST-HSQC de la dynorphine en présence de KOP (rapport molaire peptide / récepteur de 0.01) et de Nb39 (deux équivalents de KOP) à 600 MHz et 280 K sans ou avec compétiteur MP1104. L'attribution des protons amides est indiquée, F4 deg. désigne un produit de dégradation de la dynorphine apparu au cours de l'expérience. Les spectres avec et sans compétiteur sont représentés avec des niveaux de contour identiques. (b) Profils de différence de relaxation transverse du ^{15}N (ΔR_2) de protons amide de la dynorphine en présence de KOP (rapport molaire peptide / récepteur de 0.01) à 600 MHz et 280 K. Les ΔR_2 ont été obtenus par différence entre les échantillons sans et avec compétiteur et sont présentés en l'absence de Nb39 (en bleu) ou en présence de 4 équivalents du nanobody par rapport à KOP (en orange). Pour les amides de R6, R7 et I8, la relaxation n'a pas pu être mesurée à cause de la dégradation de la dynorphine.

échantillon contenant la dynorphine marquée au ^{15}N et le récepteur (rapport molaire récepteur / peptide de 0.01) a été suivi par l'enregistrement de différentes expériences RMN. Ici, aussi les expériences ont été dupliquées en présence du compétiteur MP1104. En l'absence de Nb39, la mesure des vitesses de relaxation transverse (R_2) du ^{15}N donne des résultats équivalents à ce qui a été précédemment observé (113) (**figure 3b**). En effet, les différences de R_2 entre les échantillons sans et avec compétiteur (ΔR_2) montrent la rigidification de la dynorphine liée pour les résidus L5 à R9 et la flexibilité des extrémités N- et C-terminales. Les valeurs de ΔR_2 sont cependant plus faibles que celles précédemment décrites (113) ce qui indique une fraction de peptide lié moins importante et donc une quantité de récepteur inférieure. En présence de quatre équivalents de Nb39, nous n'avons pas observé de différence dans le profil de ΔR_2 (**figure 3b**). En particulier, l'expérience n'a pas révélé de différence de dynamique de la région « message » de la dynorphine (résidus G2, G3 et F4). Des résultats équivalents ont été obtenus en ajoutant JDtic (utilisé dans l'étude précédente de la dynorphine liée) à l'échantillon avec KOP et Nb39.

III. Conclusions.

L'étude décrite dans ce chapitre a permis de mettre en place au laboratoire la production du nanobody 39. La protéine produite est pure, elle peut être amenée à haute concentration (testé jusqu'à 290 μM) et le rendement est d'environ 3 mg par litre de culture. Nb39 constitue donc un outil prometteur pour la caractérisation de l'état activé de KOP par différentes approches de biophysique. L'*annexe* de ce manuscrit présente le protocole détaillé de production de Nb39.

Les conditions des mesures de RMN effectuées mériteraient d'être améliorées, en particulier concernant la purification du récepteur. Cependant, les résultats préliminaires obtenus n'ont pas mis en évidence de modification de la dynamique de la dynorphine liée à KOP en présence de Nb39. Nous n'avons donc pas réalisé les expériences de NOE transféré que nous prévoyions pour déterminer la structure de la dynorphine au sein du complexe avec KOP et Nb39.

Il faut aussi noter que les résultats obtenus ne permettent pas d'exclure strictement un défaut de couplage entre KOP et Nb39 dans les conditions des expériences de RMN. Nous ne pouvons donc pas conclure sur une dynamique inchangée de la dynorphine dans l'état lié. En effet, la dynorphine n'a pas été testée par les expériences de recrutement de Nb39 suivi par BRET (54). Ces expériences sont de plus réalisées en cellules HEK et non pas en micelles de DDM – CHS. Une alternative serait d'utiliser l'expérience de « scintillation proximity assay » (SPA) décrite dans la chapitre III pour tester l'amélioration d'affinité de la dynorphine en présence de Nb39.

Cela nécessiterait préalablement d'inclure un site de clivage pour éliminer l'étiquette poly-histidine de Nb39.

Il sera aussi possible d'examiner l'effet de l'état d'activation de GHSR sur la dynamique et la structure de la ghréline liée. Ce système étudié dans le chapitre IV présente l'avantage que la caractérisation pharmacologique établie par l'équipe de notre collaborateur Jean-Louis Banères pourra être réalisée avec GHSR reconstitué en nanodisques, dans les mêmes conditions que les expériences de RMN, comme cela a été fait dans la publication II.

IV. Matériel et méthodes.

Production de Nb39.

La production de Nb39 est décrite en détail en *annexe* de ce manuscrit.

Le plasmide pET25b permettant l'expression de Nb39 a été fourni par l'équipe de Ray Stevens. Des bactéries BL21Star ont été utilisées pour l'expression par culture en 500 mL de milieu LB avec induction par de l'IPTG 1 mM à 25 °C pendant 5 heures à partir d'une DO_{600nm} de 0.8 – 1. Les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes à 4 °C et congelées à -80 °C. Elles ont ensuite été lysées par formation de sphéroblastes en réalisant un choc osmotique par incubation pendant 30 minutes à température ambiante dans un tampon Tris 250 mM pH 8.0, EDTA 0.5 mM, saccharose 750 mM suivie d'une dilution rapide du tampon par deux en présence de lysozyme 0.1 g/L puis d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante. La fraction soluble obtenue par ultracentrifugation pendant 30 minutes à 4 °C à 46000 g a été purifiée sur résine TALON à l'aide d'un système AKTA (GE healthcare) en tampon HEPES pH 7.5 50 mM, KCl 150 mM avec un gradient d'imidazole de 0 à 250 mM sur 30 minutes. Nb39 a finalement été purifié par chromatographie d'exclusion de taille préparative à l'aide d'une colonne G75 (GE healthcare) en tampon HEPES pH 7.5 50 mM, KCl 150 mM, glycérol 10 % puis congelé à l'azote liquide et stocké à -80 °C.

Production de KOP-BRIL.

Le protocole détaillé de la purification d'un des récepteurs du chapitre III à partir de cellules SF9 est présenté en *annexe*. La production de KOP-BRIL pour les expériences décrites dans ce chapitre a été réalisée avec un protocole équivalent et certaines modifications de tampon et de ligands utilisés. L'expression de KOP-BRIL en cellules SF9 et l'isolation des membranes ont été réalisés par l'équipe de Vadim Cherezov.

L'ensemble des opérations sont réalisées à 4 °C sauf si indiqué. Les cellules SF9 ont été lysées par décongélation dans un tampon hypotonique HEPES pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche). Les membranes ont alors été lavées par fractionnement par ultracentrifugation à 150000 g pendant 30 minutes dans ce tampon puis deux fois dans un tampon hypertonique additionné de NaCl 1 M. L'échantillon a alors été incubé pendant une heure à température ambiante en tampon HEPES 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, NaCl 150 mM en présence de naltrexone 100 µM et d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche) puis traité à l'iodoacétamide 2 mg/mL pendant 30 minutes à 4 °C. KOP a ensuite été solubilisé pendant 2 heures en HEPES 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, DDM 1 %, CHS 0.2 % et naltrexone 50 µM et la fraction insoluble a été éliminée par ultracentrifugation à 150000 g pendant 30 minutes. La fraction soluble a été incubée sur la nuit en présence de résine TALON et de 20 mM d'imidazole. La résine a ensuite été lavée par un tampon HEPES 50 mM pH 7.5, KCl 150 mM, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %, imidazole 20 mM et ¹⁴N-dynorphine A 1-13 10 µM puis par un tampon HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.01 % et ¹⁴N-dynorphine A 1-13 10 µM. KOP a finalement été élué en HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 150 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %, imidazole 250 mM et ¹⁴N-dynorphine A 1-13 10 µM puis l'échantillon a été dessalé sur colonne PD10 dans un tampon ²H-MES 1 mM pH 7.5, KCl 150 mM, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %, et ¹⁴N-dynorphine A 1-13 10 µM. Les étiquettes Flag, HA et poly-histidine du récepteur ont alors été supprimées par digestion avec un équivalent de protéase TEV sur la nuit puis purification inverse par incubation pendant deux heures en présence de résine TALON et filtration de cette dernière. Le tampon du récepteur a finalement été échangé par plusieurs cycles de dilution – concentration pour un tampon ²H-MES 50 mM pH 6.1, KCl 150 mM, DDM 0.03 %, CHS 0.006 %, DSS 100 µM, ²H₂O 10 % v/v.

Echantillons et expériences de RMN.

L'ensemble des mesures RMN ont été réalisées en tubes de 3 mm à 280 K et 600 MHz (fréquence de Larmor du ¹H) avec un spectromètre Bruker Avance III HD équipé d'une cryosonde TCI.

Pour une première série d'expériences, Nb39 a été ajouté à 2 équivalents de KOP avant l'échange de tampon. Après ce dernier, la solution de récepteur a été séparée en deux et le compétiteur MP1104 a été ajouté à 300 µM à l'un des échantillons. Ces deux mélanges KOP (5.5 µM) / Nb39 (11 µM) et KOP (5.5 µM) / Nb39 (11 µM) / MP1104 (300 µM) ont été titrés par ajouts successifs de ¹⁵N-dynorphine A 1-13 à des rapports molaires KOP / dynorphine de

0.06, 0.03, 0.02, 0.01 et 0.005. Le marquage de la dynorphine est ^{15}N sur G2, G3, F4, L5, R6, R7, I8, R9, L12 et ^{13}C sur R6, R7 et R9. Le peptide marqué a été synthétisé par N. Doncescu au laboratoire. Ces titrations ont été suivies par l'enregistrement de spectres 2D ^{15}N - ^1H BEST-HSQC.

Pour une seconde série d'expériences, KOP a été préparé dans le tampon final en l'absence de Nb39 et deux échantillons ont été réalisés avec un rapport molaire KOP / dynorphine de 0.01 : ^{15}N -dynorphine A 1-13 900 μM , KOP 9 μM , sans ou avec MP1104 220 μM . Le marquage de la dynorphine est identique à la première série d'expériences. Ces deux mélanges ont alors été titrés par ajout successifs de Nb39 à 0.5, 1 et 4 équivalents par rapport au récepteur. Pour chaque concentration de Nb39, des spectres ^{15}N - ^1H BEST-HSQC ont été enregistrés. Pour les échantillons sans Nb39 et avec 4 équivalents du nanobody, les R_2 ^{15}N ont été mesurés avec un délai de relaxation ^{15}N variable de 0 à 170 ms en condition de CPMG avec une fréquence ν_{CPMG} de 556 Hz. Les R_2 ont été obtenus par régression mono-exponentielle de l'intégrale de chaque pic HSQC en fonction du délai de relaxation. Cette mesure a également été réalisée après ajout de JD1c équimolaire de la dynorphine à l'échantillon sans MP1104 avec 4 équivalents de Nb39.

Conclusions et perspectives

En raison du rôle central des RCPG en physiologie humaine, la description des mécanismes moléculaires de reconnaissance des ligands et de l'activité de signalisation de ces récepteurs constitue un enjeu majeur (32). Ces dernières années, les efforts de recherche en biologie structurale ont abouti à une très forte augmentation du nombre de structures tridimensionnelles de RCPG disponibles (**figure 1**) (15). Ces structures de RCPG en complexe avec divers partenaires représentent des minima énergétiques d'un paysage conformationnel complexe et la caractérisation de la dynamique des récepteurs est également critique pour la compréhension de leur activité (32). Lors de cette thèse, nous avons étudié deux RCPG dont les ligands endogènes sont des agonistes peptidiques : le récepteur κ opioïde KOP dont le ligand naturel est la dynorphine, et le récepteur de la ghréline GHSR. Nous avons mis en place la production de KOP chez *E. coli* avec pour objectif de profiter des possibilités de marquage isotopique de cette bactérie et d'étudier la dynamique du récepteur par RMN en solution. De plus, les interactions RCPG – ligands peptidiques sont mal connues en raison de la difficulté de cristalliser ces complexes (16). Nous avons donc appliqué des expériences de RMN en solution pour caractériser la ghréline liée à son récepteur. Nous avons finalement réalisé des essais préliminaires dans le but d'examiner l'effet d'un mimétique de protéine G sur la dynamique de la dynorphine liée à son récepteur (comparaison des états de basse et haute affinités pour les agonistes).

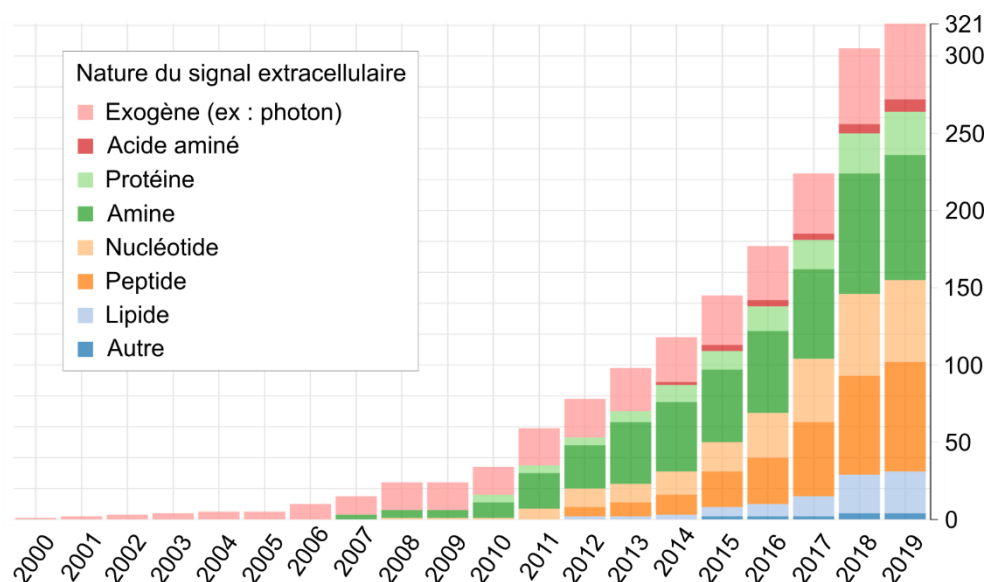


Figure 1. Nombre cumulé de structures 3D déterminées de RCPG par année. Adapté de (15). Il s'agit ici du nombre total de structures incluant plusieurs complexes ligand – récepteur pour un RCPG donné (structures déterminées pour 62 récepteurs distincts en juin 2019 (15)) Les récepteurs sont classés selon la nature de leur signal extracellulaire naturel (et non pas en fonction du ligand utilisé pour la résolution de structure). Les récepteurs notés comme ayant un signal extracellulaire exogène sont les récepteurs visuels, gustatifs et olfactifs.

Production de KOP chez *E. coli* pour l'étude de sa dynamique par RMN.

La production de KOP à partir d'*E. coli* a été réalisée avec la stratégie développée par notre collaborateur Jean-Louis Banères pour GHSR (36, 111). L'expression en corps d'inclusion a été favorisée à l'aide d'une fusion avec la protéine IN5. Cela a permis d'atténuer la toxicité de KOP pour la bactérie et de produire ainsi plusieurs milligrammes de récepteur par litre de culture. Des conditions ont été déterminées afin de solubiliser les corps d'inclusion obtenus, de purifier et renaturer KOP *in vitro* et d'éliminer la protéine de fusion. Le protocole établi permet la purification d'environ deux milligrammes de récepteur par litre de culture dans un milieu minimum permettant les marquages isotopiques. De plus, un test RMN d'interaction avec la dynorphine a montré qu'une fraction significative du récepteur produit en micelles de détergent DDM – CHS est compétente pour la liaison de son ligand. Il sera cependant nécessaire d'ajouter une étape de purification du récepteur fonctionnel et monomérique (chromatographie d'affinité puis d'exclusion de taille) et de déterminer le rendement final obtenu. Ces étapes sont critiques pour une étude de KOP par RMN en solution.

Il devrait être aussi possible d'inclure l'étape d'échange en détergent LMNG – CHS que nous avons mise en place avec KOP purifié à partir de cellules SF9, afin d'améliorer la stabilité du récepteur. Le travail avec le récepteur de la ghréline, avec KOP produit à partir de cellules SF9 et les discussions avec nos collaborateurs m'ont toutefois convaincu de l'intérêt supérieur de la reconstitution en nanodisques lipidiques. Les principales raisons sont une meilleure stabilité des RCPG dans cet environnement (206) et la favorisation de leur interaction avec des partenaires de signalisation tels que les GRK (103). On a aussi souvent observé que l'affinité des ligands pour leur récepteur est plus faible en micelles de détergent qu'en membranes (de 1 à 2 ordre de grandeur), ce qui pose des questions sur l'état conformationnel précis des RCPG en micelles. Avant purification finale par chromatographie d'affinité pour un ligand orthostérique puis par chromatographie d'exclusion de taille, KOP pourrait donc être reconstitué en nanodisques plutôt qu'en micelles LMNG – CHS. Finalement, l'expérience de liaison de ligand radioactif suivie par SPA permettrait la détermination de l'affinité de ligands pour KOP que ce soit en micelles de détergent ou en nanodisques.

La production chez la bactérie permet d'envisager différentes stratégies de marquage isotopique avec l'avantage de pouvoir perdeutérier KOP par expression en milieu M9 deutérié (112, 129). Comme discuté en introduction (paragraphe II. 3.), cette deutériation et les méthodes TROSY (139) et méthyl-TROSY (140) permettent d'améliorer la sensibilité des expériences RMN ainsi que la résolution pour les systèmes de haute masse moléculaire (91, 95, 112, 133, 137, 138).

Une première stratégie serait de réaliser des marquages spécifiques ^{13}C - $^1\text{H}_3$ (avec le récepteur perdeutérié) par ajout d'acides aminés ou de précurseurs marqués au milieu de culture (138, 145). Ces marquages et l'utilisation de la méthyl-TROSY sont particulièrement adaptés pour l'étude de protéines de haute masse moléculaire (137, 142, 143, 146). Cependant, l'attribution devrait vraisemblablement être réalisée par mutagenèse dirigée (71) et la séquence de KOP que nous utilisons compte 20 alanines, 33 isoleucines, 35 leucines et 36 valines. Les expériences pourraient donc se limiter dans un premier temps au marquage ^{13}C - $^1\text{H}_3$ des 12 méthionines de KOP (9 dans le domaine transmembranaire, **figure 2**), marquées par ajout de cet acide aminé au milieu de culture (145). Un inconvénient est qu'il n'y a pas de méthionine sur les hélices 6 et 7 dont la dynamique joue un rôle important dans l'activation des RCPG (71). Il pourrait donc être intéressant de compléter la couverture de séquence par des marquages ^{13}C - $^1\text{H}_3$ supplémentaires et l'attribution d'une partie des signaux correspondants. Une possibilité qui pourrait être testée serait un marquage des isoleucines (par ajout de 2-cétobutyrate au milieu de culture (145)) et l'attribution en priorité des trois isoleucines indiquées dans la **figure 2**. On peut également envisager un marquage uniforme au ^{15}N par ajout de chlorure d'ammonium marqué au milieu de culture (188). En plus de la perspective de l'étude du squelette peptidique du récepteur, il serait possible d'attribuer les signaux des chaînes latérales des 5 tryptophanes de KOP (**figure 2**) qui devraient être bien séparés de ceux des autres groupements NH sur des spectres 2D ^1H - ^{15}N (95).

Ces possibilités de marquage isotopique offrent des perspectives d'étude de la dynamique du récepteur lors de son interaction avec différents types de ligands (agonistes pleins, partiels ou inverses, antagonistes, ligands biaisés). Le nanobody 39 (Nb39) pourrait aussi être utilisé comme mimétique de la protéine G_i , c'est à dire pour la stabilisation du récepteur pleinement activé (54). Les populations de conformations en échange « lent » (*i.e.* avec un temps caractéristique supérieur à 10 ms) pourraient être décrites par l'analyse des signaux de spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-TROSY (91, 140) et 2D ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC (95, 139) comme illustré lors de l'introduction. Des expériences de dispersion de relaxation pourraient être conduites afin de caractériser les mouvements intermédiaires, entre la ms et la μs (108, 150, 151) (il est aussi possible d'utiliser des marquages ^{13}C - $^1\text{H}_1$ - $^2\text{H}_2$ des méthyles (152-154)). Enfin, les mouvements « rapides » de groupements marqués ^{13}C - $^1\text{H}_3$ de KOP pourraient être caractérisés par des expériences de « relaxation violated coherence transfer » (92, 149). Ces expériences permettent de déterminer les paramètres d'ordre de ces méthyles (c'est-à-dire leur amplitude de réorientation sur une échelle de temps inférieure au temps caractéristique de la diffusion

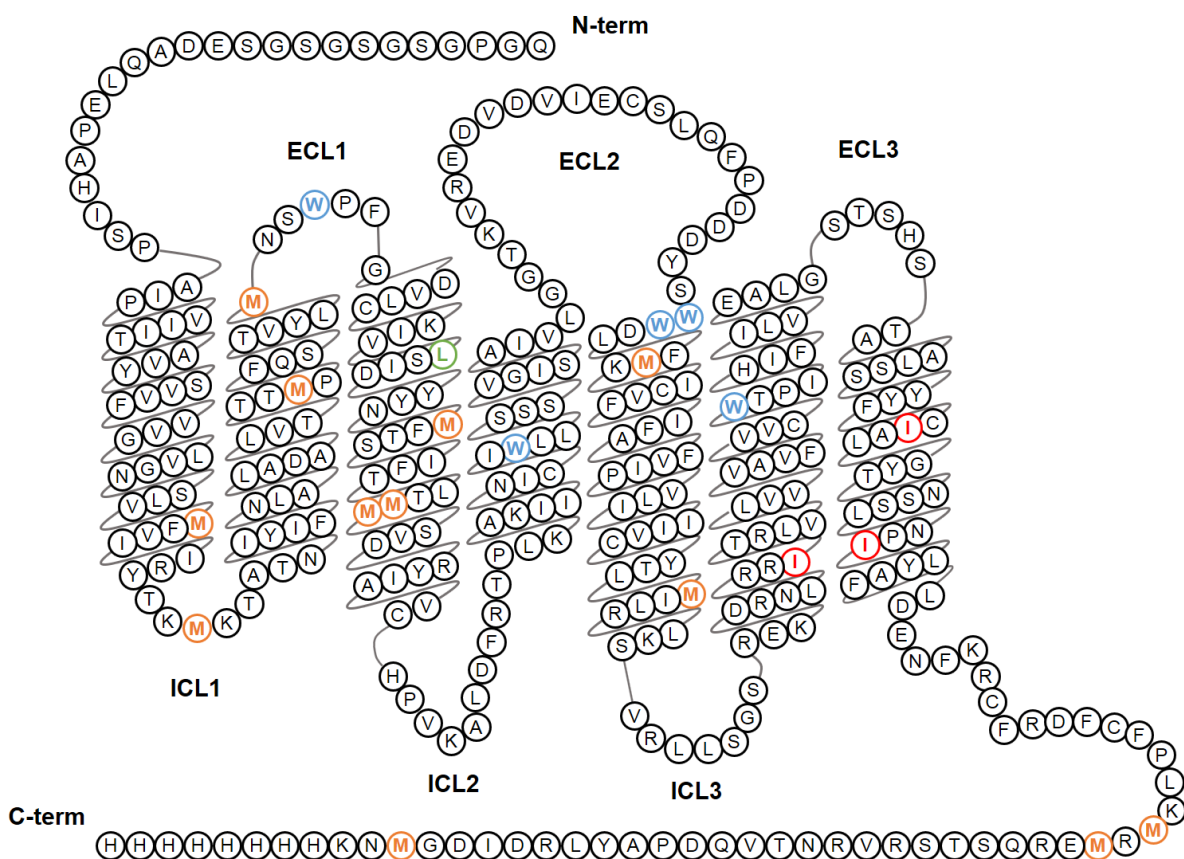


Figure 2. Localisation de marquages isotopiques intéressants sur la séquence de KOP. La séquence présentée est celle du récepteur produit avec le protocole que nous avons mis en place (IN5-KOP₃ après élimination d'IN5). Elle est représentée de façon à faire apparaître les hélices α transmembranaires, les boucles extracellulaires (ECL) et intracellulaires (ICL) ; adapté de (35). Les méthionines sont indiquées en orange, les tryptophanes en bleu et les isoleucines qu'il serait intéressant d'attribuer en priorité en rouge. La mutation stabilisatrice I135^{3,29}L est indiquée en vert.

rotationnelle τ_c , soit ~ 50 ns pour une protéine membranaire en nanodisques MSP1D1 (207)), desquels on peut estimer l'entropie conformationnelle de KOP (104-106). On peut ici noter qu'il est possible d'utiliser des signaux ^1H - ^{13}C non attribués pour l'estimation de l'entropie conformationnelle. Ces résultats pourraient être combinés à des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC) de KOP afin de déterminer les variations d'enthalpie et d'entropie impliquées dans l'interaction du récepteur avec ces différents partenaires (différents types de ligands et Nb39) (104-106). L'objectif serait en particulier de caractériser finement les propriétés thermodynamiques du passage de l'état inactivé de KOP (en présence d'agoniste inverse) à ces intermédiaires d'activation (en présence d'un agoniste) et enfin à son état pleinement activé (en présence d'agoniste et de Nb39). C'est à notre sens une étape cruciale

pour vraiment appréhender les spécificités des interactions entre les RCPG et leurs ligands, ainsi que le mécanisme d'activation des récepteurs.

La RMN contribue largement à la caractérisation des échanges conformationnels responsables de l'activité des RCPG (32, 71) mais les études réalisées jusqu'ici concernent un nombre restreint de récepteurs (β_2 AR, β_1 AR, MOP, A_{2A} AR et BLT2) (71). La caractérisation d'un plus grand nombre de cibles est donc nécessaire et notre travail sur la production de KOP chez *E. coli* s'inscrit dans cette perspective. Il est également important de multiplier les sites des récepteurs dont on sonde la dynamique et d'étudier ces mouvements sur une échelle de temps plus vaste (71). Il est donc essentiel de développer des techniques de marquage isotopique des RCPG (71). L'expression chez la levure (92, 95, 129, 141) ou la bactérie (91, 112) sont prometteuses notamment en raison de la facilité de perdeutériation en comparaison aux cellules d'insecte. Ces systèmes nécessitent cependant un important travail d'optimisation de la production des RCPG et leur utilisation est jusqu'ici limitée (71). L'expression en cellules d'insecte a l'avantage d'avoir été établie pour un nombre important de RCPG (32, 71) et les travaux pour améliorer les possibilités de marquage isotopique dans ce système constituent également une perspective prometteuse (89, 96, 103, 118, 122, 123, 144, 208).

Etude d'agonistes peptidiques liés à leurs récepteurs.

Lors de cette thèse, nous avons également étudié des neuropeptides en interaction avec leur récepteur par RMN en solution. Suite à l'étude de la dynorphine liée à KOP précédemment réalisée dans l'équipe (113), nous avons rédigé une revue (chapitre II (35)) qui récapitule les recherches décrivant les mécanismes moléculaires de l'interaction dynorphine – KOP et leurs implications en physiologie ainsi que pour la conception de nouveaux ligands.

En collaboration avec l'équipe de Jean-Louis Banères, nous avons déterminé la structure et la dynamique de la ghréline dans l'état lié à GHSR grâce à des expériences de NOE transféré et de relaxation ^{15}N (chapitre IV : publication II (114)). Nous avons complété la description de cette interaction en cartographiant la zone de la ghréline impliquée dans la liaison avec des expériences de STD. Ces expériences et celles réalisées avec une forme non-acylée du peptide ont en particulier révélé l'implication de l'acylation post-traductionnelle de la ghréline (en position 3) dans la formation d'un domaine structuré à l'état lié avec les résidus hydrophobes voisins (phénylalanine et leucine en positions 4 et 5). Ces informations structurales ont pu être intégrées à un modèle de dynamique moléculaire gros-grain décrivant le mécanisme de liaison

de la ghréline avec GHSR, et elles sont actuellement utilisées pour la construction d'un modèle tout-atome de ce complexe neuropeptide – récepteur. Ces travaux proposent ainsi une nouvelle lecture de la relation structure – fonction de la ghréline et fournissent des informations pour aider la conception de nouveaux ligands de GHSR.

En collaboration avec l'équipe de Vadim Cherezov, nous avons cherché à examiner l'effet d'un mimétique de protéine G (le nanobody 39) sur la dynamique de la dynorphine liée à son récepteur. La motivation de ces expériences était d'apporter des informations structurales et dynamiques permettant d'expliquer l'amélioration de l'affinité des agonistes pour leur RCPG en présence de protéines G. Les résultats préliminaires obtenus avec le système dynorphine – KOP n'ont pas révélé de différence de dynamique mais, à ce stade, nous ne pouvons pas exclure un défaut d'interaction KOP – Nb39 dans nos expériences.

Nous envisageons aussi de tester l'effet de l'état d'activation de GHSR sur la dynamique et la structure de la ghréline à l'état lié. Pour cela, la mutation A204E qui supprime l'activité constitutive du récepteur (195) sera utilisée pour stabiliser l'état inactif comme nous l'avons fait pour les essais de cristallographie (chapitre III). Nous utiliserons aussi un mimétique de protéine G (protéine G ayant subi différentes délétions et mutations appelée « mini-Gq » (209)) qui est en cours de validation dans l'équipe de Jean-Louis Banères et pourrait permettre de stabiliser l'état pleinement activé de GHSR.

La caractérisation par RMN des ligands liés à leur RCPG est tout à fait complémentaire des études par cristallographie et cryo-microscopie électronique. La combinaison de ces méthodes, dont les résultats peuvent être intégrés grâce à la modélisation moléculaire (voir chapitres II et IV), est nécessaire à la description des mécanismes moléculaires de reconnaissance des ligands. La cristallographie est la méthode qui a permis la résolution de la grande majorité des structures de complexes ligands – RCPG (15, 32, 210). Néanmoins, les récepteurs sont généralement co-cristallisés avec de petites molécules organiques de forte affinité (K_D inférieur à 10 nM) (41, 71). Il y a notamment peu de données cristallographiques disponibles pour les complexes RCPG – agonistes peptidiques. Dans le cas de complexes ternaires ligand – RCPG – protéine G, la récente possibilité de résolution de structure par cryo-microscopie électronique (première structure en mai 2017 (15, 57)) offre des perspectives très prometteuses pour l'étude de ligands tels que les peptides. L'obtention de cristaux n'étant pas nécessaire, cette méthode est en effet moins sensible que la cristallographie à la flexibilité des ligands au sein du complexe (52, 57). Avec la RMN, la flexibilité des ligands liés n'est pas limitante et peut être quantifiée, comme décrit dans les chapitres II, IV et V pour les neuropeptides que nous avons étudiés. Une autre

caractéristique est que la RMN permet la détection d'interactions de faible affinité (K_D supérieur à 100 nM – 1 μ M) et la caractérisation de ligands en échange rapide entre les états lié et libre (71). Enfin, elle est la seule méthode structurale fournissant des données sur les échelles de temps des échanges conformationnels, en solution et à température ambiante.

En plus de la caractérisation de ligands connus, ces méthodes de biologie structurale peuvent elles-mêmes être utilisées dans la conception de nouveaux ligands (210). La RMN, et par exemple l'expérience de STD que nous avons utilisée avec la ghréline (chapitre IV), peut être exploitée pour le criblage de molécules de faible affinité et pour une phase initiale d'amélioration du ligand (167, 211) alors que la cristallographie peut être utilisée pour l'optimisation de ligands d'affinité plus forte (212, 213).

Perspectives générales.

La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'activité des RCPG a beaucoup progressé depuis la résolution des premières structures de la rhodopsine et du récepteur β_2 adrénergique mais de nombreuses questions restent en suspens (17, 32). Notamment, une meilleure compréhension de l'activité des ligands orthostériques (agonistes pleins, partiels ou inverses, antagonistes, ligands biaisés) nécessite la multiplication des informations de structure, de dynamique, de cinétique et de thermodynamique sur les interactions récepteurs – ligands et sur les changements conformationnels des RCPG. Cette question peut également être étendue aux modulateurs allostériques (qui ont un site de liaison distinct du site orthostérique) (5, 18), aux récepteurs hors de la classe A (9, 39) et à l'identification de ligands pour les RCPG « orphelins » (1, 214). Au-delà du mécanisme d'activation des RCPG, une question fondamentale est de décrire le fonctionnement des complexes formés avec leurs partenaires de signalisation en terme de structures et de dynamique (17). Il s'agit en particulier d'accroître les connaissances sur la spécificité de couplage avec les différents types de protéines G, sur la régulation de l'échange GDP / GTP au niveau de la protéine G et sur les interactions avec les GRK et les arrestines. L'étude de ces questions va de pair avec les développements méthodologiques et l'intégration des différentes méthodes de biologie structurale et de biophysique : notamment la RMN (71), la cristallographie (avec les perspectives d'expériences résolues dans le temps à l'aide des faisceaux XFEL) (47, 81), la cryo-microscopie électronique (47, 80) et les techniques de spectroscopie de fluorescence et de bioluminescence (17). Pour ma part je souhaiterais en

particulier explorer la question de la dynamique de complexes de signalisation par RMN en solution mais aussi par RMN du solide où les expériences de rotation à l'angle magique à très haute vitesse offrent des perspectives très prometteuses pour l'étude des protéines membranaires (215-217).

Annexes

Analyse des données RMN de relaxation du ^{15}N et de NOE transféré ^1H - ^1H

Cette annexe présente le cadre dans lequel nous avons analysé les données de relaxation du ^{15}N et de NOE transféré ^1H - ^1H pour l'étude de la ghréline (chapitre IV) et de la dynorphine (chapitre V) liées à leurs récepteurs. La présentation succincte du contexte théorique et des approximations utilisées est en particulier inspirée du cours de Gabrielle Nodet et Martin Blackledge sur la relaxation du ^{15}N (218) et des revues de Beat Vögeli (165) et Marius Clore et Angela Gronenborn (156, 157) respectivement sur l'analyse quantitative de l'effet NOE et le NOE transféré.

Fonction de densité spectrale d'un vecteur ^{15}N - ^1H .

Nous cherchons ici à décrire les mouvements de réorientation d'un vecteur internucléaire \vec{v} entre le ^{15}N et le ^1H d'un groupement amide de la chaîne principale d'un peptide (ou d'une protéine). Cette dynamique peut être décrite par la fonction de corrélation du vecteur \vec{v} au cours du temps t , notée $C^{\vec{v}\vec{v}}(t)$, et sa transformée de Fourier réelle (équation [1]) appelée fonction de densité spectrale $J(\omega)$ (218, 219). Cette dernière décrit la distribution en fréquence (ω) des mouvements de \vec{v} .

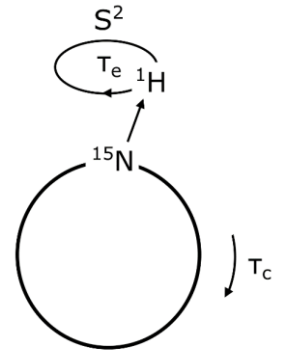
$$J(\omega) = \int_0^{+\infty} C^{\vec{v}\vec{v}}(t) \cos(\omega t) dt \quad [1]$$

On suppose que le mouvement global de la molécule et le mouvement interne de \vec{v} au sein de celle-ci sont indépendants (218, 220). Ces dynamiques sont respectivement décrites par les fonctions de corrélation notées $C_0^{\vec{v}\vec{v}}(t)$ et $C_{int}^{\vec{v}\vec{v}}(t)$. On suppose aussi que la diffusion rotationnelle globale de la molécule est isotrope (218). Le cas d'une diffusion anisotrope ne sera pas abordé ici, mais peut être traité en faisant intervenir le tenseur de diffusion rotationnelle de la molécule et l'orientation du vecteur internucléaire \vec{v} par rapport à ce tenseur (221). La fonction de corrélation s'écrit alors (218, 219) :

$$C^{\vec{v}\vec{v}}(t) = C_0^{\vec{v}\vec{v}}(t) C_{int}^{\vec{v}\vec{v}}(t) \quad \text{avec } C_0^{\vec{v}\vec{v}}(t) = e^{-t/\tau_c} \quad [2]$$

où τ_c est le temps de corrélation rotationnel global de la molécule (*i.e.* le temps moyen pour une rotation de la molécule d'un angle égal à un radian).

Nous utilisons ici le formalisme « model-free » de Lipari et Szabo (219, 222). Ce modèle a la caractéristique de ne pas faire d'hypothèse sur la nature des mouvements, d'où la qualification de « model-free ». La dynamique interne du vecteur internucléaire \vec{v} est décrite par le paramètre d'ordre généralisé S^2 et le temps de corrélation interne effectif τ_e . S^2 caractérise la « restriction » (218) des mouvements internes de \vec{v} : il prend la valeur 1 en l'absence de mouvement et la valeur 0 pour un mouvement entièrement isotrope. Ce modèle reproduit bien les données expérimentales pour des mouvements internes plus rapides que la réorientation globale $\tau_e \ll \tau_c$ et sous la condition $\omega\tau_e \ll 1$ (218). La fonction de corrélation des mouvements internes qui est utilisée est (218, 219) :



$$C_{int}^{\vec{v}\vec{v}}(t) = S^2 + (1 - S^2) e^{-t/\tau_e} \quad [3]$$

La fonction de densité spectrale s'obtient par transformée de Fourier (équation [1]) (218, 219, 223) :

$$J(\omega) = \frac{S^2 \tau_c}{1+(\omega \tau_c)^2} + \frac{(1-S^2) \tau_e'}{1+(\omega \tau_e')^2} \quad \text{avec} \quad \frac{1}{\tau_e'} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e} \quad [4]$$

Sous la condition où $\tau_e \ll \tau_c$ (avec $\tau_e \ll 1$), on peut négliger le terme de droite et on obtient alors la relation ci-après (113, 218). Cette condition $\tau_e \ll \tau_c$ est remplie dans nos expériences caractérisant la dynamique d'un peptide lié à son RCPG dont le τ_c est très élevé (de l'ordre de 50 ns pour une protéine membranaire en nanodisques MSP1D1 à 318 K (207, 224)).

$$J(\omega) = \frac{S^2 \tau_c}{1+(\omega \tau_c)^2} \quad [5]$$

On peut noter que lorsque la condition $\omega\tau_e \ll 1$ n'est pas vérifiée, il est possible d'utiliser le formalisme « model-free » étendu (225) où les mouvements internes « rapides » sont décrits par S_F^2 et τ_F et les mouvements internes « lents » par S_S^2 et τ_S (toujours avec $\tau_S < \tau_c$) (223). Il est ici possible de négliger le troisième terme de $J(\omega)$ (équation [7]) en supposant que τ_F est très petit (218, 223, 225).

$$C_{int}^{\vec{v}\vec{v}}(t) = S_F^2 S_S^2 + S_F^2 (1 - S_S^2) e^{-t/\tau_S} + (1 - S_F^2) e^{-t/\tau_F} \quad \text{et} \quad S^2 = S_F^2 S_S^2 \quad [6]$$

$$J(\omega) = \frac{S_F^2 S_S^2 \tau_c}{1+(\omega \tau_c)^2} + \frac{S_F^2 (1 - S_S^2) \tau_S'}{1+(\omega \tau_S')^2} + \frac{(1 - S_F^2) \tau_F'}{1+(\omega \tau_F')^2} \quad \text{avec} \quad \frac{1}{\tau_S'} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_S} \quad \text{et} \quad \frac{1}{\tau_F'} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_F} \quad [7]$$

Expériences de relaxation du ^{15}N .

Les propriétés de relaxation des spins ^{15}N des groupements amides ^{15}N - ^1H de la chaîne principale d'une protéine ou d'un peptide sont influencées par les mouvements décrits plus haut (de temps caractéristique inférieur ou égal à τ_c). La relaxation de ces spins ^{15}N est dominée par le couplage dipolaire avec le spin ^1H directement lié au spin ^{15}N considéré (terme d^2), et l'anisotropie de déplacement chimique du ^{15}N (terme c^2) (223). On peut approximer l'effet de ces interactions par les termes (223) :

$$d^2 = \frac{\gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2}{10r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \quad \text{et} \quad c^2 = \frac{2}{15} \gamma_N^2 H_0^2 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \quad [8]$$

où γ_H est le rapport gyromagnétique du ^1H , γ_N celui du ^{15}N , r la distance ^1H - ^{15}N , \hbar la constante de Planck réduite, μ_0 la perméabilité magnétique du vide, H_0 l'intensité du champ magnétique et σ_{\parallel} et σ_{\perp} les valeurs propres du tenseur de déplacement chimique du ^{15}N (supposé de symétrie axiale selon le vecteur propre associé à σ_{\parallel}).

La relation entre les vitesses de relaxation du ^{15}N et la fonction de densité spectrale peut alors s'écrire (223) :

$$R_1 = d^2 [3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_N) \quad [9]$$

$$R_2 = \frac{1}{2} d^2 [4J(0) + 3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \\ + \frac{1}{6} c^2 [4J(0) + 3J(\omega_N)] \quad [10]$$

$$\text{hetNOE} = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \frac{d^2 [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)]}{R_1} \quad [11]$$

où R_1 est la relaxation longitudinale, R_2 la relaxation transverse, *hetNOE* le NOE hétéronucléaire ^1H vers ^{15}N , ω_N la fréquence de résonance du ^{15}N et ω_H celle du ^1H (il s'agit des fréquences angulaires en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ avec $\omega = 2\pi\nu$ où ν est en Hz).

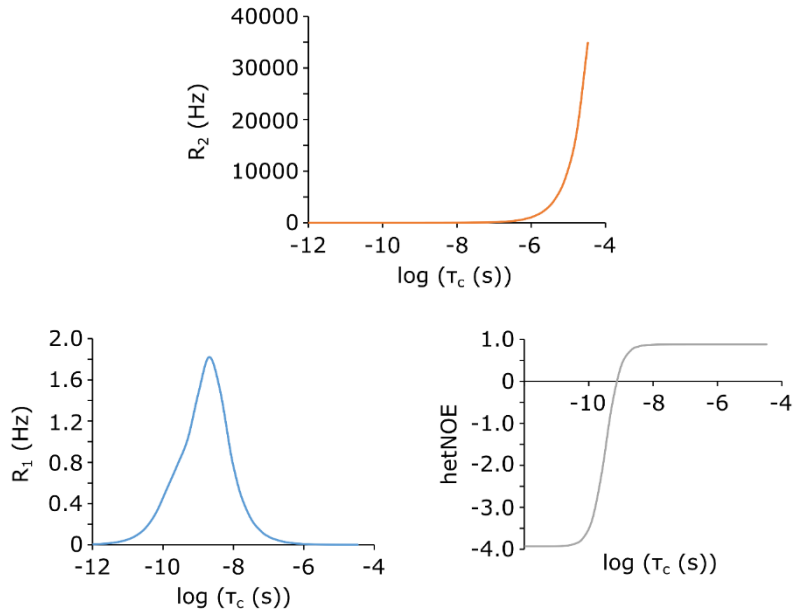
Il est donc possible de caractériser la dynamique d'une protéine ou d'un peptide, au niveau de chaque site marqué ^{15}N de la chaîne principale, en ajustant une fonction de densité spectrale théorique (équation [4] ou [7]) aux paramètres de relaxation ^{15}N mesurés expérimentalement (218, 220, 223). Cela permet d'extraire les paramètres décrivant la dynamique interne du vecteur internucléaire \vec{v} (S^2 et τ_e dans le cas de l'équation [4]) (223). Lorsque l'on mesure les paramètres R_1 , R_2 et *hetNOE*, il est possible de réduire le nombre de variables en supposant que $J(\omega_H) \simeq J(\omega_H - \omega_N) \simeq J(\omega_H + \omega_N)$ (valable pour les molécules pour lesquelles τ_c est

suffisamment élevé, typiquement supérieur à 1 ns) (218, 220). Une des méthodes alternatives est de réaliser les mesures à plusieurs champs H_0 pour échantillonner la fonction $J(\omega)$ en plus de points (220, 226).

Cas d'un ligand peptidique en échange rapide pour la liaison à son RCPG.

Dans les expériences que nous avons réalisées avec la ghréline et la dynorphine en présence de leur récepteur (respectivement en nanodisques et en micelles de détergent), nous avons observé une variation des déplacements chimiques des ligands peptidiques en fonction du rapport molaire récepteur/ligand (avec un large excès stœchiométrique de ligand). Ceci est caractéristique d'un échange rapide entre les formes liée et libre sur l'échelle de temps des déplacements chimiques, soit une constante cinétique de dissociation k_{off} supérieure ou égale à $\sim 10^3$ Hz (113, 227, 228). L'affinité de ces peptides K_D est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} M dans nos conditions expérimentales (voir chapitres III et IV), et les constantes cinétiques d'association k_{on} entre protéines vont de 10^3 à 10^{10} $M^{-1}.s^{-1}$ (229). Si on considère un équilibre de liaison en une étape, on a $K_D = k_{off}/k_{on}$ et il faut donc une association rapide (k_{on} de l'ordre de 10^9 à 10^{10} $M^{-1}.s^{-1}$) pour remplir la condition d'échange rapide avec les affinités observées. Ceci peut être par exemple dû à une attraction électrostatique entre le ligand et son récepteur (la ghréline et la dynorphine étant positivement chargées et les boucles extracellulaires de leur récepteur négativement chargées) ou encore à une interaction non-spécifique du ligand avec les nanodisques ou les micelles avant liaison au récepteur (association en plusieurs étapes) (113, 230). Des expériences de suivi de liaison par fluorescence résolu dans le temps pourrait être testées avec pour objectif de déterminer les constantes cinétiques de cet échange, et ce dans des conditions proches de celles des expériences RMN (230).

Dans ces conditions d'échange rapide, la valeur mesurée des paramètres de relaxation est la moyenne entre les états lié et libre, pondérée par les fractions $x^{lié}$ et x^{libre} (avec $x^{lié}$ de 0.001 à 0.01) (109, 113). A la différence de R_1 et *hetNOE*, la relaxation transverse R_2 dépend de $J(0)$ selon l'équation [10]. Comme le τ_c du récepteur en nanodisques ou en micelles de détergent est supérieur à celui du ligand libre de plusieurs ordres de grandeur, on a alors $R_2^{lié} \gg R_2^{libre}$ et $R_2^{lié}$ contribue donc au R_2 moyen mesuré (113, 228). Ce point est illustré ci-après par les simulations de R_2 , R_1 et *hetNOE* en fonction de τ_c .

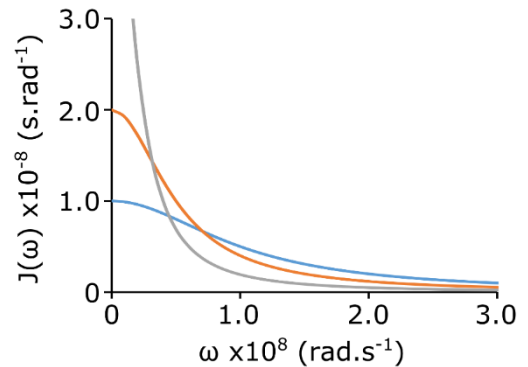


Calculs de R_2 , R_1 et $hetNOE$, en fonction de τ_c avec les équations [5] et [9 à 11] pour $S^2 = 1$ et $\nu_H = 700 \text{ MHz}$. Ces graphes montrent que seul R_2 présente une forte sensibilité aux mouvements lents tels qu'observés avec un RCPG en nanodisques lipidiques ou en micelles de détergent (du fait de la dépendance de R_2 à $J(0)$). L'effet NOE ^1H - ^1H , qui n'est pas représenté ici, possède lui aussi une dépendance à $J(0)$ (voir équation [16] ci-après).

Dans les expériences que nous avons réalisées, les R_2 des ligands peptidiques ont été mesurés en bloquant ou non le site orthostérique du récepteur par un compétiteur. L'échantillon avec compétiteur permet de soustraire la contribution de la liaison non-spécifique et de la forme libre. De plus, on choisit un rapport molaire récepteur / ligand où on observe une augmentation significative du R_2 mesuré (due à la contribution de $R_2^{lié}$). On a alors (113) :

$$\Delta R_2 = R_2(\text{sans compétiteur}) - R_2(\text{avec compétiteur}) \approx x^{lié} R_2^{lié} \quad [12]$$

La mesure de ΔR_2 fournit finalement des informations sur la dynamique du peptide lié. En effet, on remarque d'après l'équation [5], qu'avec l'augmentation de τ_c , $J(0)$ devient dominante devant $J(\omega_N)$ et $J(\omega_H)$ (pour $\omega\tau_c \gg 1$). Ce point est illustré ci-contre par le tracé de $J(\omega)$ simulée avec l'équation [5] ($S^2 = 1$) pour $\tau_c = 10 \text{ ns}$ (courbe bleue), 20 ns (courbe orange) et 50 ns (courbe grise). Les courbes sont représentées



pour ω inférieur à ω_N et ω_H pour des raisons de lisibilité ($J(\omega)$ est monotone et décroissante). Les τ_c des récepteurs KOP (en micelles) (113) et GHSR (en nanodisques) sont très élevés dans les conditions que nous avons utilisées. $R_2^{lié}$ est donc largement dominé par la contribution de $J(0)$ et on peut faire l'approximation suivante à partir des équations [10] et [5] (113) :

$$\Delta R_2 \approx x^{lié} R_2^{lié} \approx x^{lié} \left(\frac{1}{2} d^2 + \frac{1}{6} c^2 \right) 4J(0) \approx x^{lié} \left(\frac{1}{2} d^2 + \frac{1}{6} c^2 \right) 4 \tau_c^{lié} S_{lié}^2 \quad [13]$$

La différence de relaxation transverse ΔR_2 est donc proportionnelle à $S_{lié}^2$ (113, 228). La mesure de ΔR_2 pour plusieurs groupements amides marqués ^{15}N d'un ligand peptidique permet donc de comparer la dynamique de ce peptide en différents sites de sa chaîne principale et dans l'état lié à son récepteur. Cette propriété a été utilisée pour caractériser la dynamique de la dynorphine liée à KOP (113) (voir aussi chapitre V) et de la ghréline liée à GHSR (chapitre IV).

Dispersion de relaxation du ^{15}N .

En plus de l'effet de la dynamique « rapide » (avec un temps caractéristique inférieur ou égal à τ_c), la relaxation transverse peut aussi être influencée par des échanges (conformationnels ou chimiques) sur une échelle de temps que l'on qualifie d'intermédiaire : avec un temps caractéristique τ_{ex} proche de $\sim 10^{-3}$ s (108, 109). Cette dynamique contribue à la relaxation transverse effective R_2^{eff} par un terme R_2^{ex} (contribution à $J(0)$) (218, 220) qui est fonction de la différence de fréquence de résonance du spin considéré dans les états en échange ($\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu$) et de la vitesse d'échange $k_{ex} = 1/\tau_{ex}$.

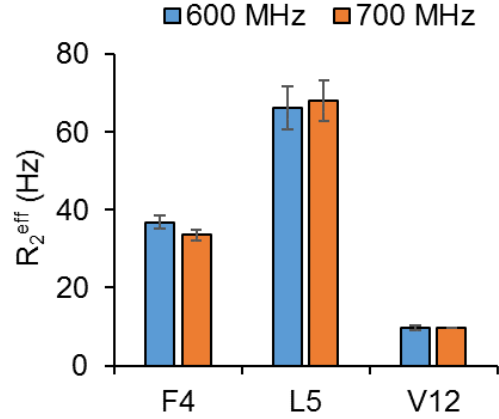
Les mesures de R_2 ^{15}N que nous avons effectuées avec la ghréline et la dynorphine ont été réalisées par régression mono-exponentielle de l'intégrale de signaux 2D ^{15}N - ^1H HSQC en fonction d'un délai de relaxation appliqué à la magnétisation transverse ^{15}N . La contribution R_2^{ex} peut être atténuée voire éliminée grâce à l'application de la séquence CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) où des impulsions de refocalisation sont répétées à l'intervalle de temps τ_{CPMG} au cours du délai de relaxation ^{15}N (109, 231). Cette séquence a été utilisée pour les mesures de R_2 que nous avons réalisées avec $\tau_{CPMG} = 900 \mu\text{s}$ (valeur minimale applicable avec la sonde utilisée, l'objectif étant de limiter la contribution d'un éventuel échange « intermédiaire »).

Plusieurs modèles permettent de décrire R_2^{eff} en fonction de $\Delta\omega$, k_{ex} et τ_{CPMG} (109, 231, 232) et si l'on considère deux états en échange rapide ($\Delta\nu < k_{ex}$), on a :

$$R_2^{eff} = R_2 + R_2^{ex} = R_2 + \frac{p_A p_B \Delta\omega^2}{k_{ex}} \left(1 - \frac{2 \tanh k_{ex} \tau_{CPMG}}{2k_{ex} \tau_{CPMG}}\right) \quad [14]$$

où p_A et p_B sont les populations de chaque état.

Dans l'équation [14], on peut remarquer que R_2^{eff} est proportionnel à $\Delta\omega^2$. Une possibilité pour mettre en évidence la contribution d'un échange « intermédiaire » à la relaxation transverse est donc de mesurer R_2^{eff} à plusieurs champs H_0 . Ces mesures ont été effectuées lors d'expériences préliminaires avec la ghréline en présence de son récepteur à 600 et 700 MHz (ν_H) et avec $\tau_{CPMG} = 900 \mu s$ (dans les mêmes conditions que décrites



dans le chapitre IV ; avec la ghréline marquée ^{15}N sur F4, L5 et V12 à 1.37 mM et un rapport molaire récepteur / peptide de 0.0015). Le résultat présenté ci-contre n'a pas mis en évidence de contribution R_2^{ex} majeure aux R_2^{eff} mesurés dans ces conditions. Aussi, nous n'avons pas poursuivi dans cette direction à l'heure actuelle. Néanmoins, la variation de champ H_0 que nous avons testée est relativement faible ($[700/600]^2 \approx 1.36$) et il serait intéressant de mesurer la relaxation transverse ^{15}N à 900-1000 MHz afin de pouvoir observer une éventuelle contribution R_2^{ex} plus faible. On pourrait aussi effectuer ces mesures pour plusieurs valeurs de τ_{CPMG} car R_2^{ex} augmente avec τ_{CPMG} et atteint son maximum en l'absence d'impulsion de refocalisation.

Expériences de NOE transféré 1H - 1H .

Les expériences de NOESY homo-nucléaires 1H - 1H peuvent être analysées à partir de la forme généralisée des équations de Solomon (équation [15] ci-après) (165). L'effet Overhauser nucléaire (effet NOE) y est décrit à partir des composantes selon z des opérateurs des n spins composant le système, à l'instant t (I_z) au cours du « temps de mélange » et à l'équilibre (I_z^0). Cette équation fait intervenir une matrice de relaxation \mathbf{R} où un spin est associé à un terme de relaxation propre (éléments diagonaux ρ) et des termes de relaxation croisée avec chacun des autres spins du système (éléments non-diagonaux σ).

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} I_{1,z} - I_{1,z}^0 \\ I_{2,z} - I_{2,z}^0 \\ I_{n,z} - I_{n,z}^0 \end{bmatrix} = -\mathbf{R} \begin{bmatrix} I_{1,z} - I_{1,z}^0 \\ I_{2,z} - I_{2,z}^0 \\ I_{n,z} - I_{n,z}^0 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \rho_1 & \sigma_{1,2} & \sigma_{1,n} \\ \sigma_{2,1} & \rho_2 & \sigma_{2,n} \\ \sigma_{n,1} & \sigma_{n,1} & \rho_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I_{1,z} - I_{1,z}^0 \\ I_{2,z} - I_{2,z}^0 \\ I_{n,z} - I_{n,z}^0 \end{bmatrix} \quad [15]$$

La vitesse de relaxation croisée σ entre deux spins ^1H est fonction de la distance entre ces spins (dépendance en r^{-6} , voir ci-après) et permet donc d'obtenir des informations pour la détermination de structures 3D (165). Elle dépend aussi de la dynamique du vecteur internucléaire \vec{u} entre les deux spins considérés, qui peut être décrite par une fonction de densité spectrale $J(\omega)$ comme dans le cas du vecteur \vec{v} ^{15}N - ^1H et de la relaxation du ^{15}N .

Si l'on considère que $\omega_1 \approx \omega_2$ (expériences homo-nucléaires ^1H - ^1H), on a (165) :

$$\sigma_{\vec{u}} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10} \frac{1}{r^6} [6J(2\omega) - J(0)] \quad [16]$$

où μ_0 est la perméabilité magnétique du vide, γ le rapport gyromagnétique du ^1H , \hbar la constante de Planck réduite et r la distance ^1H - ^1H .

Pour des molécules suffisamment simples où des spectres NOESY de très bonne qualité peuvent être obtenus (*i.e.* avec des signaux observables pour la plupart des paires de spins du système et peu de recouvrements entre ces signaux), il est possible de déterminer les vitesses de relaxation croisée σ à partir de l'équation [15] (158, 159, 165). On utilise pour cela l'équation suivante où $\mathbf{I}(t)$ est la matrice formée par l'intégrale des signaux des différentes paires de spins du système, en fonction du temps de mélange t :

$$\mathbf{I}(t) = \mathbf{I}(0)e^{-\mathbf{R}t} \quad [17]$$

Lorsque les données issues des expériences NOESY ne permettent pas de déterminer suffisamment d'éléments de la matrice $\mathbf{I}(t)$, il est possible d'utiliser l'approximation de la paire de spins isolée (113, 165) où on analyse chaque paire de spins séparément en ne retenant que les termes correspondant de l'équation [15]. Cela a été le cas avec la ghréline pour laquelle nous avons analysé les données NOESY à plusieurs temps de mélange t par régression de l'intégrale des différents signaux $I(t)$ avec la fonction ci-après (où les valeurs absolues de $I(t)$ et σ ont été utilisées). Cela a permis d'obtenir les courbes de « build-up » présentées dans le chapitre IV et de déterminer les vitesses de relaxation croisée σ correspondantes.

$$I(t) = a e^{-(\rho-\sigma)t} (1 - e^{-2\sigma t}) \quad [18]$$

où a est un facteur d'amplitude indépendant de t .

Comme précédemment décrit dans le cas d'un vecteur $^{15}\text{N}-^1\text{H}$, la fonction de densité spectrale de \vec{u} peut être décrite par le formalisme de Lipari et Szabo (165). Pour une molécule rigide en diffusion rotationnelle isotrope, l'équation [16] devient alors (156, 157) :

$$\sigma_{\vec{u}} = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10} \frac{1}{r^6} \left[\tau_c - \frac{6\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad [19]$$

On peut ici noter que $\sigma_{\vec{u}}$ s'annule pour $\omega\tau_c \approx 1.12$ (τ_c de l'ordre de 10^{-10} s, soit un τ_c inférieur à celui de la ghréline ou de son récepteur) (156). Au contraire, nous avons vu que $J(0)$ devient dominante lorsque τ_c augmente (avec $\omega\tau_c \gg 1$), et on peut alors écrire la relation suivante où $|\sigma_{\vec{u}}|$ augmente avec τ_c (165) :

$$\sigma_{\vec{u}} = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10} \frac{1}{r^6} [\tau_c] \quad [20]$$

Comme pour les R_2 ^{15}N , la relaxation croisée $^1\text{H}-^1\text{H}$ de la ghréline libre ($\sigma_{\vec{u}}^{libre}$) est donc très inférieure à celle du peptide lié au récepteur ($\sigma_{\vec{u}}^{lié}$) (en valeur absolue) (113, 156). En conditions d'échange rapide, on mesure une relaxation croisée moyenne entre les états lié et libre pondérée par les fractions $x^{lié}$ et x^{libre} (113, 157). Comme $\sigma_{\vec{u}}^{lié} \gg \sigma_{\vec{u}}^{libre}$ il est alors possible de mesurer $\Delta\sigma_{\vec{u}}$ pour accéder à $\sigma_{\vec{u}}^{lié}$:

$$\Delta\sigma_{\vec{u}} = \sigma_{\vec{u}}(\text{sans compétiteur}) - \sigma_{\vec{u}}(\text{avec compétiteur}) \approx x^{lié} \sigma_{\vec{u}}^{lié} \quad [21]$$

Nous avons jusqu'ici considéré le cas d'une molécule rigide mais la relaxation croisée est aussi influencée par les mouvements internes du vecteur internucléaire \vec{u} (165). Il s'agit ici à la fois de la dynamique de temps caractéristique inférieur à τ_c (associée au paramètre d'ordre S^2 décrit plus haut) et de celle de temps caractéristique supérieur à τ_c . Lorsque $\omega\tau_c \gg 1$ (ce qui est le cas pour la ghréline liée à son récepteur) et si on suppose que la diffusion rotationnelle globale est isotrope, on peut écrire la relation suivante où la dynamique interne de \vec{u} est décrite par la distance effective r_{eff} qui est fonction de S_{NOE}^2 , S^2 et τ_{int} (165) :

$$\sigma_{\vec{u}} = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10} \frac{1}{r_{eff}^6} [\tau_c] \quad [22]$$

$$\text{avec } r_{eff} = \frac{r_{rigide}}{\sqrt[3]{S_{NOE}}} \quad \text{et} \quad S_{NOE}^2 = S^2 + \left(r_{rigide}^6 \left\langle \frac{1}{r^6} \right\rangle - S^2 \right) \frac{1}{1+\tau_c/\tau_{int}} \quad [23]$$

On peut remarquer ici que la présence d'une dynamique interne importante de \vec{u} ($S_{NOE}^2 < 1$) aboutit à $r_{eff} > r_{rigide}$ et finalement à une valeur absolue de $\sigma_{\vec{u}}$ diminuée. L'observation du

signal NOESY correspondant nécessite donc un certain degré de restriction des mouvements de \vec{u} .

Lorsque l'on peut mesurer précisément τ_c (à partir de mesures de relaxation du ^{15}N), il est possible de déterminer r_{eff} à partir de σ et finalement de relier r_{eff} à la distance moyenne entre les deux spins d'intérêt (165). On fait alors l'hypothèse que l'effet des mouvements internes est négligeable ($r_{eff} = r$), ou que tous les mouvements internes sont lents ($r_{eff} = \langle \frac{1}{r^6} \rangle^{-1/6}$) ou enfin qu'ils sont rapides ($r_{eff} = \langle \frac{1}{r^3} \rangle^{-1/3}$) (par exemple dans le cas des mouvements internes des CH_3).

Dans le cas de la ghréline liée à son récepteur, nous ne pouvons pas déterminer précisément le τ_c du récepteur (et donc le $\tau_c^{lié}$ du peptide) et nous avons donc réalisé une analyse semi-quantitative des données NOESY (chapitre IV). Du fait de la variation en $1/r^6$ de $\Delta\sigma$, l'observation d'un signal pour une paire de spins donnée indique que la distance internucléaire est relativement faible (typiquement inférieure à 5 - 6 Å) (233). Les vitesses de relaxation croisée obtenues à partir des courbes de build-up en présence ou non du compétiteur orthostérique ont donc été utilisées pour déterminer des contraintes de distance, appliquées lors du calcul de structure sous la forme d'un potentiel énergétique « à fond plat » entre 1.8 Å (distance ^1H - ^1H minimale) et une limite haute déterminée à partir de $\Delta\sigma$.

Pour le vecteur \vec{u} entre le proton porté par le carbone α (H_α) d'un résidu et celui porté par l'azote de la chaîne principale (H_N) d'un résidu distinct (noté i), la distance internucléaire $r_{\vec{u}}$ a été estimée avec la relation ci-dessous et à partir d'une référence interne.

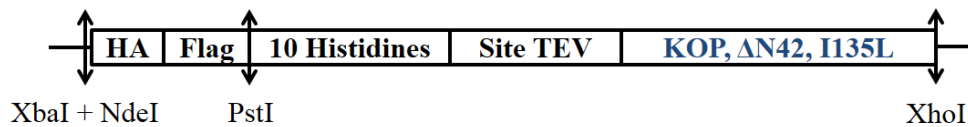
$$r_{\vec{u}} \approx r_{\vec{w}} \left(\frac{\Delta\sigma_{\vec{w}}}{\Delta\sigma_{\vec{u}}} \right)^{1/6} \quad [24]$$

Cette référence est le vecteur \vec{w} entre le H_α et le H_N du résidu i (avec la distance internucléaire intra-résidu $r_{\vec{w}}$ prise comme égale à 2.75 Å). Le choix de cette référence permet de prendre en compte la dynamique locale de la ghréline liée à son récepteur (dont on sait qu'elle est variable au long de la séquence du peptide) en postulant que \vec{u} et \vec{w} sont animés de mouvements comparables. Selon l'estimation obtenue de $r_{\vec{u}}$, la limite haute de la contrainte correspondante a été fixée à 2.5, 3.0 ou 4.0 Å (233). Pour les autres paires de spins, cette limite a été fixée à 5.0 Å (233) en l'absence de référence interne adéquate.

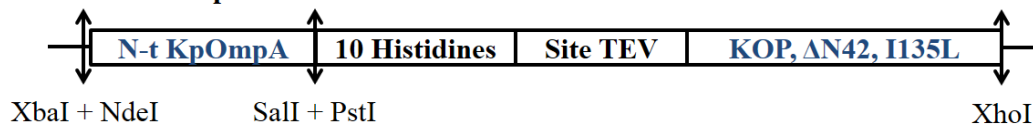
Stratégie de clonage pour l'expression de KOP chez *E. coli*

Les constructions utilisées pour la mise en place de l'expression de KOP chez *E. coli* sont présentées ci-dessous et annotées avec les sites de restriction utilisés. La construction KOP-SF9 est celle utilisée par l'équipe de Ray Stevens pour l'expression du récepteur en cellules SF9 et contient : des étiquettes HA, Flag et poly-histidine, un site de clivage à la TEV et le récepteur κ opioïde humain délété de 42 acides aminés en N-terminal et portant la mutation stabilisatrice I135^{3.29}L. N-t KpOmpA désigne la partie N-terminale de la Outer membrane protein A de *Klebsiella pneumoniae*. IN5 désigne un fragment de la sous-unité 5 α de l'intégrine.

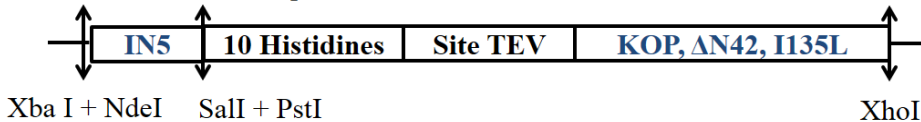
Construction KOP-SF9



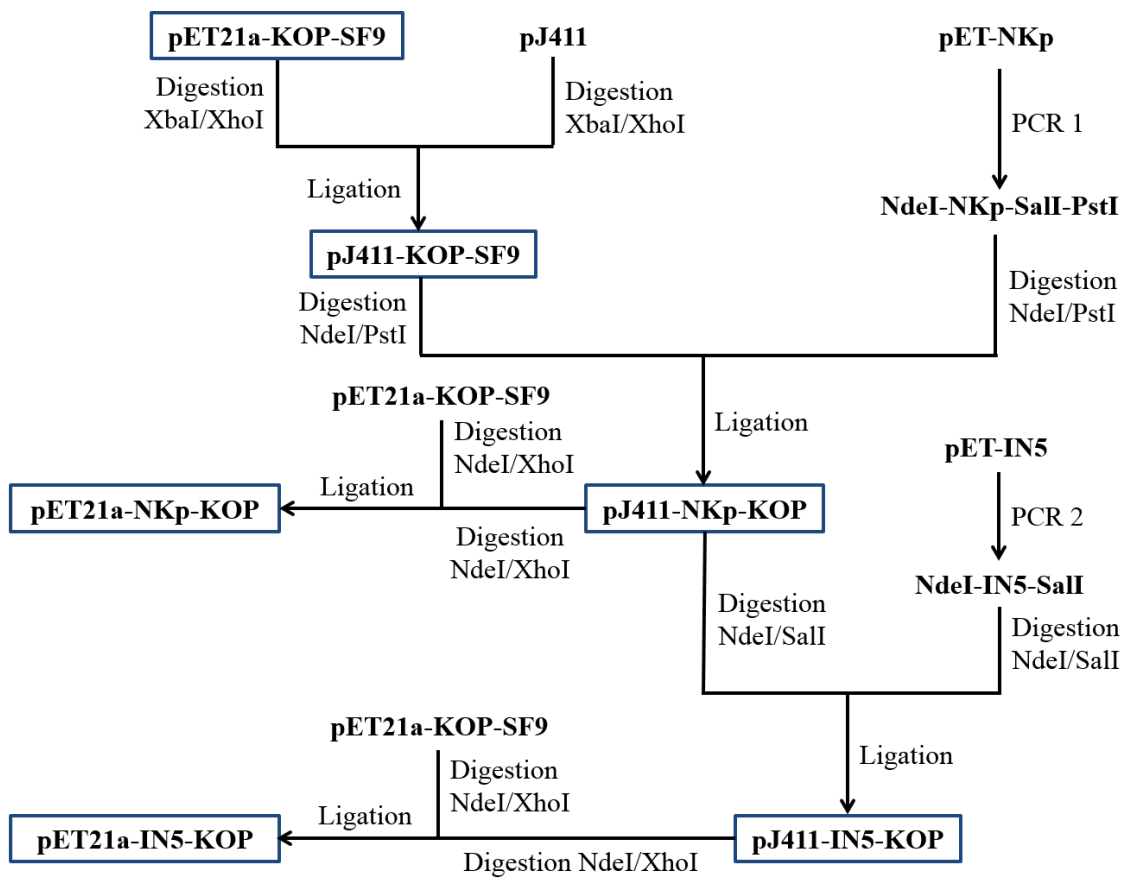
Construction NKp-KOP



Construction IN5-KOP₁



La figure présentée à la page suivante schématise la stratégie de clonage ayant permis l'obtention de ces constructions ainsi que leur insertion dans les vecteurs pJ411 et pET21a. Les constructions finales utilisées IN5-KOP₂ et IN5-KOP₃ correspondent à un gène synthétique fourni par Eurofins genomics et conçu à partir des résultats obtenus avec la construction IN5-KOP₁.



PCR 1 et PCR 2 ont permis de flanquer les gènes amplifiés de site de restriction adéquat.

PCR 1 réalisée avec les amorces

sens : 5'-GGAGATATACATATGGCTAGAAATTATGAAAGCAATTTTCG-3' (Site NdeI)

anti-sens : 5'-GCATGGTCTGCAGGTCGACAACCGGTGCAGCATCTTCCTGACCG-3' (Sites PstI et SalI)

PCR 2 réalisée avec les amorces

sens : 5'-GGAGATATACATATGGGCCAGATCCTGTCTGCC-3' (Site NdeI)

anti-sens : 5'-TCTGCAGGTCGACCCGCTCCTCTGGGTTGAACATGG-3' (Site SalI)

Séquence des protéines produites dans cette thèse

KOP-SF9 (chapitre III)

```

1   MKTIIALSYI FCLVFADYKD DDDAKLQTMH HHHHHHHHHHE NLYFQGGTTM
51  GSEDAQLEPA HISPAIPVII TAVYSVVFVV GLVGNSLVMF VIIRYTKMKT
101 ATNIYIFNLA LADALVTTTM PFQSTVYLMN SWPFGDVLCK IVLSIDYYNM
151 FTSIFTLTMM SVDRYIAVCH PVKALDFRTP LKAKIINICI WLLSSSVGIS
201 AIVLGGTKVR EDVDVIECSL QFPDDDYSWW DLFMKICVFI FAFVIPVLII
251 IVCYTLMILR LKSVRLLSGS REKDRNLRRI TRLVLVVVVAV FVVCWTPIHI
301 FILVEALGST SHSTAALSSY YFCIALGYTN SSLNPILYAF LDENFKRCFR
351 DFCFPLKMRM ERQSTSRVRN TVQDPAYLRD IDGMNKPV

```

Etiquettes HA, Flag, Histidine et site TEV.

	Avant clivage	Après clivage TEV
Taille (nb. de résidus)	388	343
Masse molaire (g/mol)	44281	38761
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	51530	47570
Point isoélectrique	8.01	8.63

NKp-KOP (chapitre III)

```

1   MARIMKAIFV LNAAPKDNTW YAGGKLGWSQ YHDTGFYGNG FQNNNGPTRN
51  DQLGAGAFGG YQVNPYLGFE MGYDWLGRMA YKGSVDNGAF KAQGVQLTAK
101 LGYPITDDLD IYTRLGGMVW RADSKGNYAS TGVSRSEHDT GVSPVFAGGV
151 EWAVTRDIAT RLEYQWVNNI GDAGTVGTRP DNGMLSLGVS YRFGQEDAAP
201 VVDLQTMHHH HHHHHHHENL YFQGGTTMGS EDAQLEPAHI SPAIPVIITA
251 VYSVVFVVGL VGNSLVMFVI IRYTKMKTAT NIYIFNLALA DALVTTTTMPF
301 QSTVYLMNSW PFGDVLCKIV LSIDYNMFT SIFTLTMMSV DRYIAVCHPV
351 KALDFRTPLK AKIINICIWL LSSSVGISAI VLGGTKVRED VDVIECSLQF
401 PDDDYSWWDL FMKICVFIFA FVIPVLIIIV CYTLMILRLK SVRLLSGSRE
451 KDRNLRRRITR LVLVVVAVFV VCWTPIHIFI LVEALGSTSH STAALSSYYF
501 CIALGYTNSS LNPILYAFLD ENFKRCFRDF CFPLKMRMER QSTSRVRNTV
551 QDPAYLRDID GMNKPV

```

Domaine N-terminal de OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, étiquette poly-histidine, et site TEV.

	Avant clivage	Après clivage TEV
Taille (nb. de résidus)	566	344
Masse molaire (g/mol)	63377	38892
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	101355	48985
Point isoélectrique	7.61	8.63

IN5-KOP₁ (chapitre III)

```

1   MGQILSATQE QIAESYYPEY LINLVQGQLQ TRQASSIYDD SYLGYSVAVG
51  EFSGDDTEDE VAGVPKGNLT YGYVTILNGS DIRSLYNFSG EQMASYFGYA
101 VAATDVNGDG LDDLLVGAPL LMDRTPDGRP QEVGRVYVYL QHPAGIEPTP
151 TLTLTGHDEF GRFGSSLTPL GDLDQDGYND VAIGAPFGGE TQQGVVVFVP
201 GPGGGLGSKP SQVLQPLWAA SHTPDDFFGSA LRGGRDLGDN GYPDLIVGSF
251 GVDKAVVYRG RPIVSASASL TIFPAMFNPE ERVDLQTMHH HHHHHHHHEN
301 LYFQGGTMMG SEDAQLEPAH ISPAIPVIIT AVYSVVFVVG LVGNLSVMFV
351 IIRYTKMKTA TNIYIFNLAL ADALVTTTTP FQSTVYLMNS WPFQDVLCKI
401 VLSIDYINMF TSIFTLTMS VDRYIAVCHP VKALDFRTPL KAKIINICIW
451 LLSSSVGISA IVLGGTKVRE DVDVIECSLQ FPDDDISWWD LFMKICVFIF
501 AFVIPVLI III VCYTLMILRL KSVRLLSGSR EKDRNLRRIT RLVLVVAVF
551 VVCWTPIHIF ILVEALGSTS HSTAALSSYY FCIALGYTNS SLNPILYAFL
601 DENFKRCFRD FCFPLKMRME RQSTSRVRNT VQDPAYLRDI DGMNKPV

```

Fragment de l'intégrine 5 α , étiquette poly-histidine, et site TEV.

	Avant clivage	Après clivage TEV
Taille (nb. de résidus)	647	344
Masse molaire (g/mol)	71635	38892
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	79815	48984
Point isoélectrique	5.42	8.63

IN5-KOP₂ (chapitre III)

```

1   MGQVLSATQE QIAESYYPEY LINLVQGQLQ TRQASSIYDD SYLGYSVAVG
51  EFSGDDTEDE VAGVPKGNLT YGYVTILNGS DIRSLYNFSG EQMASYFGYA
101 VAATDVNGDG LDDLLVGAPL LMDRTPDGRP QEVGRVYVYL QHPAGIEPTP
151 TLTLTGHDEF GRFGSSLTPL GDLDQDGYND VAIGAPFGGE TQQGVVVFVP
201 GPGGGLGSKP SQVLQPLWAA SHTPDDFFGSA LRGGRDLGDN GYPDLIVGSF
251 GVDKAVVYRG RPIVSASASL TIFPAMFNPE ERVDGSGSGS LEVLFQGP GS
301 GSGSGSEDAQ LEPAHISPAI PVIITAVYSV VFVVGVLGNS LVMFVIIRYT
351 KMKTATNIYI FNLALADALV TTTMPFQSTV YLMNSWPFGD VLCKIVLSID
401 YYNMFTSIFT LTMSVDRIYI AVCHPVKALD FRTPLKAKII NICIWLLSSS
451 VGISAIVLGG TKVREDVDVI ECLQFPDDD YSWWDLFMKI CVFIFAFVIP
501 VLIIVCYTL MILRLKSVRL LSGSREKDRN LRRITRLVLV VVAVFVVCWT
551 PIHIFILVEA LGSTSHSTAA LSSYYFCIAL GYTNSLNP I LYAFLDENFK
601 RCFRDFCFPL KMRMERQSTS RVRNTVQDPA YLRDIDGMNK PVLENLYFQG
651 HHHHHHHH

```

Fragment de l'intégrine 5 α , site protéase 3C, site TEV et étiquette poly-histidine.

	Avant clivage	Après clivage 3C
Taille (nb. de résidus)	658	360
Masse molaire (g/mol)	72339	40808
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	75020	48850
Point isoélectrique	5.26	8.48

IN5-KOP₃ (chapitre III)

```

1   MGQVLSATQE QIAESYYPEY LINLVQGQLQ TRQASSIYDD SYLGYSVAVG
51  EFSGDDTEDE VAGVPKGNLT YGYVTILNGS DIRSLYNFSG EQMASYFGYA
101 VAATDVNGDG LDDLLVGAPL LMDRTPDGRP QEVGRVYVYL QHPAGIEPTP
151 TLTLTGHDEF GRFGSSLTPL GDLDQDGYND VAIGAPFGGE TQQGVVVFVP
201 GPGGGLGSKP SQVLQPLWAA SHTPDDFFGSA LRGGRDLGDN GYPDLIVGSF
251 GVDKAVVYRG RPIVSASASL TIFPAMFNPE ERVDGSGSGS LEVLFQGPFS
301 GSGSGSEDAQ LEPAHISPAI PVIITAVYSV VFVVGVLVGN LVMFVIIRYT
351 KMKTATNIYI FNLALADALV TTTMPFQSTV YLMNSWPFGD VLCKIVLSID
401 YYNMFTSIFT LTMMSVDRYI AVCHPVKALD FRTPLKAKII NICIWLLSSS
451 VGISAIVLGG TKVREDVDVI ECLSLQFPDDD YSWWDLFMKI CVFIFAFVIP
501 VLIIIVCYTL MILRLKSVRL LSGSREKDRN LRRITRLVLV VVAVFVVCWT
551 PIHIFILVEA LGSTSHSTAA LSSYYFCIAL GYTNSLNPIL LYAFLDENFK
601 RCFRDFCFPL KMRMERQSTS RVRNTVQDPA YLRDIDGMNK HHHHHHHH

```

Fragment de l'intégrine 5 α , site protéase 3C et étiquette poly-histidine.

	Avant clivage	Après clivage 3C
Taille (nb. de résidus)	648	353
Masse molaire (g/mol)	71183	39931
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	78325	48985
Point isoélectrique	5.31	8.63

IN5-KOP-T4L (chapitre III, cristallographie du récepteur produit chez *E. coli*)

```

1   MGQVLSATQE QIAESYYPEY LINLVQGQLQ TRQASSIYDD SYLGYSVAVG
51  EFSGDDTEDE VAGVPKGNLT YGYVTILNGS DIRSLYNFSG EQMASYFGYA
101 VAATDVNGDG LDDLLVGAPL LMDRTPDGRP QEVGRVYVYL QHPAGIEPTP
151 TLTLTGHDEF GRFGSSLTPL GDLDQDGYND VAIGAPFGGE TQQGVVVFVP
201 GPGGGLGSKP SQVLQPLWAA SHTPDDFFGSA LRGGRDLGDN GYPDLIVGSF
251 GVDKAVVYRG RPIVSASASL TIFPAMFNPE ERVDGSGSGS LEVLFQGPFS
301 GSGSGSEDAQ LEPAHISPAI PVIITAVYSV VFVVGVLVGN LVMFVIIRYT
351 KMKTATNIYI FNLALADALV TTTMPFQSTV YLMNSWPFGD VLCKIVLSID
401 YYNMFTSIFT LTMMSVDRYI AVCHPVKALD FRTPLKAKII NICIWLLSSS
451 VGISAIVLGG TKVREDVDVI ECLSLQFPDDD YSWWDLFMKI CVFIFAFVIP
501 VLIIIVCYTL MILRLKSVRL LSGNIFEMLR IDEGLRLKIY KDTEGYTTIG
551 IGHLLTKSPS LNAAKSELDK AIGRNTNGVI TKDEAEKLFN QDVDAAVRGI
601 LRNAKLKPVY DSLDAVRRAA LINMVFQMGE TGVAGFTNSL RMLQQKRWDE
651 AAVNLAKSRW YNQTPNRAKR VITTFRTGTW DAYREKDRNL RRRITRLVLV
701 VAVFVVCWTP IHIFILVEAL GSTSHSTAAL SSSYYFCIALG YTNSSLNPIL
751 YAFLDENFKR CFRDFCFPLK MRMERQSTSH HHHHHHHH

```

Fragment de l'intégrine 5 α , site protéase 3C, fragment du lysozyme du phage T4 (T4L) et étiquette poly-histidine.

	Avant clivage	Après clivage 3C
Taille (nb. de résidus)	787	492
Masse molaire (g/mol)	86849	55597
ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	102275	72935
Point isoélectrique	5.85	9.08

KOP-T4L-SF9 (chapitre III, cristallographie du récepteur produit en cellules SF9)

```

1  MKTIIALSYI FCLVFADYKD DDDAKLQTMH HHHHHHHHHE NLYFQGGTTM
51  GSEDAQLEPA HISPAIPVII TAVYSVVFVV GLVGNSLVMF VIIRYTKMKT
101 ATNIYIFNLA LADALVTTTM PFQSTVYLMN SWPFGDVLCK IVLSIDYYNM
151 FTSIFTLTMM SVDRIYAVCH PVKALDFRTP LKAKIINICI WLLSSSVGIS
201 AIVLGGTKVR EDVDVIECSL QFPDDDYSWW DLFMKICVFI FAFVIPVLII
251 IVCYTLMLILR LKSVRLLSGN IFEMLRIDEG LRLKIYKDTE GYYTIGIGHL
301 LTKSPSLNAA KSELDKAIGR NTNGVITKDE AEKLFNQDVD AAVRGILRNA
351 KLKPVYDSLD AVRRAALINM VFQMGETGVA GFTNSLRMLQ QKRWDEAAVN
401 LAKSRWYNQT PNRAKRVITT FRTGTWDAYR EKDRNLRRIT RLVLVVVAVF
451 VVCWTPIHIF ILVEALGSTS HSTAALSSYY FCIALGYTNS SLNPILYAFL
501 DENFKRCFRD FCFPLKMRME RQSTS

```

Etiquettes HA, Flag, poly-histidine, site TEV, et fragment du lysozyme du phage T4 (T4L).

	Avant clivage	Après clivage TEV
Taille (nb. de résidus)	525	481
Masse molaire (g/mol)	59754	54361
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	77405	72935
Point isoélectrique	8.79	9.07

GHSR-T4L (chapitre III, cristallographie du récepteur produit chez *E. coli*)

```

1  BPGDELLQLF PAPLLAGVTA TCVALFVVGI AGNLLTMLVV SRFRELRTTT
51  NLYLSSMAFS DLLIFLCMPL DLVRLWQYRP WNFGDLLCKL FQFVSESCTY
101 ATVLTITALS VERYFAICFP LRAKVVVTKG RVKLVIFVVIW AVAFCSSAGPI
151 FVLVGVEHEN GTDPWDTNEC RPTEFEVRSG LLTVMVVVSS IFFFLPVFCL
201 TVLYSLIGRK LWRRNIFEML RIDEGLRLKI YKDTEGYYTI GIGHLLTKSP
251 SLNAAKSELD KAIGRNTNGV ITKDEAEKLF NQDVDAAVRG ILRNAKLKPV
301 YDSLDAVRR ALINMVFQMG ETGVAGFTNS LRMLQQKRWD EAAVNLAKSR
351 WYNQTPNRAK RVITTFRTGT WDAYDQNHKQ TVKMLAVVVF AFILCWLPPFH
401 VGRYLFSKSF EPGSLEIIAQI SQYCNLVSFV LFYLSAAINP ILYNIMSKKY
451 RVAVFRLLGF EPFSQRKLST LKDESSRAWT ESSINTHHHH HHHH

```

Fragment du lysozyme du phage T4 (T4L) et étiquette poly-histidine.

	Après clivage
Taille (nb. de résidus)	494
Masse molaire (g/mol)	56249
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	84965
Point isoélectrique	9.34

GHSR (chapitre IV, publication II)

```
1   GSMWNATPSE EPGFNLTLD LDWDASPGND SLGDELLQLF PAPLLAGVTA
51  TCVALFVVGI AGNLLTMLVV SRFRELRTTT NLYLSSMAFS DLLIFLCMPL
101 DLVRLWQYRP WNFGDLLCKL FQFVSECTY ATVLTITALS VERYFAICFP
151 LRAKVVVTKG RVKLVIFVIW AVAFCSAGPI FVLVGVEHEN GTDPWDTNEC
201 RPTEFAVRSG LLTVMVWVSS IFFFLPVFCL TVLYSLIGRK LWRRRRGDAV
251 VGASLRDQNH KQTVKMLAVV VFAFILCWLP FHVGRYLFSK SFEPGSLEIA
301 QISQYCNLVS FVLFYLSAAI NPILYNIMSK KYRVAVFRLR GFEPFSQRKL
351 STLKDESSRA WTESSINTHH HHHH
```

Etiquette poly-histidine.

	Après clivage
Taille (nb. de résidus)	374
Masse molaire (g/mol)	42295
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	70525
Point isoélectrique	8.66

MSP1E3D1 (chapitre IV, publication II)

```
1   GSTFSKLREQ LGPVTQEFWD NLEKETEGLR QEMSKDLEEV KAKVQPYLDD
51  FQKKWQEEME LYRQKVEPLR AELQEGARQK LHELQEKLSL LGGEEMRDRAR
101 AHVDALRTHL APYLDDFQKK WQEEMELYRQ KVEPLRAELQ EGARQKLHEL
151 QEKLSPLGEE MRDRARAHVD ALRTHLAPYS DELRQRLAAR LEALKENGGGA
201 RLAEYHAKAT EHLSTLSEKA KPALEDLRQG LLPVLESFKV SFLSALEEYTT
251 KKLNTQ
```

	Après clivage
Taille (nb. de résidus)	256
Masse molaire (g/mol)	29981
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	26930
Point isoélectrique	5.76

Nanobody 39 (chapitre V)

```
1   MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAGPGSQVQL VESGGGLVVRP GGSRLRLSCVD
51  SERTSYPMGW FRRAPGKERE FVASITWSGI DPTYADSVAD RFTTTRDVAN
101 NTLYLQMNLS KHEDTAVYYC AARAPVGQSS SPYDYDYWGQ GTQVTVSSHH
151 HHHH
```

Séquence pelB et étiquette poly-histidine.

	Avant clivage	Après clivage de pelB
Taille (nb. de résidus)	154	132
Masse molaire (g/mol)	16775	14564
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	30035	28545
Point isoélectrique	6.64	6.38

KOP-BRIL (chapitre V)

```
1  MKTIIALSYI FCLVFADYKD DDDAKLQTMH HHHHHHHHHHE NLYFQGGTTM
51 ADLEDNWETL NDNLKVIEKA DNAAQVKDAL TKMRAAALDA QKATPPKLED
101 KSPDSPEMKD FRHGFDILVG QIDDALKLAN EGKVKEAQAA AEQLKTTRNA
151 YIQKYLGSIS PAIPVIITAV YSVVFVVGLV GNSLVMFVII RYTKMKTATN
201 IYIFNLALAD ALVTTTMPFQ STVYLMNSWP FGDVLCKIVL SIDYYNMFTS
251 IFTLTMMSVD RYIAVCHPVK ALDFRTPLKA KIINICIWLL SSSVGISAIV
301 LGGTKVREDV DVIECSLQFP DDDYSWDLF MKICVFIFAF VIPVLIIIVC
351 YTLMILRRLKS VRLLSGSREK DRNLRRITRL VLVVVAVFVV CWTPIHIFIL
401 VEALGSTSHS TAALSSYYFC IALGYTNSSL NPILYAFLDE NFKRCFRDFC
451 FPLKMRMERQ STS
```

Etiquettes HA, Flag et poly-histidine, site TEV et apocytochrome b₅₆₂ thermostabilisé (BRIL).

	Avant clivage	Après clivage TEV
Taille (nb. de résidus)	463	419
Masse molaire (g/mol)	52504	47111
ε (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	60445	55975
Point isoélectrique	7.20	8.24

Production de KOP chez *E. coli*

Expression de la protéine de fusion IN5-KOP

- Utilisation de bactéries BL21Star transformées par le plasmide pJ411-IN5-KOP₃
- Pré-culture sur la nuit à 37 °C et 300 rpm dans 50 mL de milieu LB avec kanamycine à 30 µg/mL
- Introduction de 500 mL de milieu M9 avec kanamycine à 30 µg/mL dans un erlenmeyer bafflé de 2 L

	Stock		Prélèvement (mL)	Final
M9 5X pH 7,2	Na ₂ HPO ₄	64 g/L	100	1X
	KH ₂ PO ₄	15 g/L		
	NaCl	2,5 g/L		
Glucose 40X	200 g/L		12,5	5 g/L
NH ₄ Cl 25X	50 g/L		20	2 g/L
MgSO ₄ 500X	1 M		1	2 mM
CaCl ₂ 10000X	1 M		0,05	0,1 mM
Oligos 100X	EDTA	5 mg/mL	5	1X
	CaCl ₂ 2 H ₂ O	6 mg/mL		
	CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,44 mg/mL		
	MnCl ₂ 4 H ₂ O	1,2 mg/mL		
	H ₃ BO ₃	0,02 mg/mL		
	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,7 mg/mL		
	FeSO ₄ 7 H ₂ O	6 mg/mL		
	Acide ascorbique	0,2 mg/mL		
Vitamines 1000X	Thiamine (B1)	225,3 mg/mL	0,5	1X
	Riboflavine (B2)	9,01 mg/mL		
	Nicotinamide (B3)	9,01 mg/mL		
	Pyridoxine (B6)	0,90 mg/mL		
	Cobalamine (B12)	0,09 mg/mL		
	Biotine (B7)	9,01 mg/mL		
	Acide pantothénique (B5)	9,01 mg/mL		
	Acide folique (B9)	9,01 mg/mL		
	Acide ascorbique	2,00 mg/mL		
H ₂ O mQ	-		360,95	-

- Inoculation à une DO_{600nm} de 0.1 – 0.2 et culture à 37 °C et 180 rpm
- Lorsque la DO_{600nm} atteint 0.8 – 1, ajout d'IPTG 1 mM et culture à 37 °C et 180 rpm pendant 4 heures
- Centrifugation à 3000 g et 4 °C pendant 30 minutes et congélation du culot

Préparation de PBS sans KCl

- NaCl 80 g/L pour le 10X (137 mM pour le 1X)
- Na₂HPO₄·2H₂O 17.8 g/L pour le 10X (10 mM pour le 1X)
- NaH₂PO₄·2H₂O 2.75 g/L pour le 10X (1.76 mM pour le 1X)
- Ajustement du pH à 7.4

Lyse et fractionnement

- Préparation de 100 mL de **tampon de lyse : PBS 1X pH 7,4 ; EDTA 5 mM ; β-mercaptoéthanol 10 mM ; 5 μL de benzonase, lysozyme 0.1 g/L**
- Ajout de 5-10 mL de tampon de lyse par gramme de culot et resuspension du culot
- Lyse à la french press (1500 psi)
- Ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C (Rotor Ti70, 150000 g)
- Séparation du culot et du surnageant
- Préparation de 100 mL de **tampon de resuspension : PBS 1X pH 7.4, β-mercaptoéthanol 2.8 mM**
- Resuspension du culot dans 20 mL de tampon de resuspension
- Ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C (Rotor Ti70, 150000 g)
- Séparation du culot et du surnageant

Solubilisation des corps d'inclusion (température ambiante)

- Préparation de 100 mL de **tampon de solubilisation : PBS 1X pH 8.4, β-mercaptoéthanol 2.8 mM, SDS 0.8 %, Urée 2 M**
- Resuspension de chaque culot dans 20 mL de tampon de solubilisation
- Incubation sur roue pendant 1 heure
- Ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 30 minutes à 25 °C (Rotor Ti70, 150000 g)
- Séparation du culot et du surnageant

Purification de la protéine de fusion IN5-KOP dénaturée (température ambiante)

- Préparation de la résine TALON
 - Ajout de 8 mL (1 CV = 4 mL) de résine TALON dans une colonne vide
 - Passage du tampon de stockage sans laisser sécher la résine
 - Préparation de 200 mL de PBS 1X pH 8.4
 - Lavage avec 40 mL de PBS 1X pH 8.4
 - Resuspension de la résine dans 8 mL (2 CV) de tampon de solubilisation
- Fixation sur résine TALON
 - Mélange de la résine TALON au surnageant issu de la solubilisation
 - Homogénéisation puis incubation 1 heure à température ambiante et sur roue
 - Dilution par deux par du PBS pH 8.4 1X
 - Préparation de 100 mL de « tampon de solubilisation /2 » = tampon de solubilisation dilué par deux avec du PBS pH 8.4 1X
 - Homogénéisation puis incubation **sur la nuit** à température ambiante et sur roue
 - Introduction du mélange dans la colonne utilisée pour préparer la résine TALON
 - Passage de la fraction non retenue **A1**
 - Ajout de 8 mL (2 CV) de tampon de solubilisation /2 à la colonne et passage dans la fraction **A2**
 - Lavage de la colonne avec 3 x 4 mL (3 CV) de tampon de solubilisation /2 (récupération de la fraction **A3**)
- Elution d'IN5-KOP dénaturée
 - Préparation de 25 mL de **tampon d'élution dénaturant : PBS 1X pH 8.4, β -mercaptoéthanol 1.4 mM, SDS 0.4 %, Urée 1 M, Imidazole 380 mM**
 - Ajout de 4 mL (1 CV) de tampon d'élution dénaturant, homogénéisation puis incubation 30 minutes sur roue
 - Récupération de la fraction correspondante (**B1**)
 - Ajout de 4 x 4 mL (4 CV) de tampon d'élution dénaturant et récupération des fractions correspondantes (**B2, B3, B4, B5**)
 - Suivi par SDS-PAGE et mélange des fractions choisies

Clivage d'IN5 (température ambiante)

- Conditions de dialyse
 - Boudins de dialyse : Spectra/Por 3 dialysis membrane standar RC tubing 14 kDa
 - Préparation des boudins de dialyse : chauffe quelques minutes au micro-onde des boudins dans un large excès d'eau
 - Dialyse de l'échantillon contre 100 volumes de tampon PBS 1X pH 8.0 sous agitation
- Réalisation de plusieurs dialyses en série
 - Une dialyse pendant 6 heures puis une dialyse pendant 16 heures (sur la nuit) avec changement de tampon entre les dialyses
 - Détermination de la concentration d'IN5-KOP par mesure de la DO_{280nm} ($\epsilon = 78325 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et réalisation d'un test de digestion
 - Répétition de ces étapes jusqu'à clivage d'IN5-KOP (généralement deux paires de dialyse en tout)
- Tests de digestion par la protéase 3C en fusion en la GST (PreScission)
 - Réalisation de mélanges PreScission / IN5-KOP aux rapports molaires 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 et 5/1 dans un volume final de 20 μL
 - Incubation pendant 2 heures
 - Arrêt de la réaction par ajout du tampon de charge 2X pour SDS-PAGE et analyse par SDS-PAGE
- Digestion sur roue de l'échantillon d'IN5-KOP dans les conditions établies par le test
- Arrêt de la réaction par ajout de SDS 0.8 % final, d'urée 2 M final, et de β -mercaptoéthanol 2.8 mM et incubation sur roue jusqu'à réalisation de la suite du protocole

Purification et renaturation de KOP

DDM fait référence à du n-dodécyl β -D-maltopyranoside (DDM) additionné de cholestéryl hémisuccinate (CHS) en rapport massique 5/1.

- Préparation des tampons
 - **Tampon de repliement (TPR) (25 mL) :**
PBS 1X pH 7.4, β -mercaptoéthanol 2.8 mM, DDM 0.1 %
 - **Tampon de repliement avec JD_{Tic} (TPR/JD_{Tic}) (4 mL préparés à partir de TPR) :**
PBS 1X pH 7.4, β -mercaptoéthanol 2.8 mM, DDM 0.1 %, JD_{Tic} 10 μ M
 - **Tampon de repliement 2 avec naltrexone (TPR2/Naltrexone) (25 mL) :**
HEPES 10 mM pH 7.4, KCl 150 mM, imidazole 20 mM, DDM 0.1%, naltrexone 100 μ M
 - **Tampon d'élution (25 mL) :**
HEPES 10 mM pH 7.4, KCl 150 mM, imidazole 380 mM, DDM 0.1%
 - **Tampon de dessalage (50 mL) :**
²H-MES 1 mM pH 7.4, KCl 150 mM, DDM 0.025%
- ***Réalisation des étapes suivantes à température ambiante***
- Préparation de la résine TALON
 - Ajout de 8 mL (1 CV = 4 mL) de résine TALON dans une colonne vide
 - Passage du tampon de stockage sans laisser sécher la résine
 - Préparation de 200 mL de PBS 1X pH 8.0
 - Lavage avec 40 mL de PBS 1X pH 8.0
 - Resuspension de la résine dans 8 mL (2 CV) de tampon de solubilisation
- Purification et renaturation sur résine TALON
 - Mélange de la résine TALON resuspendue au produit de digestion (1 CV = 4 mL)
 - Homogénéisation puis incubation 1 heure à température ambiante et sur roue
 - Dilution par deux par du PBS 1X pH 8.0
 - Préparation de 100 mL de « tampon de solubilisation /2 » = tampon de solubilisation dilué par 2 avec du PBS pH 8.0 1X
 - Homogénéisation puis incubation 1 heure à température ambiante et sur roue
 - Introduction du mélange dans la colonne utilisée pour préparer la résine TALON
 - Passage de la fraction non-retenue **C1**
 - Ajout de 8 mL (2 CV) de tampon de solubilisation /2 à la colonne et passage dans la fraction **C2**

- Lavage de la colonne avec 3 x 4 mL (3 CV) de tampon de solubilisation /2 (récupération de la fraction **C3**)
- Lavage de la colonne avec 5 x 4 mL (5 CV) de TPR (récupération de la fraction **R1**)
- *Réalisation des étapes suivantes à 4 °C*
- Ajout de 4 mL (1 CV) de TPR/JDTic à la colonne, homogénéisation puis **incubation sur la nuit**
- Lavage de la colonne avec 5 x 4 mL (5 CV) mL de TPR2/Naltrexone (récupération de la fraction **R2**)
- Resuspension de la résine avec 4 mL (1 CV) de TPR2/Naltrexone **puis incubation sur roue sur la nuit** dans un falcon de 15 mL
- Package des résines sur colonne et passage du tampon (récupération de la fraction **R3**)
- Ajout de 6 mL de tampon d'élution (1.5 CV), homogénéisation puis incubation 30 minutes sur roue
- Récupération de 2 fractions de 3 mL (**D1, D2**)
- Ajout de 6 mL (1.5 CV) de tampon d'élution et récupération de la fraction **D3**
- Ajout de 6 mL (1.5 CV) de tampon d'élution et récupération de la fraction **D4**
- Mélange de D1 et D2 et concentration de ce mélange à 2.5 mL
- Concentration de D3 à 2.5 mL
- Dessalage
 - Mise en place d'une colonne PD-10 et passage du tampon de stockage
 - Lavage de la colonne avec 20 mL d'H₂O mQ
 - Equilibrage de la colonne avec 25 mL de tampon de dessalage
 - Passage du mélange D1 + D2 concentré (récupération de **Eff**)
 - Passage de 3.5 mL de tampon de dessalage (récupération de **E1**)
 - Passage de 4.5 mL de tampon de dessalage et récupération de fractions de 1 mL puis de 3.5 mL (récupération de **E2** et **E3**)
 - Equilibrage de la colonne avec 25 mL de tampon de dessalage
 - Passage de la fraction D3 concentrée (récupération de **Eff2**)
 - Passage de 3.5 mL de tampon de dessalage (récupération de **E11**)
 - Passage de 4.5 mL de tampon de dessalage et récupération de fractions de 1 mL puis de 3.5 mL (récupération de **E12** et **E13**)
 - Analyse des fractions obtenues par SDS-PAGE, détermination de la concentration par mesure de la DO_{280nm} et mélange des fractions d'intérêt (à priori E1 et E11).

Purification de KOP à partir de membranes de cellules SF9

Le protocole détaillé ici est celui utilisé pour la purification de KOP ayant permis la reproduction des cristaux en complexe avec JD_{Tic}. Les autres purifications à partir de cellules SF9 ont été réalisées avec un protocole équivalent. Les tampons utilisés diffèrent et sont décrits dans les parties matériel et méthodes correspondantes. Ce protocole est écrit pour 1 L culture de cellules SF9.

Tampons utilisés

- **Tampon de lavage hypotonique (LS) :**

HEPES 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM

- **Tampon de lavage hypertonique (HS) :**

HEPES 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, NaCl 1 M

- **Tampon de solubilisation 2X :**

HEPES 10 mM pH 7.5, NaCl 300 mM

Le tampon après mélange avec les membranes et le DDM (voir plus loin) est : HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, DDM 1 %, CHS 0.2 %

- **Tampon de lavage 1 (WB1) :**

HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 800 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.1 %, CHS 0.02 %, ATP 10 mM, MgCl₂ 10 mM, JD_{Tic} 50 μM

- **Tampon de lavage 2 (WB2) :**

HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.05 %, CHS 0.01 %, imidazole 50 mM, JD_{Tic} 50 μM

- **Tampon d'éluion (EB) :**

HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.03 %, CHS 0.006 %, imidazole 250 mM, JD_{Tic} 50 μM

- **Tampon de dessalage (DB) :**

HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycérol 10 % v/v, DDM 0.03 %, CHS 0.006 %, JD_{Tic} 50 μM

Préparation des membranes SF9

- Décongélation des cellules SF9 dans 60 mL de tampon LS additionné d'inhibiteur de protéase sans EDTA 1X (Roche) (il est possible de briser préalablement les cellules congelées avec un marteau)
- Introduction des cellules resuspendues dans un homogénéisateur de Dounce, ajout de 60 mL supplémentaires de tampon LS et homogénéisation
- Ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C (Rotor Ti45, 150000 g) et élimination du surnageant
- Ajout de 120 mL de tampon LS additionné d'inhibiteur de protéase 1X et resuspension à l'aide de l'homogénéisateur de Dounce
- Ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C (Rotor Ti45, 150000 g) et élimination du surnageant
- Répéter cette étape de lavage deux fois supplémentaires avec le tampon HS
- Après ultracentrifugation, congélation des membranes SF9 à -80 °C

Solubilisation et fixation sur résine TALON

- Décongélation des membranes SF9
- Ajout de tampon LS aux membranes SF9 pour un volume total d'environ 25 mL et de JDtic 50 µM et resuspension à l'aide de l'homogénéisateur de Dounce
- Ajout d'iodoacétamide 2 mg/mL (en poudre) et incubation sur roue pendant une heure à 4 °C
- Ajout de 20 mL de tampon de solubilisation 2X, de 5 mL de DDM / CHS stock à 10 % / 2 % (concentration finale d'environ 1 % / 0.2 %) et incubation sur roue pendant trois heures à 4 °C
- Ultracentrifugation à 60000 rpm pendant une heure à 4 °C (Rotor Ti70, 200000 g) et récupération du surnageant
- Lavage de 2 mL de résine TALON (1 CV = 1 mL) par ajout de 10 mL d'eau et centrifugation à 700 g pendant 3 minutes (à répéter trois fois)
- Mélange du surnageant issu de la solubilisation avec la résine TALON, de l'imidazole à 30 mM final et du NaCl 1M final
- Incubation sur roue et sur la nuit à 4 °C

Purification sur résine TALON et clivage TEV

- Centrifugation du mélange récepteur – résine TALON à 2000 g et 4 °C pendant 5 minutes, élimination du surnageant et introduction de la résine dans une colonne vide
- Lavage de la résine avec 10 mL (= 10 CV) de tampon WB1
- Lavage de la résine avec 6 mL (= 6 CV) de tampon WB2
- Ajout de 3 mL (= 3 CV) de tampon EB et récupération de la fraction correspondante
- Dessalage
 - Lavage d'une unité de filtration de 100 kDa avec de l'eau par centrifugation à 2000 g et 4 °C
 - Lavage d'une unité de filtration de 100 kDa avec du tampon EB par centrifugation à 2000 g et 4 °C
 - Concentration de la fraction de 3 mL éluée de la résine TALON à 1 mL par centrifugation à 1000 g et 4 °C
 - Equilibration d'une colonne de dessalage midiG25 avec 15 mL de tampon DB
 - Passage de la solution de récepteur concentrée à 1 mL
 - Elution de la protéine par ajout de 1.5 mL de tampon DB
- Digestion TEV : ajout de 0.1 équivalent de protéase et incubation sur la nuit à 4 °C

Purification inverse sur résine TALON

- Lavage de 300 µL de résine TALON par ajout de 1 mL d'eau et centrifugation à 700 g pendant 3 minutes (à répéter trois fois)
- Lavage de la résine de la même façon avec le tampon DB
- Mélange du produit de digestion avec la résine et incubation sur roue pendant deux heures à 4 °C
- Filtration de la résine avec une colonne vide et récupération de la fraction non-retenue
- Ajout de 150 µL de tampon DB et passage dans la fraction précédente
- Analyse de la solution de récepteur obtenue par SDS-PAGE et détermination de la concentration par mesure de la DO_{280nm}

Production du nanobody 39

Expression

- Utilisation de bactéries BL21Star transformées par le plasmide pET25b-Nb39
- Pré-culture sur la nuit à 37 °C et 300 rpm dans 50 mL de milieu LB avec ampicilline à 50 µg/mL
- Introduction de 500 mL de milieu LB avec ampicilline à 50 µg/mL dans un erlenmeyer bafflé de 2 L
- Inoculation à une DO_{600nm} de 0.01 et culture à 37 °C et 180 rpm
- Lorsque la DO_{600nm} atteint 0.4, culture à 25 °C et 180 rpm
- Lorsque la DO_{600nm} atteint 0.8 – 1, ajout d'IPTG 1 mM et culture à 25 °C et 180 rpm pendant 5 heures
- Centrifugation à 3000 g et 4 °C pendant 30 minutes et congélation du culot

Purification

- Préparation des tampons
 - Tampon sphéroblaste** : Tris 250 mM pH 8.0, EDTA 0.5 mM, saccharose 750 mM
 - Tampon A** (500 mL) : HEPES pH 7.5 50 mM, KCl 150 mM
 - Tampon B** (500 mL) : HEPES pH 7.5 50 mM, KCl 150 mM, imidazole 500 mM
 - Tampon SEC** (1 L) : HEPES pH 7.5 50 mM, KCl 150 mM, glycérol 10 %
- Lyse et fractionnement
 - Resuspension du culot bactérien dans 10 mL de tampon sphéroblaste puis incubation 30 minutes à température ambiante et sur roue
 - Ajout de lysozyme 0.1 g/L final et de 10 mL d'eau stérile puis incubation 30 minutes à température ambiante et sur roue
 - Ultracentrifugation à 25000 rpm (46000 g) et 4 °C pendant 30 minutes (rotor Ti70)
 - Récupération de la fraction soluble (par renversement du tube en bloquant le culot avec une spatule, pas de pipetage)
 - Dilution de la fraction soluble par deux par de l'eau stérile
 - Filtration sur filtre 0.45 µm
 - Vérification du pH du filtrat (doit être compris entre 7.5 et 8.5)

- Purification sur résine TALON (système AKTA)
 - Package à la main de 10 mL de résine TALON (5 mL après package) dans une colonne vide
 - Equilibration de la résine dans le tampon A
 - Injection de la fraction soluble du lysat bactérien filtré
 - Lavage dans le tampon A
 - Elution par gradient tampon A / tampon B [0 à 250 mM d'imidazole sur 30 minutes]
 - Récupération de fractions de 5 mL
- Purification par chromatographie d'exclusion de taille et stockage
 - Rassemblement des fractions d'intérêt issues de l'étape précédente
 - Concentration à moins de 5 mL à l'aide d'une unité de concentration avec un seuil de 10 kDa par centrifugations à 4000 g
 - Chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne G75 dans le tampon SEC
 - Récupération de fractions de 1 mL
 - Rassemblement des fractions d'intérêt et analyse par SDS-PAGE
 - Congélation à l'azote liquide et stockage à -80 °C

Conditions de cristallisation en LCP

Les conditions de cristallisation permettant le criblage de 48 sels à deux concentrations sont indiquées ici (234). Les solutions de cristallisation contiennent également un tampon à 100 mM.

Salt	Precipitant	Number	Salt Conc	Number	Salt Conc
Ammonium acetate	30% (v/v) PEG400	1	0.1 M	49	0.4 M
Ammonium chloride	30% (v/v) PEG400	2	0.1 M	50	0.4 M
Ammonium phosphate monobasic	30% (v/v) PEG400	3	0.1 M	51	0.4 M
Ammonium fluoride	30% (v/v) PEG400	4	0.1 M	52	0.4 M
Ammonium formate	30% (v/v) PEG400	5	0.1 M	53	0.4 M
Ammonium citrate dibasic	30% (v/v) PEG400	6	0.1 M	54	0.4 M
Ammonium phosphate dibasic	30% (v/v) PEG400	7	0.1 M	55	0.4 M
Ammonium nitrate	30% (v/v) PEG400	8	0.1 M	56	0.4 M
Ammonium sulfate	30% (v/v) PEG400	9	0.1 M	57	0.4 M
Ammonium tartrate dibasic	30% (v/v) PEG400	10	0.1 M	58	0.4 M
Calcium acetate hydrate	30% (v/v) PEG400	11	0.1 M	59	0.4 M
Calcium chloride dihydrate	30% (v/v) PEG400	12	0.1 M	60	0.4 M
Lithium acetate dihydrate	30% (v/v) PEG400	13	0.1 M	61	0.4 M
Lithium chloride	30% (v/v) PEG400	14	0.1 M	62	0.4 M
Lithium citrate tribasic tetrahydrate	30% (v/v) PEG400	15	0.1 M	63	0.4 M
Lithium nitrate	30% (v/v) PEG400	16	0.1 M	64	0.4 M
Lithium sulfate monohydrate	30% (v/v) PEG400	17	0.1 M	65	0.4 M
Magnesium acetate tetrahydrate	30% (v/v) PEG400	18	0.1 M	66	0.4 M
Magnesium chloride hexahydrate	30% (v/v) PEG400	19	0.1 M	67	0.4 M
Magnesium formate dihydrate	30% (v/v) PEG400	20	0.1 M	68	0.4 M
Magnesium nitrate hexahydrate	30% (v/v) PEG400	21	0.1 M	69	0.4 M
Magnesium sulfate hydrate	30% (v/v) PEG400	22	0.1 M	70	0.4 M
Nickel(II) chloride hexahydrate	30% (v/v) PEG400	23	0.1 M	71	0.4 M
Potassium acetate	30% (v/v) PEG400	24	0.1 M	72	0.4 M
Potassium chloride	30% (v/v) PEG400	25	0.1 M	73	0.4 M
Potassium citrate tribasic monohydrate	30% (v/v) PEG400	26	0.1 M	74	0.4 M
Potassium phosphate monobasic	30% (v/v) PEG400	27	0.1 M	75	0.4 M
Potassium fluoride	30% (v/v) PEG400	28	0.1 M	76	0.4 M
Potassium formate	30% (v/v) PEG400	29	0.1 M	77	0.4 M
Potassium phosphate dibasic	30% (v/v) PEG400	30	0.1 M	78	0.4 M
Potassium nitrate	30% (v/v) PEG400	31	0.1 M	79	0.4 M
Potassium sodium tartrate tetrahydrate	30% (v/v) PEG400	32	0.1 M	80	0.4 M
Potassium sulfate	30% (v/v) PEG400	33	0.1 M	81	0.4 M
Potassium thiocyanate	30% (v/v) PEG400	34	0.1 M	82	0.4 M
Sodium acetate trihydrate	30% (v/v) PEG400	35	0.1 M	83	0.4 M
Sodium chloride	30% (v/v) PEG400	36	0.1 M	84	0.4 M
Sodium citrate tribasic dihydrate	30% (v/v) PEG400	37	0.1 M	85	0.4 M
Sodium phosphate monobasic	30% (v/v) PEG400	38	0.1 M	86	0.4 M
Sodium formate	30% (v/v) PEG400	39	0.1 M	87	0.4 M
Sodium phosphate dibasic dihydrate	30% (v/v) PEG400	40	0.1 M	88	0.4 M
Sodium malonate pH 7.0	30% (v/v) PEG400	41	0.1 M	89	0.4 M
Sodium nitrate	30% (v/v) PEG400	42	0.1 M	90	0.4 M
Sodium sulfate decahydrate	30% (v/v) PEG400	43	0.1 M	91	0.4 M
Sodium tartrate dibasic dihydrate	30% (v/v) PEG400	44	0.1 M	92	0.4 M
Sodium thiocyanate	30% (v/v) PEG400	45	0.1 M	93	0.4 M
Tacsimate	30% (v/v) PEG400	46	0.1 M	94	0.4 M
Zinc acetate dihydrate	30% (v/v) PEG400	47	0.1 M	95	0.4 M
Zinc sulfate heptahydrate	30% (v/v) PEG400	48	0.1 M	96	0.4 M

Références

Les références des publications I et II sont respectivement présentées dans les chapitres II et IV.

1. Alexander SPH, *et al.* (2017) The concise guide to pharmacology 2017/2018: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 174:S17-S129.
2. Alberts B, *et al.* (2008) Biologie moléculaire de la cellule - quatrième édition, troisième tirage. Flammarion Médecines-Sciences.
3. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, & Gloriam DE (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16(12):829-842.
4. Bockaert J & Pin J-P (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18(7):1723–1729.
5. Katritch V, Cherezov V, & Stevens RC (2013) Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol.* 53(1):531-556.
6. Attwood TK & Findlay JBC (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering* 7(2):195-203.
7. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, & Schiöth HB (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63(6):1256–1272.
8. Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 103(1):21-80.
9. Koehl A, *et al.* (2019) Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 566(7742):79-84.
10. Nasrallah C, *et al.* (2018) Direct coupling of detergent purified human mGlu5 receptor to the heterotrimeric G proteins Gq and Gs. *Sci Rep.* 8(1).
11. Zhang Y, *et al.* (2017) Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature* 546(7657):248-253.
12. Kufareva I, Salanga CL, & Handel TM (2015) Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.* 93(4):372-383.
13. Qin L, *et al.* (2015) Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science* 347(6226):1117-1122.
14. Smits G, *et al.* (2003) Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J.* 22(11):2692-2703.
15. Pándy-Szekeres G, *et al.* (2018) GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D440-D446.
16. Wu F, Song G, de Graaf C, & Stevens RC (2017) Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *J. Membr. Biol.* 429:2726-2745.
17. Hilger D, Masureel M, & Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25(1):4-12.
18. Katritch V, Cherezov V, & Stevens RC (2012) Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* 33(1):17-27.
19. Milligan G & Kostenis E (2009) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147(S1):S46-S55.
20. Gilman AG (1987) G-Proteins - Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-649.
21. Wedegaertner PB, Wilson PT, & Bourne HR (1995) Lipid Modifications of Trimeric G-Proteins. *J. Biol. Chem.* 270(2):503-506.
22. Khan SM, *et al.* (2013) The Expanding Roles of G beta gamma Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacol. Rev.* 65(2):545-577.

23. Tobin AB (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* 153:S167-S176.
24. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, & Shenoy SK (2007) β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 69(1):483-510.
25. Peterson YK, Luttrell LM, & Michel MC (2017) The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* 69(3):256-297.
26. Raman M, Chen W, & Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26(22):3100-3112.
27. Wong SKF (2003) G Protein Selectivity Is Regulated by Multiple Intracellular Regions of GPCRs. *Neurosignals* 12(1):1-12.
28. Leurs R, Pena MSR, Bakker RA, Alewijnse AE, & Timmerman H (2000) Constitutive activity of G protein coupled receptors and drug action. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 74:327-331.
29. Lowes VL, Ip NY, & Wong YH (2002) Integration of Signals from Receptor Tyrosine Kinases and G Protein-Coupled Receptors. *Neurosignals* 11:5-19.
30. Jong Y-J, Harmon SK, & O'Malley KL (2018) GPCR signalling from within the cell. *Br. J. Pharmacol.* 175:4026-4035.
31. Calebiro D & Koszegi Z (2019) The subcellular dynamics of GPCR signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 483:24-30.
32. Weis WI & Kobilka BK (2018) The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* 87:897-919.
33. Thompson GL, Kelly E, Christopoulos A, & Canals M (2014) Novel GPCR paradigms at the mu-opioid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172:287-296.
34. Manglik A, *et al.* (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537(7619):185-190.
35. Ferré G, Czaplicki G, Demange P, & Milon A (2019) Structure and dynamics of dynorphin peptide and its receptor. *Vitamins and Hormones Opioid Hormones* (Litwack, G., Ed.), Elsevier.
36. Damian M, *et al.* (2012) High Constitutive Activity Is an Intrinsic Feature of Ghrelin Receptor Protein. *J. Biol. Chem.* 287(6):3630-3641.
37. Ishchenko A, Abola EE, & Cherezov V eds (2017) *Crystallization of Membrane Proteins: An Overview*, Vol 1607, pp 117-141.
38. Palczewski K, *et al.* (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289:739-745.
39. Hausch F (2017) Cryo-EM Structures of Class B GPCR Reveal the Activation Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56(41):12412-12414.
40. Miller RL, *et al.* (2015) The Importance of Ligand-Receptor Conformational Pairs in Stabilization: Spotlight on the N/OFQ G Protein-Coupled Receptor. *Structure* 23(12):2291-2299.
41. Zhang X, Stevens RC, & Xu F (2015) The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. *Trends Biochem. Sci.* 40:79-87.
42. Magnani F, *et al.* (2016) A mutagenesis and screening strategy to generate optimally thermostabilized membrane proteins for structural studies. *Nat. Protoc.* 11(8):1554-1571.
43. Caffrey M (2009) Crystallizing Membrane Proteins for Structure Determination: Use of Lipidic Mesophases. *Annu. Rev. Biophys.* 38(1):29-51.
44. Ishchenko A, Abola E, & Cherezov V (2014) *Lipidic Cubic Phase Technologies for Structural Studies of Membrane Proteins* (Springer Science+Business Media New York) pp 289-314.
45. Chun E, *et al.* (2012) Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors. *Structure* 20(6):967-976.
46. Zou Y, Weis WI, & Kobilka BK (2012) N-Terminal T4 Lysozyme Fusion Facilitates Crystallization of a G Protein Coupled Receptor. *Plos One* 7(10).
47. Ishchenko A, Gati C, & Cherezov V (2018) Structural biology of G protein-coupled receptors: new opportunities from XFELs and cryoEM. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 51:44-52.

48. Manglik A, *et al.* (2012) Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485(7398):321-326.
49. Wu H, *et al.* (2012) Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485(7398):327-332.
50. Granier S, *et al.* (2012) Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485(7398):400-404.
51. Thompson AA, *et al.* (2012) Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485(7398):395-399.
52. Koehl A, *et al.* (2018) Structure of the μ -opioid receptor–Gi protein complex. *Nature* 558(7711):547-552.
53. Huang W, *et al.* (2015) Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature* 524(7565):315-321.
54. Che T, *et al.* (2018) Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor. *Cell* 172(1-2):55-67.e15.
55. Weiss DR, *et al.* (2013) Conformation Guides Molecular Efficacy in Docking Screens of Activated β -2 Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *ACS Chem. Biol.* 8(5):1018-1026.
56. Lane JR, *et al.* (2013) Structure-Based Ligand Discovery Targeting Orthosteric and Allosteric Pockets of Dopamine Receptors. *Mol. Pharmacol.* 84(6):794-807.
57. Liang Y-L, *et al.* (2017) Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR–G-protein complex. *Nature* 546(7656):118-123.
58. White JF, *et al.* (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490(7421):508-513.
59. Ma Y, *et al.* (2017) Structural Basis for Apelin Control of the Human Apelin Receptor. *Structure* 25(6):858-866.e854.
60. Shihoya W, *et al.* (2016) Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. *Nature* 537(7620):363-368.
61. Cherezov V, *et al.* (2007) High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β 2-Adrenergic G Protein–Coupled Receptor. *Science* 318:1258-1265.
62. Rasmussen SGF, *et al.* (2011) Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* 477(7366):549-555.
63. Ballesteros JA & Weinstein H (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences* 25:366-428.
64. Venkatakrishnan AJ, *et al.* (2016) Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature* 536(7617):484-487.
65. Kruse AC, *et al.* (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504(7478):101-106.
66. Zhou XE, *et al.* (2017) Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* 170(3):457-469.e413.
67. Shukla AK, *et al.* (2013) Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497(7447):137-141.
68. De Lean A, Stadel JM, & Lefkowitz RJ (1980) A Ternary Complex Model Explains the Agonist-specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-coupled beta-Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* 255(15):7108-7117.
69. Samama P, Cotecchia S, Costa T, & Lefkowitz RJ (1993) A Mutation-induced Activated State of the beta2-Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* 268:4625-4636.
70. Weiss J, Morgan P, Lutz M, & Kenakin T (1996) The Cubic Ternary Complex Receptor-Occupancy Model I. Model Description. *J. theor. Biol.* 178:151-167.
71. Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, & Wüthrich K (2018) GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18(1):59-82.
72. Isogai S, *et al.* (2016) Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β 1-adrenergic receptor. *Nature* 530(7589):237-241.

73. Gregorio GG, *et al.* (2017) Single-molecule analysis of ligand efficacy in β 2AR–G-protein activation. *Nature* 547(7661):68-73.
74. Damian M, *et al.* (2015) Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(5):1601-1606.
75. Altenbach C, Kusnetzow AK, Ernst OP, Hofmann KP, & Hubbell WL (2008) High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(21):7439-7444.
76. Manglik A, *et al.* (2015) Structural Insights into the Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Signaling. *Cell* 161(5):1101-1111.
77. Westfield GH, *et al.* (2011) Structural flexibility of the Gas α -helical domain in the β 2-adrenoceptor Gs complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(38):16086-16091.
78. Murata K & Wolf M (2018) Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1862:324-334.
79. Zhao J, Benlekbir S, & Rubinstein JL (2015) Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* 521:241-245.
80. Kato HE, *et al.* (2019) Conformational transitions of a neurotensin receptor 1–Gi1 complex. *Nature*.
81. Nango E, *et al.* (2016) A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science* 354(6319):1552-1557.
82. Kim TH, *et al.* (2013) The Role of Ligands on the Equilibria Between Functional States of a G Protein-Coupled Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 135(25):9465-9474.
83. Yao X, *et al.* (2006) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the β 2-adrenoceptor. *Nat. Chem. Biol.* 2(8):417-422.
84. Horst R, Liu JJ, Stevens RC, & Wüthrich K (2013) β 2-Adrenergic Receptor Activation by Agonists Studied with 19F NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52(41):10762-10765.
85. Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, & Wüthrich K (2012) Biased Signaling Pathways in β 2-Adrenergic Receptor Characterized by 19F-NMR. *Science* 335:1106-1110.
86. Lamichhane R, *et al.* (2015) Single-molecule view of basal activity and activation mechanisms of the G protein-coupled receptor β 2AR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(46):14254-14259.
87. Nygaard R, *et al.* (2013) The Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* 152(3):532-542.
88. Kofuku Y, *et al.* (2012) Efficacy of the β 2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat. Commun.* 3(1045).
89. Kofuku Y, *et al.* (2014) Functional Dynamics of Deuterated β 2-Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(49):13376-13379.
90. Solt AS, *et al.* (2017) Insight into partial agonism by observing multiple equilibria for ligand-bound and Gs-mimetic nanobody-bound β 1-adrenergic receptor. *Nat. Commun.* 8(1795).
91. Casiraghi M, *et al.* (2016) Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J. Am. Chem. Soc.* 138(35):11170-11175.
92. Clark LD, *et al.* (2017) Ligand modulation of sidechain dynamics in a wild-type human GPCR. *eLIFE*.
93. Ye L, Van Eps N, Zimmer M, Ernst OP, & Prosser RS (2016) Activation of the A2A adenosine G-protein-coupled receptor by conformational selection. *Nature* 533(7602):265-268.
94. Ye L, *et al.* (2018) Mechanistic insights into allosteric regulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations. *Nat. Commun.* 9(1372).
95. Eddy MT, *et al.* (2018) Allosteric coupling of drug binding and intracellular signaling in the A2A adenosine receptor. *Cell* 172:68-80.
96. Okude J, *et al.* (2015) Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ -Opioid Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54(52):15771-15776.

97. Sounier R, *et al.* (2015) Propagation of conformational changes during μ -opioid receptor activation. *Nature* 524(7565):375-378.
98. Lebon G, *et al.* (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474(7352):521-525.
99. F. Xu, *et al.* (2011) Structure of an Agonist-Bound Human A2A Adenosine Receptor. *Science* 332:322-327.
100. Toyama Y, *et al.* (2017) Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses. *Nat. Commun.* 8(14523).
101. Goricanec D, *et al.* (2016) Conformational dynamics of a G-protein α subunit is tightly regulated by nucleotide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(26):E3629-E3638.
102. Abdulaev NG, *et al.* (2006) The Receptor-Bound "Empty Pocket" State of the Heterotrimeric G-Protein α -Subunit Is Conformationally Dynamic. *Biochemistry* 45(43):12986-12997.
103. Shiraishi Y, *et al.* (2018) Phosphorylation-induced conformation of β 2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR. *Nat. Commun.* 9(194).
104. Tzeng S-R & Kalodimos CG (2009) Dynamic activation of an allosteric regulatory protein. *Nature* 462(7271):368-372.
105. Tzeng S-R & Kalodimos CG (2011) Protein dynamics and allostery: an NMR view. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21(1):62-67.
106. Tzeng S-R & Kalodimos CG (2012) Protein activity regulation by conformational entropy. *Nature* 488(7410):236-240.
107. Frederick KK, Marlow MS, Valentine KG, & Wand AJ (2007) Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature* 448(7151):325-329.
108. Sekhar A & Kay LE (2019) An NMR View of Protein Dynamics in Health and Disease. *Annu. Rev. Biophys.* 48:297-319.
109. Kleckner IR & Foster MP (2011) An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1814(8):942-968.
110. Eddy MT, *et al.* (2018) Extrinsic Tryptophans as NMR Probes of Allosteric Coupling in Membrane Proteins: Application to the A2A Adenosine Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 140(26):8228-8235.
111. Dahmane T, Damian M, Mary S, Popot J-L, & Banères J-L (2009) Amphipol-Assisted in Vitro Folding of G Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry* 48(27):6516-6521.
112. Casiraghi M, Damian M, Lescop E, Banères J-L, & Catoire LJ (2018) Illuminating the Energy Landscape of GPCRs: The Key Contribution of Solution-State NMR Associated with *Escherichia coli* as an Expression Host. *Biochemistry* 57(16):2297-2307.
113. O'Connor C, *et al.* (2015) NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(38):11852-11857.
114. Ferré G, *et al.* (2019) Structure and dynamics of G protein-coupled receptor-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116(35):17525-17530.
115. Banères J-L & Mouillac B (2012) Manipulation des récepteurs couplés aux protéines G. Expression, purification et stabilisation in vitro. *Med. Sci.* 28:837-844.
116. Sarramegna V, Talmont F, Demange P, & Milon A (2003) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(8):1529-1546.
117. Jarvis DL (2009) Baculovirus-Insect Cell Expression Systems. *Methods Enzymol.* 463:191-222.
118. Meola A, *et al.* (2014) Robust and low cost uniform N-15-labeling of proteins expressed in *Drosophila* S2 cells and *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells for NMR applications. *J. Struct. Biol.* 188(1):71-78.
119. Chung KY, *et al.* (2012) Role of Detergents in Conformational Exchange of a G Protein-coupled Receptor. *J. Biol. Chem.* 287(43):36305-36311.
120. Eddy MT, Didenko T, Stevens RC, & Wüthrich K (2016) Beta 2 adrenergic receptor conformational response to fusion protein in the third intracellular loop. *Structure* 24:2190-2197.

121. Bokoch MP, *et al.* (2010) Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 463(7277):108-112.
122. Opitz C, Isogai S, & Grzesiek S (2015) An economic approach to efficient isotope labeling in insect cells using homemade ¹⁵N-, ¹³C- and ²H-labeled yeast extracts. *J Biomol Nmr* 62(3):373-385.
123. Franke B, *et al.* (2018) Production of isotope-labeled proteins in insect cells for NMR. *J Biomol Nmr* 71(3):173-184.
124. Sarramegna V, Talmont F, Seree de Roch M, Milon A, & Demange P (2002) Green fluorescent protein as a reporter of human mu-opioid receptor overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 99:23-39.
125. Sarramegna V, Demange P, Milon A, & Talmont F (2002) Optimizing Functional versus Total Expression of the Human μ -Opioid Receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 24(2):212-220.
126. Muller I, Sarramegna V, Milon A, & Talmont FJ (2010) The N-Terminal End Truncated Mu-Opioid Receptor: from Expression to Circular Dichroism Analysis. *Appl. Biochem. Biotech.* 160(7):2175-2186.
127. Muller I, *et al.* (2008) The full-length mu-opioid receptor: A conformational study by circular dichroism in trifluoroethanol and membrane-mimetic environments. *J. Membr. Biol.* 223(1):49-57.
128. Sarramegna V, *et al.* (2005) Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 43(2):85-93.
129. Massou S, *et al.* (1999) Heterologous expression of a deuterated membrane-integrated receptor and partial deuteration in methylotrophic yeasts. *J Biomol Nmr* 14:231-239.
130. Sarramegna V, Muller I, Milon A, & Talmont F (2006) Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(10):1149-1164.
131. Duc NM, *et al.* (2015) Effective Application of Bicelles for Conformational Analysis of G Protein-Coupled Receptors by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 26(5):808-817.
132. Planchard N, *et al.* (2014) The Use of Amphipols for Solution NMR Studies of Membrane Proteins: Advantages and Constraints as Compared to Other Solubilizing Media. *J. Membr. Biol.* 247(9-10):827-842.
133. Foster MP, McElroy CA, & Amero CD (2007) Solution NMR of Large Molecules and Assemblies. *Biochemistry* 46(2):331-340.
134. Carr HY & Purcell EM (1954) Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic-Resonance Experiments. *Phys. Rev.* 94(3):630-637.
135. Loria JP, Rance M, & Palmer AG (1999) A Relaxation-Compensated Carr–Purcell–Meiboom–Gill Sequence for Characterizing Chemical Exchange by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 121(10):2331-2332.
136. Tugarinov V, Sprangers R, & Kay LE (2006) Probing Side-Chain Dynamics in the Proteasome by Relaxation Violated Coherence Transfer NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 129:1743-1750.
137. Rosenzweig R & Kay LE (2014) Bringing Dynamic Molecular Machines into Focus by Methyl-TROSY NMR. *Annu. Rev. Biochem.* 83:291-315.
138. Boisbouvier J & Kay LE (2018) Advanced isotopic labeling for the NMR investigation of challenging proteins and nucleic acids. *J Biomol Nmr* 71(3):115-117.
139. Pervushin K, Riek R, Wider G, & Wüthrich K (1997) Attenuated T₂ relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12366-12371.
140. Tugarinov V, Hwang PM, Ollerenshaw JE, & Kay LE (2003) Cross-Correlated Relaxation Enhanced ¹H-¹³C NMR Spectroscopy of Methyl Groups in Very High Molecular Weight Proteins and Protein Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 125:10420-10428.

141. Clark L, Dikiy I, Rosenbaum DM, & Gardner KH (2018) On the use of *Pichia pastoris* for isotopic labeling of human GPCRs for NMR studies. *J Biomol Nmr* 71(4):203-211.
142. Gans P, *et al.* (2010) Stereospecific Isotopic Labeling of Methyl Groups for NMR Spectroscopic Studies of High-Molecular-Weight Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(11):1958-1962.
143. Kerfah R, Plevin MJ, Sounier R, Gans P, & Boisbouvier J (2015) Methyl-specific isotopic labeling: a molecular tool box for solution NMR of large proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 32:113-122.
144. Kofuku Y, *et al.* (2018) Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of beta(2)-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system. *J Biomol Nmr* 71(3):185-192.
145. Kurauskas V, Schanda P, & Sounier R (2017) Methyl-Specific Isotope Labeling Strategies for NMR Studies of Membrane Proteins. *Methods Mol. Biol.* 1635:109-123.
146. Ruschak AM & Kay LE (2009) Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function. *J Biomol Nmr* 46(1):75-87.
147. Kurauskas V, *et al.* (2016) Sensitive proton-detected solid-state NMR spectroscopy of large proteins with selective CH₃ labelling: application to the 50S ribosome subunit. *ChemComm* 52(61):9558-9561.
148. Macek P, *et al.* (2017) Unraveling self-assembly pathways of the 468-kDa proteolytic machine TET2. *Sci. Adv.* 3(4).
149. Sun H, Kay LE, & Tugarinov V (2011) An Optimized Relaxation-Based Coherence Transfer NMR Experiment for the Measurement of Side-Chain Order in Methyl-Protonated, Highly Deuterated Proteins. *J. Phys. Chem. B* 115(49):14878-14884.
150. Toyama Y, Osawa M, Yokogawa M, & Shimada I (2016) NMR Method for Characterizing Microsecond-to-Millisecond Chemical Exchanges Utilizing Differential Multiple-Quantum Relaxation in High Molecular Weight Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 138(7):2302-2311.
151. Yuwen T, Huang R, Vallurupalli P, & Kay LE (2019) A Methyl-TROSY-Based ¹H Relaxation Dispersion Experiment for Studies of Conformational Exchange in High Molecular Weight Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58(19):6250-6254.
152. Baldwin AJ, Religa TL, Hansen DF, Bouvignies G, & Kay LE (2010) ¹³CHD₂Methyl Group Probes of Millisecond Time Scale Exchange in Proteins by ¹H Relaxation Dispersion: An Application to Proteasome Gating Residue Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 132(32):10992-10995.
153. Rennella E, Schuetz AK, & Kay LE (2016) Quantitative measurement of exchange dynamics in proteins via ¹³C relaxation dispersion of ¹³CHD₂-labeled samples. *J Biomol Nmr* 65(2):59-64.
154. Weininger U, Liu Z, McIntyre DD, Vogel HJ, & Akke M (2012) Specific ¹²CβD²¹²CγD²¹³CεHD₂ Isotopomer Labeling of Methionine To Characterize Protein Dynamics by ¹H and ¹³C NMR Relaxation Dispersion. *J. Am. Chem. Soc.* 134(45):18562-18565.
155. Catoire LJ, *et al.* (2010) Structure of a GPCR Ligand in Its Receptor-Bound State: Leukotriene B₄ Adopts a Highly Constrained Conformation When Associated to Human BLT₂. *J. Am. Chem. Soc.* 132(26):9049-9057.
156. Clore GM & Gronenborn AM (1982) Theory and Applications of the Transferred Nuclear Overhauser Effect to the Study of the Conformations of Small Ligands Bound to Proteins. *J. Magn. Reson.* 48:402-417.
157. Clore GM & Gronenborn AM (1983) Theory of the Time-Dependent Transferred Nuclear Overhauser Effect - Applications to Structural-Analysis of Ligand Protein Complexes in Solution. *J. Magn. Reson.* 53(3):423-442.
158. Czaplicki J, Bohner T, Habermann AK, Folkers G, & Milon A (1996) A transferred NOE study of a tricyclic analog of acyclovir bound to thymidine kinase. *J Biomol Nmr* 8(3):261-272.
159. Czaplicki J & Milon A (2005) Quantitative analysis of transferred nuclear overhauser effects in complex spin systems by full relaxation matrix analysis. *Acta Phys. Pol.* 108(1):25-32.
160. Czaplicki J & Milon A (1998) Simulations of transferred NOE in a ternary peptide-receptor-lipid complex. *J. chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* 95(2):196-207.

161. Fabre C, *et al.* (2002) Differential binding to the alpha/beta-tubulin dimer of vinorelbine and vinflunine revealed by nuclear magnetic resonance analyses. *Biochem. Pharmacol.* 64(4):733-740.
162. Auge S, Bersch B, Tropis M, & Milon A (2000) Characterization of substance P-membrane interaction by transferred nuclear Overhauser effect. *Biopolymers* 54(5):297-306.
163. Bersch B, Koehl P, Nakatani Y, Ourisson G, & Milon A (1993) H-1 Nuclear-Magnetic-Resonance Determination of the Membrane-Bound Conformation of Senktide, a Highly Selective Neurokinin-B Agonist. *J Biomol Nmr* 3(4):443-461.
164. Milon A, Miyazawa T, & Higashijima T (1990) Transferred nuclear Overhauser effect analyses of membrane-bound enkephalin analogues by ¹H nuclear magnetic resonance: correlation between activities and membrane-bound conformations. *Biochemistry* 29(1):65-75.
165. Vögeli B (2014) The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 78:1-46.
166. Mayer M & Meyer B (2001) Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123(25):6108-6117.
167. Yong KJ, *et al.* (2018) Determinants of Ligand Subtype-Selectivity at α 1A-Adrenoceptor Revealed Using Saturation Transfer Difference (STD) NMR. *ACS Chem. Biol.* 13(4):1090-1102.
168. Talmont F, Sidobre S, Demange P, Milon A, & Emorine LJ (1996) Expression and pharmacological characterization of the human mu-opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 394:268-272.
169. Vincent B, *et al.* (2008) Description of the low-affinity interaction between nociceptin and the second extracellular loop of its receptor by fluorescence and NMR spectroscopies. *J. Pept. Sci.* 14(11):1183-1194.
170. Müller TD, *et al.* (2015) Ghrelin. *Molecular Metabolism* 4(6):437-460.
171. Smith RG, *et al.* (1997) Peptidomimetic Regulation of Growth Hormone Secretion. *Endocr. Rev.* 18(5):621-645.
172. Howard AD, *et al.* (1996) A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* 273:974-977.
173. Kojima M, *et al.* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
174. Ariyasu H, *et al.* (2001) Stomach Is a Major Source of Circulating Ghrelin, and Feeding State Determines Plasma Ghrelin-Like Immunoreactivity Levels in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(10):4753-4758.
175. Ferrini F, Salio C, Lossi L, & Merighi A (2009) Ghrelin in Central Neurons. *Curr Neuropharmacol.* 7:37-49.
176. Gutierrez JA, *et al.* (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(17):6320-6325.
177. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, & Goldstein JL (2008) Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* 132(3):387-396.
178. Kirchner H, *et al.* (2009) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat. Med.* 15(7):741-745.
179. Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, & Holst B (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors – opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br. J. Pharmacol.* 170:1349-1362.
180. Moulin A, Ryan J, Martinez J, & Fehrentz J-A (2007) Recent Developments in Ghrelin Receptor Ligands. *ChemMedChem* 2(9):1242-1259.
181. Matsumoto M, *et al.* (2001) Structure–Activity Relationship of Ghrelin: Pharmacological Study of Ghrelin Peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287(1):142-146.
182. Matsumoto M, *et al.* (2001) Structural Similarity of Ghrelin Derivatives to Peptidyl Growth Hormone Secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(3):655-659.

183. Bednarek MA, *et al.* (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Homormone Secretagogue Receptor 1a. *J. Med. Chem.* 43:4370-4376.
184. Van Craenenbroeck M, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, & Perret J (2004) Ala-scan of ghrelin (1-14): interaction with the recombinant human ghrelin receptor. *Peptides* 25:959-965.
185. Ma Y, Kubicek J, & Labahn J (2013) Expression and Purification of Functional Human Mu Opioid Receptor from E.coli. *Plos One* 8(2):1-7.
186. Stanasila L, Massotte D, Kieffer BL, & Pattus F (1999) Expression of δ , κ and μ human opioid receptors in Escherichia coli and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *Eur. J. Biochem.* 260(2):430-438.
187. Li JG, Chen CG, & Liu-Chen LY (2007) N-glycosylation of the Human kappa opioid receptor enhances its stability but slows its trafficking along the biosynthesis pathway. *Biochemistry* 46(38):10960-10970.
188. Renault M, *et al.* (2009) Solution State NMR Structure and Dynamics of KpOmpA, a 210 Residue Transmembrane Domain Possessing a High Potential for Immunological Applications. *J. Membr. Biol.* 385(1):117-130.
189. Banères J-L, Popot J-L, & Mouillac B (2011) New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol.* 29(7):314-322.
190. Banères J-L, *et al.* (2005) Molecular Characterization of a Purified 5-HT₄ Receptor. *J. Biol. Chem.* 280(21):20253-20260.
191. Thomas JB, *et al.* (2001) Identification of the first trans-(3R,4R)-dimethyl-4-(3-hydroxyphenyl)piperidine derivative to possess highly potent and selective opioid kappa receptor antagonist activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 44(17):2687-2690.
192. Simonin F, *et al.* (1995) Kappa-Opioid Receptor in Humans - Cdna and Genomic Cloning, Chromosomal Assignment, Functional Expression, Pharmacology, and Expression Pattern in the Central-Nervous-System. *P Natl Acad Sci USA* 92(15):7006-7010.
193. Vergis JM & Wiener MC (2011) The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. *Protein Expr. Purif.* 78(2):139-142.
194. Rosenbaum DM, *et al.* (2007) GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into b₂-Adrenergic Receptor Function. *Science* 318:1266-1273.
195. Pantel J, *et al.* (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J. Clin. Investig.* 116(3):760-768.
196. Cherezov V (2011) Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 21(4):559-566.
197. Harder D & Fotiadis D (2012) Measuring substrate binding and affinity of purified membrane transport proteins using the scintillation proximity assay. *Nat. Protoc.* 7(9):1569-1578.
198. Hulme E. C. & Trevethick MA (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* 161:1219-1237.
199. Caffrey M & Cherezov V (2009) Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat. Protoc.* 4(5):706-731.
200. Holst B, *et al.* (2007) Identification of an Efficacy Switch Region in the Ghrelin Receptor Responsible for Interchange between Agonism and Inverse Agonism. *J. Biol. Chem.* 282(21):15799-15811.
201. Holst B, *et al.* (2008) Overlapping Binding Site for the Endogenous Agonist, Small-Molecule Agonists, and Ago-allosteric Modulators on the Ghrelin Receptor. *Mol. Pharmacol.* 75(1):44-59.
202. Mokrosiński J, Frimurer TM, Sivertsen B, Schwartz TW, & Holst B (2012) Modulation of Constitutive Activity and Signaling Bias of the Ghrelin Receptor by Conformational Constraint in the Second Extracellular Loop. *J. Biol. Chem.* 287(40):33488-33502.
203. Staus DP, *et al.* (2016) Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* 535(7612):448-452.

204. Steyaert J & Kobilka BK (2011) Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21(4):567-572.
205. Pardon E, *et al.* (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 9(3):674-693.
206. Denisov IG & Sligar SG (2017) Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* 117(6):4669-4713.
207. Hagn F, Nasr ML, & Wagner G (2018) Assembly of phospholipid nanodiscs of controlled size for structural studies of membrane proteins by NMR. *Nat. Protoc.* 13(1):79-98.
208. Zhang YQ, *et al.* (2017) An improved protocol for amino acid type-selective isotope labeling in insect cells. *J Biomol Nmr* 68(4):237-247.
209. Carpenter B & Tate CG (2016) Engineering a minimal G protein to facilitate crystallisation of G protein-coupled receptors in their active conformation. *Protein Eng. Des. Sel.* 29(12):583-593.
210. Wacker D, Stevens RC, & Roth BL (2017) How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* 170(3):414-427.
211. Igonet S, *et al.* (2018) Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Sci Rep.* 8(1).
212. Congreve M, *et al.* (2012) Discovery of 1,2,4-Triazine Derivatives as Adenosine A2A Antagonists using Structure Based Drug Design. *J. Med. Chem.* 55(5):1898-1903.
213. Christopher JA, *et al.* (2015) Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR: Discovery of the mGlu5 Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzotrile). *J. Med. Chem.* 58(16):6653-6664.
214. Smith NJ (2016) Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches. *Br. J. Pharmacol.* 173:2934-2951.
215. Andreas LB, *et al.* (2016) Structure of fully protonated proteins by proton-detected magic-angle spinning NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(33):9187-9192.
216. Saurel O, *et al.* (2017) Local and Global Dynamics in Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Protein a in Lipid Bilayers Probed at Atomic Resolution. *J. Am. Chem. Soc.* 139(4):1590-1597.
217. Schubeis T, Le Marchand T, Andreas LB, & Pintacuda G (2018) 1H magic-angle spinning NMR evolves as a powerful new tool for membrane proteins. *J. Magn. Reson.* 287:140-152.
218. Nodet G & Blackledge M (consulté en Juillet 2019) La relaxation en résonance magnétique nucléaire. http://thcgerm.free.fr/IMG/pdf/Blackledge_1.pdf.
219. Lipari G & Szabo A (1982) Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *J. Am. Chem. Soc.* 104(17):4546-4559.
220. Barthe P, Ropars V, & Roumestand C (2006) DYNAMOF : un programme pour l'analyse dynamique de données de relaxation obtenues à champs magnétiques multiples. *Comptes Rendus Chimie* 9(3-4):503-513.
221. Daragan VA & Mayo KH (1999) Using the model free approach to analyze NMR relaxation data in cases of anisotropic molecular diffusion. *J. Phys. Chem. B* 103(32):6829-6834.
222. Lipari G & Szabo A (1982) Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .2. Analysis of Experimental Results. *J. Am. Chem. Soc.* 104(17):4559-4570.
223. Farrow NA, *et al.* (1994) Backbone Dynamics of a Free and a Phosphopeptide-Complexed Src Homology 2 Domain Studied by 15N NMR Relaxation. *Biochemistry* 33:5984-6003.
224. Hagn F, Etzkorn M, Raschle T, & Wagner G (2013) Optimized Phospholipid Bilayer Nanodiscs Facilitate High-Resolution Structure Determination of Membrane Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 135(5):1919-1925.
225. Clore GM, *et al.* (1990) Deviations from the Simple Two-Parameter Model-Free Approach to the Interpretation of Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Relaxation of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 112:4989-4991.
226. Ropars V, *et al.* (2007) Unraveling protein dynamics through fast spectral density mapping. *J Biomol Nmr* 37(3):159-177.

227. Ni F (1992) Complete Relaxation Matrix Analysis of Transferred Nuclear Overhauser Effects. *J. Magn. Reson.* 96:651-656.
228. Xie M, *et al.* (2019) Functional protein dynamics on uncharted time scales detected by nanoparticle-assisted NMR spin relaxation. *Sci. Adv.* 5:1-6.
229. Fersht AR (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science.*
230. Catoire LJ, Damian M, Baaden M, Guittet É, & Banères J-L (2011) Electrostatically-driven fast association and perdeuteration allow detection of transferred cross-relaxation for G protein-coupled receptor ligands with equilibrium dissociation constants in the high-to-low nanomolar range. *Journal of Biomolecular NMR* 50(3):191-195.
231. Wang C, Grey MJ, & Palmer AG (2001) CPMG sequences with enhanced sensitivity to chemical exchange. *J. Biomol. NMR* 21:361-366.
232. Ishima R & Torchia DA (1999) Estimating the time scale of chemical exchange of proteins from measurements of transverse relaxation rates in solution. *J Biomol Nmr* 14:369-372.
233. Wüthrich K (1986) *NMR of proteins and nucleic acids.*
234. Xu F, Liu W, Hanson MA, Stevens RC, & Cherezov V (2011) Development of an Automated High Throughput LCP-FRAP Assay to Guide Membrane Protein Crystallization in Lipid Mesophases. *Cryst. Growth Des.* 11(4):1193-1201.

Auteur : Guillaume Ferré.

Titre : Dynamique structurale de complexes RCPG – neuropeptides.

Directeurs de thèse : Pr. Alain Milon et Dr. Pascal Demange.

Résumé :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) reconnaissent un ligand extracellulaire afin de transmettre l'information correspondante à l'intérieur de la cellule. Ils sont des acteurs prépondérants en physiologie ainsi que des cibles pharmacologiques majeures. Nous avons étudié deux RCPG dont les ligands endogènes sont des peptides.

a) Le récepteur κ opioïde (KOP) qui reconnaît la dynorphine. Ce récepteur joue un rôle fondamental dans la régulation de la douleur et des mécanismes de récompense (et donc dans l'addiction). La découverte, la pharmacologie et les relations structure - fonction de la dynorphine sont décrites dans cette thèse sous la forme d'une revue publiée en 2019 dans « Vitamins and Hormones ». L'activité des RCPG est assurée par une dynamique conformationnelle riche et la résonance magnétique nucléaire (RMN) est particulièrement adaptée pour l'étudier. Elle nécessite néanmoins le marquage isotopique de la protéine d'intérêt, or la plupart des études structurales utilisent des RCPG surexprimés en cellules d'insecte. Nous avons mis au point la production de KOP avec une stratégie d'expression chez *E. coli*, outil de choix pour le marquage isotopique. Le récepteur recombinant a été purifié puis renaturé en micelles de détergent et s'est avéré être fonctionnel pour la liaison de son ligand. Ce sera un outil de choix pour des études structurales et dynamiques par RMN.

b) Le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHSR), qui est naturellement activé par la ghréline, une hormone peptidique digestive acylée impliquée dans l'appétit, la sécrétion de l'hormone de croissance et l'homéostasie du glucose. Les interactions peptide – RCPG sont mal connues au niveau structural en raison de la difficulté à cristalliser ces complexes. Utilisant un récepteur GHSR perdeutérié, produit dans *E. coli* et reconstitué en nanodisques lipidiques dans l'équipe de J.L. Banères (IBMM, Montpellier), nous avons utilisé différentes expériences de RMN (relaxation ^{15}N , NOE transféré et STD) pour caractériser finement la structure et la dynamique de la ghréline liée à son récepteur. Nous avons ainsi mis en évidence le mécanisme par lequel la chaîne acyle en position 3 de la ghréline assure une reconnaissance spécifique par GHSR.

Abstract :

G protein-coupled receptors (GPCR) recognize an extracellular ligand in order to transmit the corresponding information inside the cell. They are major players in physiology and predominant pharmacological targets. Here, we studied two GPCR for which the endogenous ligands are peptides.

a) The κ opioid receptor (KOP), which recognizes dynorphin, and which is involved in the regulation of pain and reward mechanism (and thus in addiction). The discovery, pharmacology and structure – activity relationship of dynorphin are described in this manuscript as a review published in “Vitamins and Hormones” in 2019. GPCR activity requires a complex conformational dynamics and nuclear magnetic resonance (NMR) is an excellent technique allowing such characterization. However, it requires isotope labeling of the proteins of interest and most of GPCR structural studies used receptors expressed in insect cells. We produced KOP using an *E. coli* expression strategy, which is the tool of choice for isotope labeling. The recombinant receptor was successfully refolded in detergent micelles and was shown to be functional in terms of ligand binding. It offers new possibilities to study its structure and dynamics by NMR.

b) The growth hormone secretagogue receptor (GHSR) is naturally activated by ghrelin, a digestive peptide hormone of 28 amino-acids residues. This hormone – receptor system is involved in a multitude of physiological process such as the regulation of food intake, growth hormone secretion and glucose homeostasis. However, structural information about peptide – GPCR interaction is sparse because of the difficulty in crystallizing such complexes. Using a perdeuterated receptor expressed in *E. coli* and refolded in lipid nanodiscs in the group of J.L. Banères (IBMM, Montpellier), we used several liquid state NMR techniques (^{15}N relaxation, transferred NOE, saturation transfer difference) to characterize the 3D structure and dynamics of ghrelin bound to GHSR. Our work particularly shed the light on the role of a post-translational modification (acylation on Ser 3) on the receptor specific recognition mechanism.

Mots-clés/keywords : neuropeptides, dynamique fonctionnelle / functional dynamics, membranes, transduction du signal / signal transduction.

Discipline : Biologie structurale et fonctionnelle.

Laboratoire : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France.