#### Université Louis Pasteur de Strasbourg École Doctorale Vie et Santé

Thèse pour l'obtention du grade de

Docteur en Biologie Moléculaire et Cellulaire

# Expression hétérologue de Récepteurs Couplés aux Protéines G dans la levure Pichia pastoris Une contribution au projet MePNet

Présentée par

#### Nadia CHEROUATI

#### Devant les membres du jury :

Mr Franc Pattus, Illkirch Mr Serge Potier, Strasbourg Mr Bernard Mouillac, Montpellier Mr Thierry Vernet, Grenoble Mme Susanna Cotecchia, Lausanne Directeur de Thèse Rapporteur Interne Rapporteur Externe Rapporteur Externe Examinateur

Soutenue le 28 septembre 2005 A l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

#### Remerciements

J'aimerais commencer ce manucrit en remerciant plusieurs personnes qui ont participé et contribué à la réalisation de ce travail ....

Merci tout d'abord aux Professeurs Serge Potier et Susanna Cotecchia ainsi qu'aux Docteurs Bernard Mouillac et Thierry Verney d'avoir acceptés de juger ce travail.

Je voudrais ensuite remercier mon directeur de thèse, le Docteur Franc Pattus, directeur du département des Récepteurs et Protéines membranaires du CNRS, UMR7100. Merci d'avoir toujours été présent, de m'avoir fortement soutenu et d'avoir toujours trouvé du temps pour discuter science. Je regrette, seulement, de ne pas avoir pu réaliser toutes les expériences que l'on avait envisagées. Je voudrais aussi vous remercier pour vos conseils avisés et votre enthousiasme communicateur.

J'adresse également un grand merci à Renaud Wagner coordinateur local du projet MePNet pour m'avoir supervisé tout au long de ma thèse.

Merci d'avoir été présent aussi bien dans les moments faciles que difficiles. Je te remercie de m'avoir soutenu toutes ces années et de m'avoir fait confiance. Merci d'avoir pris le temps de m'aider à faire le point à chaque fois où j'hésitais ... . J'espère vraiment que l'on gardera contact tout au long de mon périple futur ... .

J'aimerais ensuite remercier Etienne L'Hermite, directeur de l'entreprise de biotechnologie BioXtal. Merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse Cifre en partenariat avec la société BioXtal et de m'avoir ainsi permis d'apporter ma pierre à cet innovant projet européen de biologie structurale : MePNet. J'espère sincèrement que ce projet poursuivra sa route encore longtemps ...

Je voudrais également remercier Gabrielle Zeder-Lutz. Merci de ton soutien. Je suis très heureuse d'avoir pu travailler avec toi. Cela m'a beaucoup appris.

Merci également à Hervé Celia et Thierry Magnin pour leur aide et leurs conseils.

Merci à Tania Steffan, Juliette Kempf et Isabelle Lepaul avec qui j'ai apprécié de travailler dans la bonne humeur.

Merci à Estelle Pfister et Fanny Bertrand, deux stagières d'IUT, qui m'ont beaucoup aidé à faire avancer ce travail.

Merci au laboratore d'H. Michel à Frankfort avec qui nous avons étroitement collaboré et plus particulièrement à Christophe Reinhart, Cécile Prual et Nicolas André.

Merci au laboratoire de So Iwata à Londres qui poursuit l'étude de certains récepteurs décris dans cette thèse.

Merci également à tous ceux que je n'ai pas nommés mais avec qui j'ai pu interagir ainsi qu'à l'ensemble des collaborateurs MePNet.

Je n'oublie pas ma famille et mes proches, merci de m'avoir encouragé dans cette étape si importante pour moi.

« Fabrice, tu sais que ton soutien m'a aidé plus que tout ... Merci d'être là. »

Table des matières

# Table des matières

ABLE DES MATIÈRES				
ABREVIATIONS	5			
INTRODUCTION	7			
CHAPITRE 1 : LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G	10			
I. Historique	11			
1. La notion de récepteur				
2. Les débuts des récepteurs couplés aux protéines G	15			
II. RCPG et maladies	18			
1. Mutations perte de fonction				
2. Mutations gain de fonction				
3. Le polymorphisme	19			
III. Famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G	22			
1. Les RCPG : Structure et fonction				
2. La famille des RCPG				
3 .Transduction du signal				
4. Mécanisme d'inactivation des RCPG : la désensibilisation				
5. L'Oligomérisation				
CHAPITRE 2 : LES OBJECTIFS ET LA STRUCTURE DU PROGRAM				
I. Les RCPG et la génomique structurale	45			
II. Les réseaux nationaux et internationaux	47			
III. Membrane Protein Network, MePNet : la structure du réseau	49			
CHAPITRE 3: LES RÉCEPTEURS ÉTUDIÉS	53			
I. La sérotonine et ses récepteurs				
1. Les récepteurs à sérotonine	54			
2. La sous-classe des récepteurs 5HT1, les récepteurs 5HT1A, 5HT1D et 5HT1F				
	54			
II. La cholecystokinine. la gastrine et les récepteurs à cholecystokinine	54 57			
II. La cholecystokinine, la gastrine et les récepteurs à cholecystokinine	54 57			
II. La cholecystokinine, la gastrine et les récepteurs à cholecystokinine	54 57 60			
Introduction      Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)				
1. Introduction				
Introduction     Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)  III. L'histamine et les récepteurs histaminergiques				
Introduction     Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)  III. L'histamine et les récepteurs histaminergiques      Introduction      Le récepteur à Histamine H2.				
1. Introduction 2. Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)  III. L'histamine et les récepteurs histaminergiques  1. Introduction 2. Le récepteur à Histamine H2  IV. Les récepteurs métabotropiques du glutamate				
Introduction     Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)  III. L'histamine et les récepteurs histaminergiques      Introduction      Le récepteur à Histamine H2.				

#### Table des matières

V. L'hormone de melano-concentration (MCH) et les récepteurs	
1. Introduction	
2. Le récepteur MCHR1 (SLC1)	71
VI. Les récepteurs à neuropeptide Y	72
1. Introduction	
2. Le récepteur NPY1	73
VII. Les récepteurs purinergiques	75
1. Introduction	
2. Le récepteur P2Y1	
VIII. Les récepteurs à somatostatine	77
IX. Les récepteurs à vasopressine	70
·	
X. Les récepteurs à Phéromone	80
CHAPITRE 4 : LES SYSTÈMES D'EXPRESSION HÉT	ÉDOLOGUE 01
CHAPITRE 4: LES SYSTEMES D'EXPRESSION HET	EKULUGUE81
I. Système d'expression procaryote : Escherichia coli	83
II. Les systèmes d'expressions eucaryotes	87
1. Les cellules de mammifères	
2. Cellules de mammifère infectées par SFV	89
3. Le système d'expression levure	92
CHAPITRE 5 : COLLECTE ET CLONAGE DES GÈNE	S CODANT DOLLD LES
RCPG	
I. Introduction : stratégies globales, de collecte et de clonage, é	
1. Sélection des cibles	
2. Clonage d'ADN	
3. Problématique liée à la collecte des ADN codant les RCPG sélections	és114
II. Résultats et Discussion	116
1. Développement et validation d'approches alternatives aux stratégies i	
2. Conclusion.	
III. Matériels et méthodes	123
<b>CHAPITRE 6: TRANSFORMATION INTÉGRATIVE D</b>	
ET SÉLECTION DES CLONES RECOMBINANTS	127
I. Introduction	128
II. Résultats	131
1. Linéarisation	121
2 Méthodes de criblage des transformants	
2. Méthodes de criblage des transformants	

CHAPITRE 7 : EXPRESSION DES RCPG	143
I. Introduction	144
II. Sélection des clones d'expression	145
1. Culture et préparation des échantillons	
2. Mise au point d'une technique de détection adaptée	147
3. Validation de la procédure de sélection des meilleurs clones d'expression pour un panel de 13 récepte	
III. Analyses qualitatives et optimisation des niveaux d'expression	
2. Analyse comparative de quelques récepteurs exprimés chez <i>Pichia pastoris</i> et dans le système SFV	
3. Optimisation globale des conditions d'expression	
4. Optimisations spécifiques pour trois RCPG	
III. Conclusion	176
IV. Matériels et méthodes	177
ANNEXE 1	180
ANNEXE 2	206
ANNEXE 3	215
CHAPITRE 8 : SOLUBILISATION ET PURIFICATION	243
I. Introduction	244
II. Solubilisation	246
1. Solubilisation du récepteur à sérotonine 1D	
2. Solubilisation du récepteur à neuropeptide Y1	249
3. Solubilisation du récepteur à histamine H2	251
III. Purification	252
1. Purification dans des conditions classiques	253
2. Purification en stabilisant par l'intermédiaire d'ajout de ligand	260
IV. Fermentation	265
V. Glycosylation et modifications post-traductionnelles	267
VI. Conclusion	269
VII. Matériels et méthodes	271
CHAPITRE 9 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	274
BIBLIOGRAPHIE	278

### **ABREVIATIONS**

#### Abreviations

5HT1D: récepteur à serotonine (5-Hydroxytryptamine 1D)

AC: adénylate cyclase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire d'un ARNm

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

APS : ammonium persulfate
ARN : acide ribonucléique

ARN Poly A+: acide ribonucléique ayant une extrémité poly A

ATP: adénosine triphosphate

BET: bromure d'éthidium

BHK: « Baby Hamster Kidney »

Bmax: « maximal bound » liaison maximale

BSA: « Bovine serum albumin »

CHAPS: acide 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1- propanesulfonique

(détergent)

CMC : concentration micellaire critique

DO: densité optique

EDTA: éthylène diamine tétraacétate

GDP: guanosine diphosphate
GTP: guanosine triphosphate
HH2: récepteur à histamine H2
HRP: peroxydase de radis noir
Kd: constante de dissociation

kDa: kilo Dalton
nM: nanomolaire

NPY1: récepteur à neuropeptide Y1
PBS : Tampon phosphate salin

PCR: Réaction en chaîne par polymerase

PEI: Polyéthylèneimine

PMSF: Phenylmethylsulphonylfluoride RCPG: récepteur couplé aux protéines-G

RT-PCR: amplification en chaîne par polymérase précédée par une reverse

transcription

SDS-PAGE: électrophorése de gel de polyacrylamide en présence de sodium

dodécyl sulfate

SFV: Virus de la forêt de semliki
TM: domaine transmembranaire

# Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent une famille protéique majeure des membranes biologiques qui relayent des messages clefs de la vie cellulaire impliqués dans des phénomènes biologiques essentiels tels que la différentiation, la prolifération, l'angiogénése, le développement et la survie cellulaire.

Bien que ces protéines représentent la cible de près des deux tiers des médicaments présents sur le marché, la conception de nouveaux médicaments basée sur des données structurales, qui se révèle efficace en ce qui concerne les protéines cytosolubles (Exemple : Inhibiteurs de protéase HIV Viracept™, et Argenerase™, les inhibiteurs de neuraminidase tel que le Relenza™, et le Tamiflu™), n'a eu jusqu'a présent aucun succés en ce qui concerne les RCPG et pour cause : la seule structure à haute résolution actuellement disponible est celle de la rhodopsine bovine (Palczewski K. et al., 2000).

La raison de ce criant paradoxe tient essentiellement au fait que ces protéines sont naturellement très faiblement exprimées dans leur tissu d'origine et qu'il existe des barrières expérimentales majeures à chaque étape de la procédure qui, de l'expression à la solubilisation et à la purification, rendent particulièrement difficile la réalisation d'études structurales.

Le réseau européen MePNet (Membrane Protein Network) est l'un des rares programmes de génomique structurale qui s'intéresse à l'étude des protéines membranaires, le seul qui se consacre entiérement aux RCPG. L'objectif de ce programme est double puisque, à partir de l'étude de 100 membres de cette famille protéique produits à l'aide de plusieurs systèmes d'expression, il a pour but à la fois de dresser une vision statistique des réussites et des problèmes rencontrés dans ce type d'approche, mais aussi d'augmenter la probabilité de déterminer les conditions de solubilisation, purification et cristallisation des candidats les meilleurs pour en obtenir la structure tridimensionnelle.

Le groupe de biologie structurale des protéines membranaires dirigé par le Dr Franc Pattus s'intéresse à l'étude des récepteurs couplés aux protéines G et des transporteurs de fer (récepteur à sidérophore) des bactéries Gram négatives (principalement *P. aeruginosa* et *E. coli*). Ce laboratoire présente des compétences dans le domaine de la biologie moléculaire, la biochimie et la biophysique des protéines membranaires ainsi qu'en microscopie électronique et cristallographie aux rayons X. Parmi ce groupe, une équipe se consacre entiérement au projet MePNet (coordinateur local : Renaud Wagner).

La mission qui a été attribuée à cette équipe au sein du réseau MePNet est multiple. Elle consiste dans un premier temps à réaliser de la partie biologie moléculaire du projet qui comprend la collecte des ADNc, la construction des vecteurs d'expression et le clonage de la centaine de RCPG sélectionnés dans ces vecteurs d'expression.

La seconde partie réalisée en collaboration avec le laboratoire d'Harmut Michel à Francfort, comprend l'expression de ces récepteurs dans la levure *Pichia pastoris*, l'adaptation des méthodologies permettant de répondre aux contraintes du projet, l'étude fonctionnelle de ces cibles (par des tests de fixation de ligand à l'équilibre) ainsi que leurs solubilisations et purifications.

L'équipe d'Illkirch se consacre également à la caractérisation de l'expression et de la fonctionnalité des cibles exprimées dans des cellules de mammiféres infectés par SFV (Virus de la Forêt de Semliki) fournies par le laboratoire de la société Bio-Xtal (Lausanne).

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit est une contribution au programme MePNet. A chacune des étapes de ce programme, l'objectif de ce travail consiste à étudier un panel représentatifs de RCPG tout en réalisant les adaptations et les développements méthodologiques nécessaire permettant d'atteindre les objectifs fixés et de répondre à la dimension haut-débit du projet.

Après une introduction répartie sur quatre chapîtres consacrés aux RCPG, aux programmes de génomique structurale et aux systèmes d'expression hétérologues, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse seront exposés en suivant la trame du projet MePNet.

Le premier chapître consacré à ces travaux (chapître 5) retrace dans un premier temps les choix et les stratégies qui ont été sélectionnés pour ce programme. Il présentera ensuite une méthodologie alternative mise au point dans le but de faciliter la collecte des ADNc nécessaires au projet.

Le second chapître (chapître 6) présentera les stratégies utilisées afin de permettre l'utilisation d'une méthodologie de transformation et de criblage des transformants communes à l'ensemble de RCPG exprimés dans la levure *Pichia pastoris*.

Le troisième chapitre (chapître 7) se consacrera à l'étude de l'expression des RCPG chez *P. pastoris*. Il présentera dans une première partie une méthodologie d'immunodétection optimisée pour le projet qui permet le criblage des différents clones et récepteurs en fonction de leurs niveaux d'expression. La seconde partie décrira l'étude qualitative de l'expression (par « binding ») avec dans un premier temps une comparaison avec le système d'expression SFV (Semliki Forest Virus) suivie par le criblage de différents paramètres dans le but d'optimiser les conditions d'expression et d'améliorer les résultats obtenus dans des conditions d'induction classiques.

La dernière partie (chapître 8) se consacrera à des études de solubilisation et de purification de quelques récepteurs.

# **Chapitre 1 : Les Récepteurs Couplés aux Protéines G**

#### I. Historique

#### 1. La notion de récepteur

De nos jours, le concept de récepteur fait partie intégrante de la pharmacologie. Cependant, cette idée date de plus de 100 ans. Cette notion est apparue, à l'origine, pour expliquer la spécificité et la sensibilité de la réponse cellulaire à divers agents. Des recherches sur le concept des récepteurs ont eu lieu par intermittence entre les années 1870 et 1939 (figure 4).

L'un des pionniers dans l'étude des récepteurs était certainement l'immunologiste Berlinois Paul Ehlrich (1854-1915) (Figure 1) qui proposa en 1897 la théorie de la « sidechain » afin d'expliquer la réponse immunitaire (la « side chain » pouvant être reconnu dans un organisme hôte comme « étrangère » et entraîner une réponse immunitaire). Cette théorie suppose l'existence de « side chain » sur les cellules de mammifère pour permettre la reconnaissance des agents complémentaires d'une toxine ou d'un anticorps.

Il introduit, en 1900, le terme de « récepteur » pour remplacer celui de « side chain » (Ehrlich et al.1957; Maehle et al. 2002)



Figure 1: Paul Ehrlich (1854-1915)

Ehlrich faisait également souvent référence à un dicton selon lequel « *Corpora non agunt nixi fixita* » ce qui signifie que les agents ne peuvent pas agir à moins d'être d'abord liés. Ce qui résume un principe de base de la biologie des récepteurs.

Durant cette période Ehrlich proposa l'existence de différents types de récepteurs possédant un nombre variable de sites de liaison tels que les « amboceptors » (figure 2), les « triceptor », les « quadriceptors » et même les « polyceptors ».

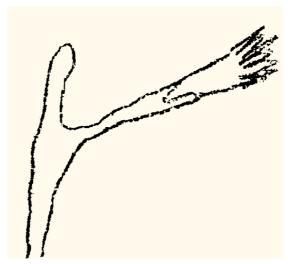


Figure 2: L' « Amboceptor » (Maehle et al. 2002) Une substance (sur la droite) est liée à un des deux sites de liaison de la « side chain ». (Hiltherto croquis non publié par Paul Ehrlich, 1901).

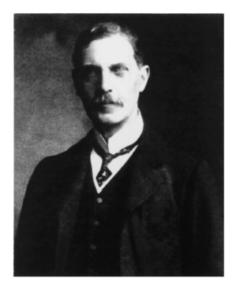


Figure 3: John Newport Langley (1852-1926)

En 1905, un physiologiste de Cambridge, John Newport Langley (1852-1926) (figure 3) déclara que les poisons ne peuvent pas agir directement sur les substances contractiles mais qu'ils utilisent des substances accessoires de la cellule du muscle, qu'il appela «substance réceptive». Il basa cette idée sur la découverte d'un antagonisme mutuel de deux drogues (telles que le curare et la nicotine ou l'atropine et la pilocardine) sur un tissu qui varie en fonction de la concentration des drogues utilisées. Cela suggéra la formation par les drogues d'un complexe, selon des lois basées en fonction de la concentration relative et

de l'affinité de ces drogues avec l'agent complexant dans la cellule cible (Langley et al. 1905). Il définit également le récepteur comme transducteur de signaux :

« ... receives the stimulus and, by transmitting it causes contraction » (Langley et al. 1906).

Les critiques de la part du monde scientifique furent immédiates et rejetèrent la théorie des récepteurs. En effet, ils ne considéraient pas ce concept suffisamment valable pour expliquer l'action des agents pharmacologiques.

Ehlrich accepta le point de vue de Langley et proposa l'existence de récepteurs pour les drogues (en plus des toxines). En 1907, sur la base de ses expériences utilisant la teinture sur des trypanosomes, il introduisit le mot de «chémorécepteur» pour décrire l'interaction des drogues sur les cellules. Puis lors de ses travaux avec son étudiant Dale ils développèrent le concept de « la théorie du récepteur » (1920/1970).

Les recherches d'Ehrlich et Langley laissèrent une marque dans l'histoire de la pharmacologie mais la recherche sur les récepteurs ne débutât concrètement qu'en 1948 lorsque Raymond P. Ahlquist (1914-1983) démontra la présence de deux sous-types de récepteurs adrénergiques qu'il appela « alfa » et «bêta ». La recherche sur les récepteurs commença alors à alimenter l'innovation pharmaceutique.

Malgré ces données, l'existence des récepteurs est restée très controversée et s'est retrouvée en compétition avec d'autres théories. Durant la période allant de 1895 à 1930 au moins quatre théories alternatives expliquant l'action des drogues se sont affrontées (Maehle et al. 2002).

C'est à partir de 1970 que la recherche moléculaire sur les récepteurs débutât (Lefkowitz et al. 2004). L'idée de récepteur émergea lentement et par intermittence à partir de différents domaines comprenant les travaux réalisés en physiologie du système nerveux, en chimie du métabolisme, les débuts de l'immunologie ainsi que l'analyse mathématique et les données pharmacologiques.

Les pionniers du concept de récepteur tel que Langley, Ehrlich et plus tard Clark ont clairement reconnus l'importance des récepteurs pour la compréhension des phénomènes biologiques. Ils ont également anticipé ce potentiel pour la pharmacothérapie (Maehle et al. 2002).

Au cours des 20 dernières années, l'avancé de la biologie moléculaire a permis de fournir les bases génétiques du concept de récepteur et a aidé, par la suite, à révéler l'évidence pharmacologique de la grande diversité des substances réceptives (Robinson et al. 2001).

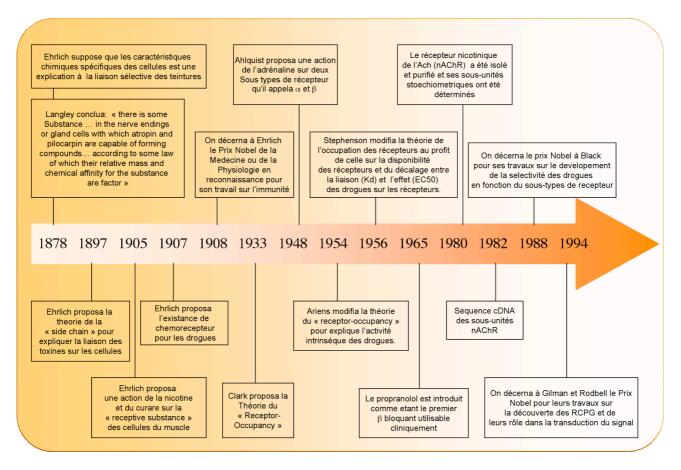


Figure 4: (Maehle et al 2002) Evénements clés de la découverte et de la création du concept des récepteurs.

#### 2. Les débuts des récepteurs couplés aux protéines G

Les premiers modèles qui ont d'abord émergé et qui nous ont éclairé sur notre compréhension des récepteurs couplés aux protéines G comprennent l'étude du récepteur  $\beta 2$  adrénergique (Lefkowitz et al.1986; Dohlman et al. 1991) ainsi que du récepteur de la rhodopsine (Benovic et al.1986) .

#### 2.1. Rhodopsine

Ce récepteur constitue environ 90% des protéines membranaires des bâtonnets de la rétine bovine (3mM) (figure 5). Ceci permet d'avoir à partir des préparations de membrane de ces organes, une activité spécifique de récepteur pratiquement comparable à des préparations de récepteur pur. L'étape de purification après solubilisation est ainsi simplifiée. (On peut isoler à partir d'une rétine bovine, environ 0,5 à 1mg de rhodopsine).

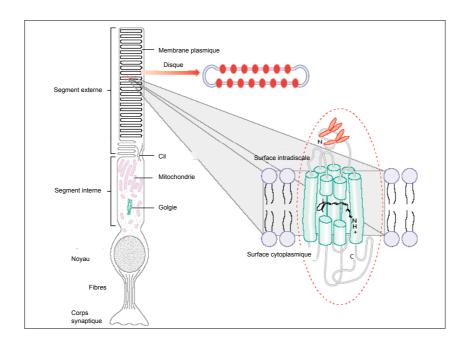


Figure 5: Cellule en bâtonnet.

Les cellules en bâtonnet de la rétine sont des neurones très spécialisés dont le segment externe contient principalement une membrane plasmique enveloppant un empilement de disques membranaires. Les disques contiennent 50% de lipides et 50% de protéines. La rhodopsine constitue la majorité des protéines membranaires intrinsèques du disque. Une molécule de rhodopsine est représentée avec sept hélices transmembranaires formant un corps central qui fournit une poche au 11-cis rétinien. (Hargrave et al. 1993).

La disponibilité de ces grandes quantités de matériels a permis le séquençage protéique complet du premier RCPG. Le séquençage de la rhodopsine bovine a été réalisé, en 1982, de manière indépendantes par Hargrave (Hargrave. 1983) et Ovchinnikov (Ovchinnikov et al. 1982). Le gène de la rhodopsine a ensuite été très rapidement cloné par Nathan et Hogness (Nathan et al. 1983). Ce travail a permis de prédire la présence des sept segments hydrophobes suggérant la présence de sept hélices  $\alpha$  transmembranaires dans la structure de ce RCPG (Lefkowitz 2000).

Il faut noter qu'au départ la rhodopsine n'était pas considérée comme étant un modèle représentatif des récepteurs. En effet, dans un premier temps, l'homologie de structure entre la rhodopsine et la bacteriorhodopsine (une pompe à proton sensible à la lumière présente dans une bactérie halophilique) a d'abord été mise en évidence malgré l'absence d'identité de séquence. Cependant la présence dans les deux cas des sept segments transmembranaires a amené à l'hypothèse selon laquelle les protéines sensibles à la lumière posséderaient toutes une structure à sept domaines transmembranaires (Hargrave et al. 1983).

Ce n'est qu'après le clonage du récepteur β2 adrénergique que l'homologie de structure avec la rhodopsine a pu être appréciée. Cet arrangement structural a alors été considéré comme devant appartenir à cette nouvelle famille de récepteur : les RCPG.

#### 2.2. ß 2 adrénorécepteur

En 1948, Raymond Ahlquist découvrait l'existence des sous-types  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques. Il a ainsi ouvert la voie aux  $\beta$  bloquants.

Ce récepteur a également été étudié par Sutherland (Robison et al. 1967) et Krebs (Walsh et al.1968) pour son rôle activateur de l'adenylate cyclase.

De plus, le développement de l'approche de fixation de radioligand à l'équilibre au cours des années 1970 (qui permettait pour la première fois une étude directe des récepteurs) ainsi que la disponibilité de nombreux ligands pour ce récepteur, ont favorisé son étude.

La purification de ce récepteur a été permise grâce à la mise en place de nombreuses technologies cruciales. Pour la solubilisation du récepteur, l'utilisation de la digitonine (qui avait été utilisée avec succès sur la rhodopsine), a permis d'éviter la dénaturation de récepteur. Le second développement technique a été l'utilisation d'une chromatographie d'affinité dont la matrice était couplée à un antagoniste du récepteur ß

adrénergique. Cette chromatographie a permis la purification d'un récepteur ß2 adrénergique actif.

En 1981, le récepteur ß2 adrénergique a été purifié à partir d'érythrocytes d'amphibiens (Shorr et al. 1981). Puis, en 1982 le récepteur ß1 à été purifié à partir d'érythrocytes aviaires (Shorr et al. 1982).

Ces récepteurs ont ensuite été reconstitués en présence de protéine Gs purifiés (Cerione et al. 1984) ainsi qu'avec la région catalytique de l'adénylate cyclase (Cerione et al. 1984; May et al. 1985). Ceci a permis une identification fonctionnelle et a également permis de déterminer les composants nécessaires et suffisants à la mise en place d'un système agoniste—sensible à l'adenyl cyclase. Ces expériences ont validé le modèle à trois composants (récepteur, transducteur et effecteur) qui a été proposé 15 ans auparavant par Rodbell (Rodbell et al. 1971).

Le clonage du gène codant pour le récepteur ß2 adrénergique de hamster a eu lieu en 1986 (Dixon et al. 1986). Le clonage de ce gène apporta deux informations principales. La première consiste en l'observation selon laquelle ce gène n'avait pas d'intron (seul 2 ou 3 autres gènes de mammifères sans introns étaient alors connus). L'absence d'intron sur d'autres récepteurs adrénergiques ainsi que d'autres RCPG ont été depuis lors décris (bien que la rhodopsine n'en fasse pas partie) (Nathans et al. 1983).

La présence d'une identité de séquence entre le récepteur ß2 adrénergique et la rhodopsine ainsi que la présence prédictible pour ces deux récepteurs des sept domaines transmembranaires ont permis de conclure qu'ils étaient certainement les premiers membres d'une famille de gènes bien plus grande (Dixon et al. 1986).

Cela fut rapidement confirmé par la séquence rapportée quatre mois plus tard du récepteur ß1 adrénergique aviaire (Yarden et al. 1986).

L'année suivante Numa apporta la séquence du récepteur muscarinique (Fukuda et al. 1987) et Nakanishi clona le récepteur de la neurokinine 1 (Masu .1987).

Pendant les années qui suivirent huit récepteurs adrénergiques et un récepteur serotoninergique (5HT1A) furent clonés.

La purification de ces premiers RCPG correspond à une étape importante. Cela a en effet, permis le séquençage de quelques peptides issus de ces récepteurs ce qui a aidé à la réalisation d'amorces oligonucléotidiques pour le clonage du gène ou du ADNc codant pour ces récepteurs.

Leur clonage aida grandement à l'avancée des connaissances biologiques de nombreux récepteurs.

#### II. RCPG et maladies

Les mutations dans des gènes codant pour les RCPG et les protéines G peuvent entraîner une perte de la fonctionnalité ce qui peut bloquer une des nombreuses étapes du cycle normal liant un RCPG à une activité GTPase.

Une mutation perte de fonction bloque la signalisation en réponse à la fixation d'un agoniste. La mutation gain de fonction entraîne une activité constitutive avec une transmission de signal indépendamment de la liaison du ligand. Des protéines G défectives peuvent entraîner une néoplasie et des anormalités sensorielles et développementales.

#### 1. Mutations perte de fonction

Pour qu'il y ait une perte de fonction entraînant une non-transmission du signal, deux mutations sur les deux allèles du gène du RCPG doivent avoir lieu. Par conséquent la plupart de ces maladies sont autosomales récessives. Mais il existe de nombreuses exceptions. Ces mutations peuvent être des mutations non sens, mauvais sens ou une mutation dans le cadre de lecture entraînant la production d'un récepteur tronqué. Cela peut donc impliquer n'importe quelle région du récepteur.

Ainsi, les sujets ayant une mutation perte de fonction hétérozygote du récepteur à TSH sont généralement euthyroide et présentent une compensation liée à un taux de sérum en TSH élevé. Mais les mutations homozygotes entraînent un hypothyroïdisme congénital associé à une glande thyroïdienne hypoblastique ou absente. Une mutation perte de fonction des récepteurs à endotheline B, LH et PTH / PTHrP entraîne des anormalités développementales reflétant le rôle respectif de ces hormones dans le développement normal.

La Retinisis Pigmentosa (RP) est une maladie qui se caractérise par une dégénération rétinienne entraînant un aveuglement total ou partiel. Certaines mutations de la rhodopsine ont montré une délétion des 5 derniers acides aminés de la protéine. Cette mutation entraîne chez la souris une accumulation de la rhodopsine dans la membrane plasmique du corps cellulaire du photorécepteur alors qu'elle devrait se localiser dans la membrane des sacs des bâtonnets. De nombreuses mutations de la région C-terminal de la rhodopsine ont été identifiées chez les patients humains atteints de Retinisis Pigmentosa. Ce qui suggère qu'une mauvaise localisation de ce récepteur doit être la cause de cette maladie.

La maladie de Hirshsprung correspond à une obstruction intestinale congénitale. Une mutation perte de fonction des récepteurs endothéline B peut produire cette maladie, mais la transmission génétique de cette maladie est complexe.

Le diabète insipide néphrogénique lié au chromosome X (résistance à la vasopressine rénale) est dû à une mutation perte de fonction du récepteur à vasopressine V2 dont le gène est localisé sur le chromosome X. Les hommes héritant du gène muté développent la maladie ce qui n'est pas le cas de la plupart des femmes.

#### 2. Mutations gain de fonction

La plupart de ces maladies causées par ces mutations sont transmises d'une manière autosomale dominante. Ce sont pratiquement toujours des mutations non sens. Cette mutation a pour conséquence de rompre les tensions maintenant le récepteur dans sa conformation inactive. Ces mutations miment la liaison du ligand et renversent l'équilibre vers l'état actif du récepteur. Des mutations gain de fonction dans la lignée germinale sur les récepteurs LH et TSH miment un état d'excès hormonal et peuvent provoquer une puberté précoce chez l'homme ainsi qu'un hyperthyroïdisme.

L'identification de l'activité constitutive de RCPG, comme étant une cause potentielle de la formation des tumeurs, a stimulé la recherche sur les mutants RCPG humains. Les maladies dues à une activité constitutive des RCPG ont seulement été décrites dans un spectre restreint de cellules cibles, tel que le récepteur de la rhodopsine ou ceux des systèmes endocriniens. Il est probable qu'une activité constitutive dans la plupart des RCPG ait pour conséquence une létalité. Ainsi les souris exprimant un mutant constitutivement actif du récepteur adrénergique  $\alpha 1B$  développent une hypertrophie du coeur (Milano et al. 1994).

Le sarcome de Kaposi associé au virus de l'herpes (KSHV) est l'unique exemple d'une maladie causée par l'activité constitutive d'un RCPG. Le RCPG KSHV est l'homologue humain du récepteur à chemokine CXC de type2 (CXCR2) et a été incorporé dans le génome du virus de l'herpes humain (HHV8). L'activité constitutive de ce RCPG est associée au développement du sarcome de Kaposi et à l'effusion primaire de lymphome chez les patients atteints du SIDA.

#### 3. Le polymorphisme

Une étude récente a comparé la variabilité des séquences de 64 RCPG avec 309 gènes n'appartenant pas à des RCPG (Small et al. 2003). Cette étude s'est concentré sur l'analyse d'un polymorphisme lié à un seul nucléotide (SNPs : Single Nucleotide Polymorphism). Ce polymorphisme est la forme la plus commune de variation génétique et a révélé des différences intéressantes entre les RCPG et les non-RCPG.

Ainsi les SNPs localisés dans la région 5'-UTR et la région codante sont plus communes pour les RCPG que pour les autres gènes. Ce phénomène provient certainement du fait qu'environ 50% des RCPG ne possèdent pas d'introns. Ceci a été confirmé par

l'observation montrant une fréquence de SNP dans la région codante plus importante chez les RCPG ne contenant pas d'introns que chez les RCPG en possédant. De plus, les RCPG sans intron ont plus de SNP dans la région 5'UTR que les RCPG ayant des introns. Il a également été observé que les SNP non synonymes et, présents dans la région codante, sont plus importants chez les RCPG que chez les non RCPG. 64% des SNP non synonymes sont présents dans des régions importantes pour la fixation de la protéine G et dans des régions transmembranaires. Les régions transmembranaires contiennent les acides aminés nécessaires à la fixation du ligand et aux changements conformationnels induit par la fixation du ligand.

Les variations de séquence des gènes des RCPG peuvent avoir des conséquences importantes et causer des maladies Mendéliennes. Une mutation perte de fonction homozygote du récepteur à chemokine de type 5 confère une résistance à l'infection au HIV car ce récepteur agit comme un corécepteur pour l'entrée du virus dans les cellules. Puisque la plupart des polymorphismes ont été observés dans le génome humain de nombreux exemples de variation des gènes des RCPG ont été trouvés.

Le rôle de ces polymorphismes n'est pas encore déterminé. Il peut correspondre, par exemple, aux spécificités individuelles des réponses aux drogues (pharmacogénomique) ou aux sensibilités à certaines maladies. Ainsi, le polymorphisme des récepteurs adrénergiques peut conférer une susceptibilité à des défaillances cardiagues congestives.

Les mutations naturelles des RCPG nous permettent de mieux comprendre leurs fonctions. Ces mutations révèlent aussi les interactions critiques reliant la structure à la fonction.

Il existe de nombreux RCPG orphelins pour lesquels les agonistes endogènes restent inconnus. Les futures recherches concernant les maladies causées par des mutations pourront certainement apporter des informations importantes. Il serait intéressant de découvrir également d'autres polymorphismes pouvant jouer un rôle dans les maladies héréditaires. De nouvelles formes de traitements des maladies impliquent le développement d'agonistes inverses, et de « pepducins » pour inhiber les RCPG ayant une activité constitutive ainsi que la mise au point de nouvelles méthodes permettant de restaurer la fonction des récepteurs mal repliés ou tronqués.

Due à l'importance physiologique du rôle de cette famille certains des membres de cette famille sont devenus des cibles pharmaceutiques importantes. Il a été estimé que 50% des drogues modernes ciblent ces récepteurs (Klabunde. 2002) ce qui correspond à plus d'un quart du top 100 des médicaments vendus dans le monde (Flower. 1999) (tableau 1).

nom	Nom generique	companie	maladie	Recepteur cible	Million \$
Claritin	Ioratadine	Schering-Plough	allergie	H1 antagoniste	3011
Zyprexa	olanzamine	Eli Lilly	schizophrenie	Mélange D2/D1/5HT2	2350
Cozaar	Iosartan	Merck&Co	Hypertension	AT1 antagoniste	1715
Risperdal	Risperidone	Johnson&Johnson	Psychose	Mélange D2/5HT2A	1603
Leuplin/Lupron	Leuprolide	Takeda	Cancer	LH-RH agoniste	1394
Neurontin	Gabapentin	Pfizer	Douleurs neurogenique	GABA B agoniste	1334
Allegra/Telfast	Fexofenadine	Aventis	Allergie	H1 antagoniste	1070
Imigran/Imitex	Sumatriptan	GlaxoSmithKline	Migraine	5HT1 agoniste	1068
Serevent	Salmeterol	GlaxoSmithKline	Asthme	ß2 agoniste	942
Plavix	Clapidogrel	Bristol-Myers Squibb	Infarctus	P2Y12 antagoniste	903
Zantac	ranitidine	GlaxoSmithKline	Ulcer	H2 antagoniste	871
Singulair	Montelukast	Merck&Co	Asthme	LTD4 antagoniste	860
Pepcidine	Famotidine	Merck&Co	ulcer	H2 antagoniste	850
Cardura	Doxazosin	Pfizer	Hypertension	α1 antagoniste	795
Gaster	Famotidine	Valmanouchi	Ulcer	H2 antagoniste	763
Zofran	Ondansetron	GlaxoSmithKline	Antiémétique	5Ht3 antagoniste	744
Zoladex	Goserelin	AstraZeneca	Cancer	LH-RH agoniste	734
Diovan	Valsartan	Novartis	Hypertension	AT1 antagoniste	727
BuSpar	Buspirone	Bristol-Myers	Depression	5HT1 agoniste	709
Zyrtec/Reactine	Cetirizine	Pfizer	Allergie	H1 antagoniste	699
Duragesic	Fentanyl	Johnson&Johnson	Doulerus	Agoniste opioide	656
Atrovent	Ipratropium	Boehringer Ingelheim	Asthme	Anticholinergique	598
Seloken	metoprolol	AstraZeneca	hypertension	ß1 antagoniste	577

Tableau 1 : (Klabunde et al. 2002) Vente annuelle et mondiale de drogues agissant sur les RCPG et appartenant au top100 des meilleures ventes de médicaments prescrits en 2000.

#### III. Famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G

L'évolution des organismes multicellulaires s'est réalisée grâce à la capacité qu'ont leurs cellules à communiquer entrent elles et avec leurs environnements.

La croissance cellulaire, la migration, la différenciation et l'apoptose sont des exemples d'événements cellulaires qui sont régulés par des signaux que la cellule reçoit de son environnement soit par contact direct avec d'autres cellules (figure 6A) soit par stimulation par l'intermédiaire de facteurs de signalisation solubles.

La nature du signal extracellulaire peut-être très variée et comprend des molécules extracellulaires, telles que des protéines, des substances de faible poids moléculaire ou des signaux sensoriels tels que les signaux lumineux.

Pendant la communication intercellulaire, les signaux extracellulaires sont enregistrés par la cellule et convertis en réactions intracellulaires. La transmission du signal à l'intérieur de la cellule prend place par l'intermédiaire de réactions en chaînes ce qui implique le concours de nombreuses protéines signal.

La cellule utilise deux voies principales de transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Une de ces voies utilise des molécules de signalisation qui traversent les membranes cellulaires pour se fixer et activer un récepteur à l'intérieur de la cellule (figure 6B). L'autre voie de signalisation, majoritaire, capte le signal à la surface de la membrane cellulaire et le transduit dans la cellule par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (figure 6C).

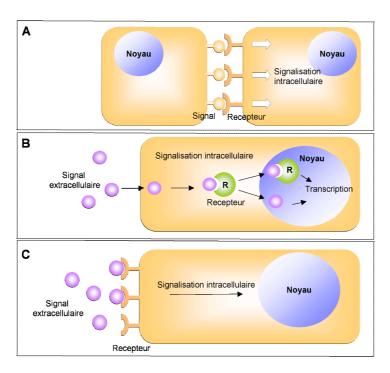


Figure 6 : Transmissions du signal par des récepteurs transmembranaires et nucléaires.

- A) Transmission d'un signal par contact direct avec d'autres cellules par l'intermédiaire de protéines de la surface cellulaire.
- B) La molécule de signalisation pénètre dans la cellule et lie le récepteur nucléaire soit dans le cytosol soit dans le noyau. Les récepteurs nucléaires agissent alors comme des facteurs de transcription en liant spécifiquement la région promotrice des gènes afin de réguler leurs transcriptions.
- C) Les récepteurs transmembranaires reçoivent le signal à la surface cellulaire et le convertissent en signal intracellulaire qui peut-être transmis jusqu'au noyau.

Il a récemment été reconnus que les récepteurs membranaires reconnaissant les messages sensoriels de l'environnement (lumière, odeurs, phéromones, molécules gustatives) et les messages intercellulaires (Comme les hormones, les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance et de développement) sont très similaires et dérivent de gènes ancestraux communs.

Ces récepteurs appartiennent à une famille protéique qui peut-être classé en fonction de leurs structures et de leurs fonctions. Cette famille de protéine peut-être classée dans au moins trois différents groupes : les canaux ioniques, les récepteurs à activité enzymatique (guanylate cyclase, tyrosine kinase, sérine/thréonine kinases), et les récepteurs couplés aux protéines liant la guanosine triphosphate (récepteurs couplés aux protéines G : RCPG). La famille la plus large étant celle des RCPG. (Bockaert. 2002) (figure 7)

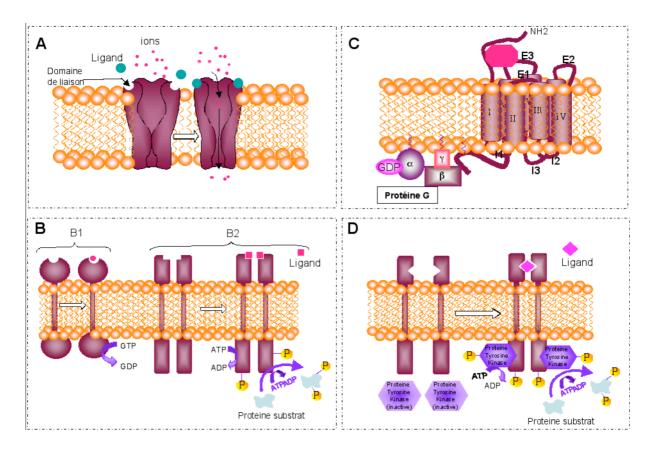


Figure 7 : Représentations schématiques de quatre types de récepteurs membranaires.

- A) Canaux ionique : La fixation du ligand sur le canal entraîne un changement conformationnel qui permet l'ouverture du canal et le passage des ions.
- B) B1 : Certains récepteurs activés sont des monomères qui ont une activité guanine cyclase et qui peuvent générer comme second messager un cGMP.
  - B2 : Le récepteur de nombreux facteurs de croissance a une activité tyrosine kinase intrinsèque. La liaison du ligand sur la plupart de ces récepteurs tyrosines kinase active un homodimère qui phosphoryle de nombreux résidus sur son propre domaine cytosolique ainsi que sur certaines protéines substrats.
- C) Récepteurs liés à des tyrosines kinases : La fixation du ligand permet le passage d'un homodimère à un hétèrodimère. Ceci permet la liaison et l'activation d'une protéine kinase cytosolique. La protéine kinase activée phosphoryle les tyrosines du récepteur ainsi les protéines substrats lient alors ces phosphotyrosines et sont à leurs tours phosphorylées.
- D) Récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs vont généralement une fois activés, lier et activer une protéine G. Cette protéine G va alors se lier et activer des enzymes qui catalysent la synthèse de seconds messagers.

#### 1. Les RCPG: Structure et fonction

Les RCPG sont certainement parmi les plus anciens transducteurs de signaux. En effet, ils sont présents dans les plantes (Plakidou-Dymock. 1998), les levures (Dohlman. 1991), les champignons (*Dictyostelium discordeum*), (Devreotes. 1994), ainsi que les protozoaires et les métazoaires diploblastiques (Vernier. 1995; New. 1998; Bockaert. 1999).

Ils interviennent dans tous les grands systèmes de communication intercellulaires et jouent un rôle prépondérant dans la perception sensorielle chimique : ce sont les récepteurs des odeurs, des molécules du goût, des phéromones. (Bockaert. 1998).

Le séquençage du génome humain a permis d'identifier la famille constituant les RCPG comme une des plus grandes classes de protéines du génome des mammifères (Venter. 2001; Takeda. 2002). Le nombre total de RCPG dans le génome humain a été estimé à environ 950 dont 500 sont des récepteurs d'odeurs ou de goût et 450 des récepteurs de ligands endogènes (Takeda. 2002). Plus de 1000 RCPG différents ont été identifiés depuis le clonage du premier récepteur, il y a plus d'un sciècle. Chez l'homme, on a constaté que plus d'1% du génome humain code pour plus de 1000 protéines ayant une structure à 7 domaines transmembranaires. Cette famille correspond à 1% des gènes de la Drosophile et plus de 5% de tous les gènes de *Caenorhabditis elegans* (dont le génome est maintenant entièrement connu). Chez cet organisme, c'est la famille de gène qui comprend le plus de membres (Bargmann. 1998).

Les RCPG constituent la famille qui a su le mieux s'adapter au cours de l'évolution. En effet, ces récepteurs sont non seulement très variés structurellement avec de grandes diversités dans leurs domaines de liaison aux ligands et aux messagers secondaires, mais ils sont également capables de reconnaître une grande variété de ligands. Cette diversité de structure et de fonction illustre parfaitement l'idée de François Jacob selon laquelle : « l'évolution est un bricolage moléculaire ».

Les RCPG vont induire une transduction de signal en réponse à une fixation de ligands. Ces ligands sont d'une diversité chimique exceptionnelle. Ils incluent les photons, les molécules odorantes et gustatives, les phéromones, les peptides (angiotensine, neurotensine, somatostatine,...), les nucléotides et les nucléosides (adénosine ou ATP), les acides aminés (acide glutamique,...), les protéines (thyrotropine (TSH), hormone folliculostimulante (FSH), ...) les neurotransmetteurs (glutamate,...), et les ions (Ca++) (Gether. 2000). Ces ligands ont différents modes de liaison (Ji. 1998).

L'activation du récepteur peut également être médiée par le clivage protéolytique du domaine extracellulaire du récepteur par des protéases comme la thrombine (figure 8). Pour ces récepteurs activés par des protéases, le peptide produit de manière protéolytique agit comme un ligand activateur.

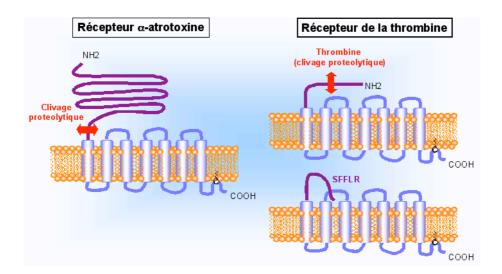


Figure 8 : (Bockaert et al. 1998) RCPG de structure ou fonctions particulières.

Le récepteur  $\alpha$ -atrotoxine (toxine de venin de l'araignée appelée « veuve noire ») appartient à la famille 2. Il est synthétisé comme protéine unique mais subi une coupure protéolytique dont la signification fonctionnelle est inconnue. Il est aussi appelé latrophiline.

L'agoniste du récepteur de la thrombine a pour séquence SFFLR. Il est intrinséque au récepteur luimême (partie proximale du domaine N-terminal) et démasqué, après coupure par la thrombine, du domaine distal

L'activation peut aussi être médiée par la réception d'un stimuli physique, ainsi dans le cas de la rhodopsine le signal lumineux sera enregistré par le RCPG avant d'être converti en un signal intracellulaire.

On dénombre actuellement environ 210 récepteurs pour lesquels le ligand naturel est connu, il reste cependant environ 160 « récepteurs orphelins » qui ont été identifiés dans le génome humain mais pour lesquels le ligand et la fonction (patho)physiologique restent encore inconnus. Ceci résume l'important potentiel de découverte des drogues qu'offre les RCPG. Ces cibles représentant 30% du portefeuille de nombreuses compagnies pharmaceutiques. (Klabunde. 2002)

#### 1.1. La structure des RCPG

#### a. Le modèle de la Bactériorhodopsine

Une structure à haute résolution de la bactériorhodopsine à été disponible pendant de nombreuses années (figure 9) (Henderson et al. 1990). La bactériorhodopsine a longtemps été considérée comme l'homologue bactérien (*Halobacterium halobium*) de la rhodopsine des vertébrés (Pompe à proton, à 7 domaines transmembranaires, sensible à la lumière et qui ne se couple pas aux protéines G). La structure de la bactériorhodopsine a par conséquent été utilisée comme un modèle de structure tertiaire des RCPG (Trumpp-Kallmeyer et al. 1992; Roper et al. 1994). Cependant, les informations structurales qui sont récemment devenues disponibles pour la rhodopsine, qui est couplée à la protéine G transducine, indiquent de claires différences entre la bactériorhodopsine et la rhodopsine.

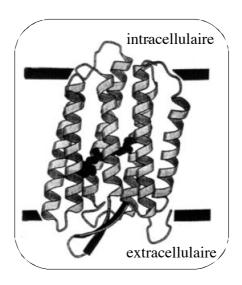


Figure 9 : Structure de la bacteriorhodopsine d'Halobacterium halobium. La bacteriodhopsine traverse la membrane en formant 7 hélices-alfa qui forment un corps central avec un chromophore rétinien lié à l'intérieur. (Kimura et al. 1997)

#### b. Le modèle de la Rhodopsine et les RCPG

Les RCPG possèdent un domaine central ou « corps central » commun constitué de 7 hélices alfas transmembranaires et hydrophobes (composés de 25 à 35 résidus) (Baldwin. 1993) (figure 10). Ces domaines transmembranaires sont connectés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires de taille variables. La région N terminal est localisée au niveau extracellulaire tandis que la région C terminal est située dans la région intracellulaire. La plus forte identité de séquence des RCPG est présente dans les éléments transmembranaires, tandis que les boucles hydrophiles présentent la plus forte divergence entre les récepteurs.

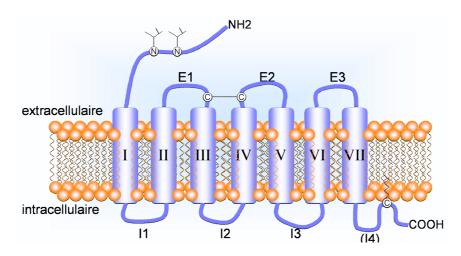


Figure 10 : Représentation schématique en deux dimensions des récepteurs couplés aux protéines G. (d'après Spiegel. 1996)

L'extrémité amino-terminal (NH2) est extracellulaire et est représentée avec deux sites de N-glycosylation. Les sept hélices alfa transmembranaires (I à VII) sont reliées par 3 boucles extracellulaires (E1 à E3) et 3 boucles intracellulaires (I1 à I3). Un pont disulfure relie la boucle E1 à la boucle E2. L'extrémité carboxy-terminal (COOH) est intracellulaire. Cette dernière peut présenter un ancrage lipidique (palmitoylation d'une cystéine) dans la membrane ce qui crée une 4éme boucle intracellulaire, I4.

C'est en 2000 que Palczewski apporta la première structure à haute résolution d'un RCPG : la rhodopsine (2.3 A) (figure 11) (Palczewski et al. 2000; Teller et al. 2001; Okada et al. 2002).

La structure de la rhodopsine bovine est l'unique structure cristalline d'un RCPG contenant les sept domaines transmembranaires. Cette structure a été très utile pour la prédiction de l'arrangement ainsi que de l'orientation des sept hélices transmembranaires des RCPG. La morphologie de ce récepteur a ainsi permis de confirmer l'arrangement des sept hélices formant une poche centrale (ou « corps central »).

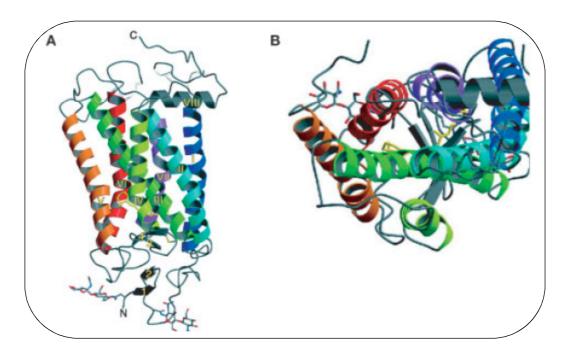


Figure 11 : Deux vues de la rhodopsine.

- A) Les sept hélices alfa de la rhodopsine traversent la bicouche lipidique de l'environnement extracellulaire (bas) à la région cytoplasmique (haut). Le chromophore rétinien (jaune) est niché dans les hélices transmembranaires.
- B) Vue d'un plan membranaire, du coté cytoplasmique de la membrane.

#### c. Glycosylation et modification post-traductionnelles

Les RCPG ont des sites de glycosylation localisés dans les domaines extracellulaires. Ces sites contiennent la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr permettant une N-glycosylation. Les RCPG présentent des glycosylations hétérogènes ce qui contribue à la migration anormale de ces protéines sur les gels de polyacrylamide. Une inhibition de cette glycosylation en désactivant les enzymes ou en réalisant une mutation dirigée montre une diminution du taux d'expression du récepteur \( \mathbb{S} \) 2 Adrénergique et de la rhodopsine à la surface cellulaire (Rands. 1990; Liu. 1993). Tandis que pour d'autres récepteurs l'incorporation d'un site de glycosylation additionnel augmente l'expression de ce récepteur à la surface cellulaire (Davidson. 1996).

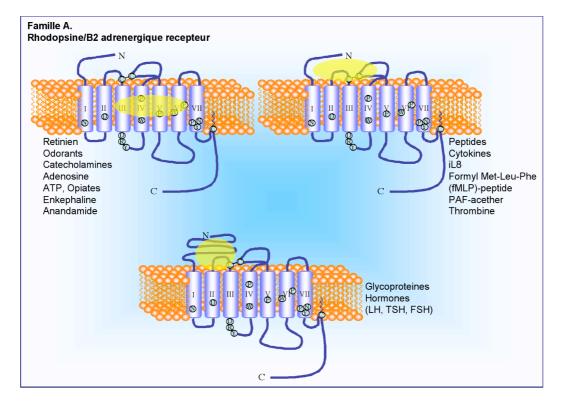
Les boucles extracellulaires contiennent souvent des résidus Cys conservés entre la première et la seconde boucle extracellulaire (Figure 10). Ces résidus stabilisent la conformation des domaines extracellulaires en formant des ponts disulfures. Une mutation dirigée de ces résidus de cystéine a montré une déstabilisation de la structure tertiaire, de la rhodopsine et du récepteur \( \mathbb{S} \) adrénergique, en altérant les caractéristiques de liaison du récepteur. Cela suggère un rôle de ces résidus dans le maintien de la conformation active du récepteur (Dohlman. 1990; Dixon. 1987).

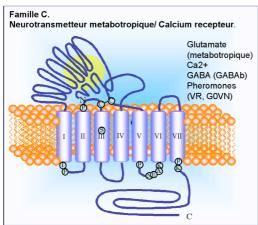
Une modification post-traductionnelle comme la palmitoylation du domaine cytosolique a été décrite pour les récepteurs  $\alpha$ , &2 adrenergique (O'Dowd. 1989 ;Kennedy. 1993) et la rhodopsine (Papac. 1992). Cette palmitoylation a lieu sur des résidus Cys localisés en C-terminal, dans le domaine intracellulaire. Cette modification pourrait servir à fixer ce domaine C-terminal dans la membrane. Il a été montré, pour le récepteur &2 adrenergique, que la substitution de cette Cys par une Gly entraîne une perte de la capacité de ce récepteur à activer les protéines G. A l'opposé pour d'autres récepteurs tels que la rhodopsine, l' $\alpha$ 2A adrénergique, le muscarinique, et le récepteur LH/CG, l'abolition de la palmitoylation n'a pas d'effet sur les protéines G et l'activation des effecteurs. (Van Koppen. 1991; Kennedy. 1993; Zhu. 1995). La conservation de ces résidus cystéine susceptible d'être palimitoylé dans la sous-famille des RCPG suggère fortement que cette modification post-traductionnelle joue un rôle important pour la fonctionnalité de ces récepteurs (O'Dowd. 1989).

#### 2. La famille des RCPG

La comparaison des séquences de différents RCPG révéla l'existence de différentes familles de récepteurs ne présentant pas les mêmes similarités de séquences (Gether. 2000). Une homologie de séquence significative a été trouvée entre trois sous-familles appelées A, B, et C (figure 12). La famille A comprend la rhodopsine, le récepteur à ß2 adrénergique, des récepteurs d'odeurs, des récepteurs de peptides et des RCPG pour des hormones glycoprotéines. La famille B inclus les récepteurs ayant des ligands correspondant à des hormones de haut poids moléculaire comme le glucagon, la sécrétine, le peptide vasoactif intestinale (VIP), la calcitonine. La famille C n'a inclus pendant longtemps que les récepteurs à Ca+ et glutamate (Pin et Bockaert. 1995). En 1998, de nouveaux membres de cette famille sont apparus comme les récepteurs GABA (Kaupmann et al. 1997) et un groupe de récepteur vomeronasal ainsi que des récepteurs de goût.

En plus de ces trois familles trois autres familles peuvent être décrites, mais elles ne contiennent que très peu de membres : la famille D comprend les récepteurs à phéromone. La famille E inclus les récepteurs « frizzled » et « smothened » impliqués dans le développement embryonnaire. Finalement la famille F est celle des récepteurs à AMPc qui n'ont été trouvées que dans *Dictyostelium discoideum*.





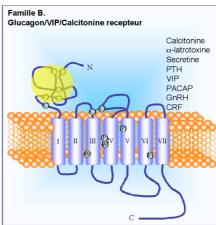


Figure 12: Classification des RCPG.

Les RCPG se subdivisent en trois sous-famille (Gether et al. 2001). La localisation des ligands est présentée en jaune.

La famille A se caractérise par une série de résidus fortement conservés. Dans la plupart des récepteurs de la famille A un pont disulfure relie la boucle E2 à la boucle E3. De plus, la majorité de ces récepteurs ont une cystéine palmitoylé, dans la région C-terminal, du côté cytoplasmique. Les ligands comprennent les amines biogenique (adrenaline, serotonine, dopamine, histamine), neuropetide Y, adénosine, chemokines et melatonine, ...

Les récepteurs de la famille B sont caractérisés par un long domaine N- terminal extracellulaire contenant une série de résidus cysteines formant certainement un réseau de pont disulfure. Les membres représentatifs des récepteurs de la famille B comprennent le récepteur à calcitonine, le récepteurs à glucagon, et le récepteur au peptide vasiactif intestinal (VIP).

Les récepteurs de la famille C sont caractérisés par un très long domaine N-terminal extracellulaire contenant un site de fixation au ligand. Il n'y a qu'un putatif pont disulfure et la troisième boucle cytoplasmique est très petite.

Les récepteurs de goût, les récepteurs métabotropiques du glutamate, récepteurs GABA, récepteurs Ca+ appartiennent à cette classe.

Pour les RCPG, les domaines de liaison des ligands sont pratiquement aussi variés que les structures chimiques des différents ligands connus (Ji et al. 1998). Ils varient en fonction des familles de récepteur ainsi qu'au sein d'une même famille.

Le site de liaison du ligand sur le récepteur a très bien été défini pour les récepteurs de petits ligands (adrénaline, noradrénaline, dopamine, sérotonine, histamine). La mutagenèse ciblée ainsi que les études biochimiques, biophysiques, et pharmacologiques ont montré que ces ligands se lient dans une crevasse formée par les hélices transmembranaires.

La rhodopsine est un cas unique, puisque le ligand est covalement attaché au résidu lysine de l'hélice transmembranaire VII. Dans ce cas, le site de liaison est profondément enfoncé à l'Intérieur des segments transmembranaires.

Pour les récepteurs, qui ont des ligands peptidiques ou protéiques, une portion structurale du domaine N-terminal ainsi que quelques boucles hydrophiles extracellulaires joignant les domaines transmembranaires sont impliquées dans la liaison du ligand (Wess. 1997).

Les récepteurs de la famille C qui possèdent un grand domaine N-terminal lient leurs ligands dans cette région (ex : Glutamate, l'acide butyrique gamma-amino).

#### 3 .Transduction du signal

La liaison d'un ligand ou la réception d'un signal physique est liée à l'activation des RCPG (figure 13). La transmission du signal du récepteur à l'intérieur de la cellule se fait par un changement allostérique conformationnel à l'intérieur du corps de 7 hélices transmembranaires (Meng and Bourne. 2001; Okada et al. 2001). Ce changement dans la structure du corps transmembranaire est transmis au niveau de la boucle cytoplasmique du récepteur ce qui va activer le second membre de la chaîne de signalisation (Bockaert et Pin. 1999). Pour la plus grande majorité de ces récepteurs, la protéine signal associée est la protéine G hétérotrimérique. Ce qui est à l'origine du nom de ces récepteurs.

Chapitre1: les Récepteurs couplés aux Protéines G

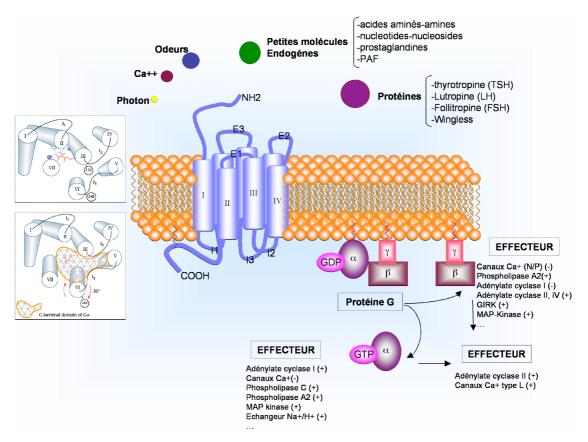


Figure 13 : Le modèle à trois partenaires.

Ce modéle comprend :

- 1- Les RCPG constitués de sept domaines transmembranaires (I à VII), trois boucles extacellulaires (E1 à E3) et trois boucles intracellulaires (I1 à I3). Leurs ligands sont extrêmement variés.
- 2- Les protéines G composées de trois sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta\gamma$  associées à la membrane par des lipides.
- 3- Les effecteurs, enzymes, canaux.

A gauche vue de dessus et de trois quarts d'un récepteur.

#### 3.1. Protéine G

On a considéré pendant longtemps que la transduction du signal par les RCPG comprenait trois partenaires, les RCPG, les protéines G et les effecteurs.

C'est en 1970 que l'équipe de Rodbell découvrit le rôle du GTP et des protéines liant les GTP (protéines G) dans la communication cellulaire. Mais c'est en 1987, dans le laboratoire de Gilamn, que la protéine G hétérotrimérique constituée d'un complexe de trois sous unités (alfa, béta, gamma) a été purifiée (Gilman A. 1987) (figure 14).

Le mécanisme par lequel le récepteur activé interagit avec la protéine G n'est pas clairement défini. En effet, l'alignement des séquences des RCPG se liant aux mêmes protéines G ne révèle pas la présence de séquences consensus. L'interaction est plutôt multipoints, avec peut-être une possibilité d'adaptabilité des interactions au moment des contacts que l'on peut appeler « induced fit ». En plus de la « plasticité » des domaines d'interaction des RCPG avec les protéines G ces domaines peuvent subir des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

La protéine G hétérotrimérique qui existe sous sa forme inactive liée au GDP va se lier par l'intermédiaire de sa sous unité  $\alpha$  et peut-être  $\gamma$  au récepteur activé et s'active ainsi elle-même (figure 15). Le changement conformationnel de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G entraı̂ne le relarguage du GDP suivit de la liaison du GTP. Puis, le GTP lié à la protéine G se dissocie du récepteur et de la forme stable  $\beta\gamma$  (Marinissen. 2001) (L'échange du GDP en GTP a lieu et la sous-unité  $\beta\gamma$  se dissocie de la protéine G. Lorsque la protéine G a été activée, elle se libère du récepteur.) Le dimère  $\beta\gamma$  ainsi que le GTP lié à la sous-unité  $\alpha$  vont activer leurs effecteurs qui peuvent être identiques ou différents. Ils vont ainsi moduler de nombreuses voies de signalisation cellulaire telles que la stimulation ou l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase, l'activation de la phospholipase et l'activité des canaux potassium et calcium (Hamm 1998).

L'hydrolyse du GTP arrête l'interaction de la sous-unité  $\alpha$  avec ses effecteurs. Ceci permet la réassociation de la sous-unité  $\alpha$  avec le dimère  $\beta\gamma$ . En 1995, De Vries et al, mettait en évidence un quatrième partenaire (par la méthode du double hybride) nommée GAIP (G  $\alpha$  interacting protein) (De Vries et al. 1995). GAIP est un des membres de la famille des protéines RGS (Regulator of G protein signaling) qui est composé de plus de 25 membres chez les mammifères. (Xu et al. 1999). Les protéines RGS accélèrent de 100 à 1000 fois l'hydrolyse du GTP des sous-unités G  $\alpha$ . Le récepteur retourne soit à son état inactif soit à l'activation d'autres protéines G.

On a dénombré 17 gènes codant des sous-unités G  $\alpha$  différentes, cinq pour des sous unités G  $\beta$  et 12 pour des sous unités G  $\gamma$  (Neer. 1995). Toutes les combinaisons ne sont pas possibles. Cependant la diversité permet la formation de nombreuses combinaisons ce qui augmente la variété du signal. On a observé que les RCPG avaient plus d'affinité pour certains hétérodimères bien qu'ils soient capables d'activer plusieurs protéines G différentes. En tenant compte de la variété de récepteur et de protéines G existant le nombre d'effecteurs associés (enzymes et canaux ioniques) est plutôt limité. De plus, des protéines G (cf. Gi1, 2, 3) de la même famille peuvent activer un même effecteur (Adénylate cyclase).

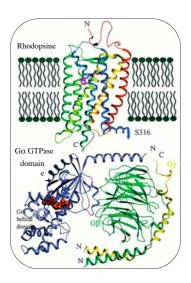


Figure 14 : Modèle de l'assemblage de la rhodopsine avec la transducine à la membrane cellulaire (Hamm. 2001).

L'orientation de la transducine (Gt  $\alpha$ ,Gt  $\beta\gamma$ ) en fonction de la rhodopsine et de la membrane est basée sur la charge et l'hydrophobicité de la surface, le site de liaison de la rhodopsine sur la transducine et le site de lipidation de la protéine G

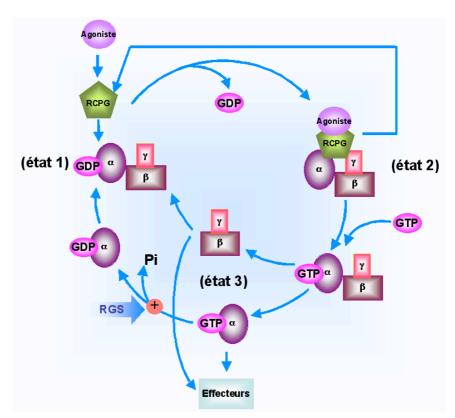


Figure 15 : Cycle d'activation des protéines G heterotrimériques.

La protéine G héterotrimérique est inactive dans l'état 1 (la sous unité alfa est lié au GDP). Le récepteur activé stimule la libération du GDP. Durant l'état 2 la sous-unité alfa n'est liée à aucun nucléotide. Cet état 2 est extrêmement transitoire. Le GTP s'associe rapidement au site nucléotidique. Il se produit alors une dissociation entre les partenaires : le récepteur, la sous-unité alfa, lié au GTP, et le complexe bêta gamma. La sous-unité alfa lié au GTP et le complexe bêta gamma vont activer des effecteurs identiques ou différents pour en modifier l'activité. L'hydrolyse du GTP met fin à l'association alfa - GTP - effecteur. La sous unité alfa-GTP s'associe alors au complexe bêta -gamma pour mettre fin à l'association de ce dernier avec son effecteur. Les protéines RGS (Regulator of G protein signaling) accélèrent la vitesse d'hydrolyse du GTP (Bockaert et Pin. 1998).

Plusieurs effecteurs intracellulaires peuvent être modulés directement ou indirectement par l'activation des différentes sous unités  $G\alpha$  et G  $\beta\gamma$ . Les effecteurs contrôlés par les sous-unités  $G\alpha$  peuvent être des enzymes (phospholipase A2 et C, adénylate et guanylate cyclase, c-Jun kinase, tyrosine phosphatase (SH-PTP2), ...), dont l'activation va influer sur le taux de second messager produit ou libérés (Phosphoinositides et diacylglycerols, Ca++, cAMP, cGMP, ...), des canaux (potassiques, calciques, sodiques ou chlores), des échangeurs ioniques (sodium/proton), des kinases (tyrosine kinase Btk (Burton's tyrosine kinase) ou des MAP kinases (Mitogen-Activated protein kinase) (Bockaert et Pin. 1998).

G  $\beta\gamma$  peuvent également moduler l'activité de nombreux effecteurs tels que les canaux (sodique, calcique dépendant du voltage (N etP/Q) ou potassique à rectification entrante (GIRK : G protein inward rectifyer K+ channel), ...), les enzymes (phospholipases A2 et C, adenylate-cyclase I, II, IV, tyrosine phosphatase (SH-PTP1)), ainsi que des kinases (Phosphoinositide 3 kinase, B-adrenergique receptor kinase, c-Jun kinase, MAP kinase, tyrosines kinases Btk et Tsk (T-cell-specific kinase)).

Cependant derrière le dogme « RCPG - Protéine G », les recherches conduites ces dernières années suggérèrent que l'activation de RCPG puisse entraîner des réponses biologiques qui ne sont pas médiées par les protéines G. (Marinissen et al. 2001; Daaka et al. 1998; Lefkowitz. 1998).

### 3.2. Autres voies de transduction du signal

Des routes alternatives aux protéines G ont par la suite été découvertes. L'une d'entre elles utilise la cascade MAPK entraînant l'activation des facteurs de transcription. Une autre voie lie la signalisation par les récepteurs de facteurs de croissance à la signalisation par les RCPG. La stimulation de RCPG par des ligands extracellulaires tels que l'acide lysophosphatidique entraîne une transactivation du récepteur de facteur de croissance épidermale EFGR (Gschwind et al. 2001).

Les bases du mécanisme permettant une communication croisée entre ces deux différentes voies de signalisation n'est pas très bien décrite et implique un clivage protéolytique du ligand extracellulaire par une metalloprotease.

### 4. Mécanisme d'inactivation des RCPG : la désensibilisation

Une stimulation continue ou prolongée de la cellule entraîne généralement une atténuation de la réponse pour permettre une future stimulation par le même agoniste. Ce phénomène est un des plus importants mécanismes de protection de la cellule contre une stimulation excessive. Un défaut de ce mécanisme entraîne une signalisation non contrôlée et à des effets toxiques liés à une stimulation excessive. Ce mécanisme d'inactivation des RCPG est appelé désensibilisation (Bohm et al. 1997). Un élément important de la désensibilisation (qui a lieu de quelques secondes à quelques minutes après l'activation du récepteur par un agoniste) concerne la séparation du récepteur activé et de la protéine G, ce qui arrête la transmission du signal. Cet arrêt du signal résulte de la mise en place de mécanismes opérant au niveau des différents acteurs de la cascade signalétique.

Ce mécanisme a d'abord été présenté comme un procédé servant à retirer (« désensibiliser ») les récepteurs de la surface cellulaire, au profit de leurs accumulations dans des compartiments intracellulaires vésiculaires de faible densité (Harden et al. 1983). Son lien fonctionnel lié à la perte progressive du signal cellulaire, induit par un récepteur lors d'un signal répété, a permis des études plus spécifiques (Mukherjee. 1976). Cependant, il est désormais reconnu que ce mécanisme induit de nombreux autres effets. Ceci comprend la régulation du niveau d'expression protéique à la surface cellulaire pour moduler la réponse cellulaire au ligand (Krupnick et Benovic. 1998), la localisation d'endosomes contenant des récepteurs pour les complexes de signalisation intracellulaire (Luttrell et Lefkowitz. 2002), la dégradation (ou « down regulation) des RCPG pour agir sur une désensibilisation à long terme (Tsao et al. 2001) et un traitement des récepteurs pour les recycler à la surface cellulaire et initier une signalisation continue (Ferguson. 2001) (figure16).

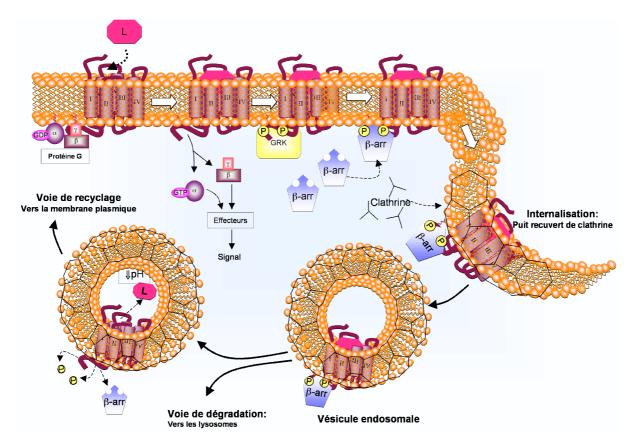


Figure 16 : Désensibilisation et séquestration des RCPG.

Le découplage de la protéine G est suivi d'une phosphorylation par la GRK. La ß arrestine puis la clathrine se fixent. Des vésicules recouvertes de clathrine se forment et sont internalisées. L'endocytose aboutit à une voie de recyclage ou d'internalisation. GRK, kinase des RCPG ; ß-arr, ß arrestine.

### 5. L'Oligomérisation

Le modèle traditionnel de fixation de ligand et de transduction du signal par les RCPG est basé sur l'hypothèse qu'un récepteur monomérique participe à cet événement. Malgré le fait que dans de nombreuses classes de récepteurs (tels que les récepteurs tyrosine kinase, de nombreux récepteurs de facteurs de croissance et de cytokine ex : EGF-R, PDGF-R, interferon γ, ... ) une oligomérisation constitutive ou induite par un ligand est essentielle à la signalisation (Heldin et al. 1995), ce n'est que le modèle monomérique du RCPG qui a été universellement admis (stœchiométrie récepteur, protéine G, effecteur 1 :1 :1). Un nombre significatif de travaux ont, cependant, suggéré une dimérisation des récepteurs (Conn et al. 1982) mais ces résultats restèrent très controversés. La dimérisation des RCPG n'a été identifiée et acceptée, que récemment, comme étant une entité physiologique et non un artefact biochimique.

Depuis la moitié des années 1990 de nombreux rapports ont successivement montré une oligomérisation de tous les RCPG analysés. Il est dorénavant admis que l'oligomérisation est un aspect universel de la biologie des RCPG. Le rôle de la dimérisation

des RCPG et leurs interactions avec des protéines accessoires a très bien été documenté comme participant à l'activité des récepteurs (Brady et Limbird. 2002; Hébert et al. 1998; Bouvier et al. 2001; George et al. 2002; Milligan et al. 2003; Park et al. 2004). De nombreuses études ont ainsi fourni des données soutenant le rôle de la dimérisation dans le transport du réticulum endoplasmique, dans la liaison du ligand et la transduction du signal.

Des évidences biochimiques et biophysiques de l'existence d'homo et d'hétérodimère de RCPG ont progressivement été apportées. Une caractéristique intéressante de la plupart de ces dimères vient de leurs résistances relatives à la dénaturation par le sodium dodecyl sulfate (SDS). En effet, leur migration sur SDS-PAGE met en évidence des espèces moléculaires étant entre deux fois et plus, plus élevées que la masse moléculaire d'un récepteur monomérique. Ce phénomène n'est pas unique aux RCPG. Mais, il est commun à de nombreuses protéines ayant des interactions intramoléculaires hydrophobes (Furthmayr et al. 1976).

En 2003 une étude réalisée par Palczewski et al. (Fotiadis et al. 2003) et utilisant un microscope à force atomique a montré pour la première fois que la rhodopsine existait sous forme de dimère dans la rétine native, révélant l'organisation oligomérique d'un RCPG *in vivo* (figure 17).

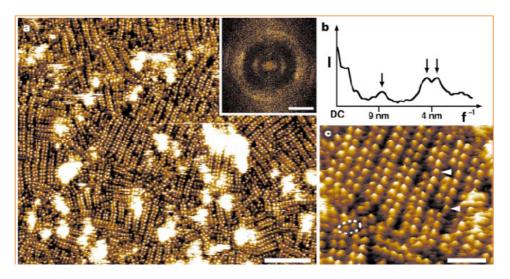
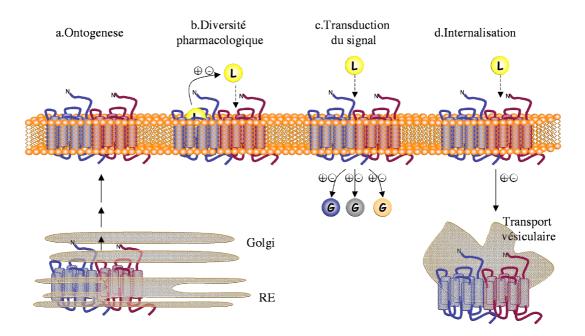


Figure 17 : Organisation et topographie de la rhodopsine à la surface cellulaire.

- a. Topographie obtenue par un microscope à force atomique.
- Arrangement paracristallin de dimères de rhodopsines dans des disques membranaires natifs. Encart, reflétant l'arrangement régulier de la rhodopsine dans la membrane.
- b. Moyenne angulaire du pouvoir de diffraction.
- c. Magnification d'une région du topographe. a., montrant les rangés de rhodopsine dimérisée ainsi que des dimères individuel (ellipse en pointillé), certainement défait d'une des rangée, et des monomères occasionnels de rhodopsine (flèches).

En effet, il a été montré que les récepteurs peuvent dimériser et que la fonction des mutants peut-être certainement restaurée par dimérisation. Mais les résultats actuellement obtenus ne prouvent pas que la dimérisation mediée par les agonistes soit nécessaire à l'activation des récepteurs. De plus, de nombreuses questions restent encore en suspens. La principale consiste à savoir si la dimérisation des RCPG est un processus général impliqué dans le procédé d'activation normale des RCPG. Le rôle de l'oligomérisation dans l'internalisation des récepteurs a également besoin d'être éclairci. Des données sont donc encore nécessaires pour déterminer clairement le rôle physiologique de la dimérisation des RCPG, sachant qu'une quantité limitée d'information est disponible au sujet de l'hétérodimérisation dans des tissus endogènes.

Les exemples connus d'hétéromérisation montrent des changements pour l'affinité des ligands, le trafic cellulaire et la signalisation (figure 18). Bien que ce phénomène complexifie la compréhension de la biologie des RCPG, il apporte la possibilité d'une étonnante diversité pharmacologique liée à un important potentiel de régulation.



**Figure 18: Proposition de différents rôles de l'hétérodimérisation** (Nature Rev Drug Discovery 3 : 577-626, 2004)

- a. Ontogenese. L'hétéromerisation peut-être impliquée dans le repliement et le ciblage à la membrane des récepteurs nouvellement synthétisés.
- b. Diversité pharmacologique. La liaison du ligand peut être affecté par l'hétérodimérisation qui peut induire une co-opérativité positive ou négative de liaison.
- c. Transduction du signal. L'hétérodimérisation peut influencer les propriétés de signalisation d'un ligand en influent sur l'interaction entre les RCPG et la protéine G.
- d. Internalisation. L'endocytose d'un récepteur peut être modifié par l'hétérodimérisation.

RE.réticulum endoplasmique, G. protéine G., L, ligand

# 7. RCPG orphelins

Les RCPG étaient tous à l'origine des récepteurs orphelins. La découverte de leurs ligands respectifs a permis de les « désorphelaniser ».

Le séquençage du génome humain a permis d'identifier approximativement 720 gènes appartenant à la famille des RCPG (Venter et al. 2001). La moitié de ces gènes codent pour des récepteurs sensoriels parmi les 360 récepteurs restant une identification du ligand endogène a été faite pour 210 d'entre eux. Il reste 150 récepteurs que l'on qualifie de récepteurs orphelins (Wise et al. 2004). Parmi ces récepteurs 110 ont été classés dans la famille 1, environ 40 dans la famille 2 et environ 5 dans la famille 3. La découverte du ligand naturel des récepteurs est une étape clé dans la compréhension du rôle biologique des récepteurs ainsi que son rôle possible dans des mécanismes de maladie. La technique utilisée depuis 1988 consiste en un criblage homologue des récepteurs clonés. Cette méthode est plus ou moins responsable de la plupart des caractérisations pharmacologiques des RCPG. Dans de nombreux cas, une homologie de séquence suffisamment élevée a permis la prédiction des ligands endogènes. Ce fut le cas pour les récepteurs GALR2 et R3 par exemple (Kolakowski et al. 1998) et le récepteur à thyrotropin-releasing hormone 2 (O'Dowd et al. 2000). On a également pu découvrir de nouveaux sous-types de récepteurs tel le récepteur à histamine H3 (Oda. et al. 2000).

D'autres études ont permis d'identifier des récepteurs appartenant à des ligands déjà connus, mais dont le récepteur associé était resté inconnu. Les exemples incluent l'identification du récepteur GABA-b (White et al. 1998), le récepteur de la calcitonine (McLatchie et al. 1998) et le récepteur à acide nicotinique (Wise et al. 2003; Tunaru et al. 2003).

Cependant les études les plus intéressantes concernent l'identification de nouveaux ligands de RCPG et des RCPG associés. Un intérêt particulier apporté par les récepteurs orphelins vient du fait qu'ils peuvent être activés par des ligands inconnus. Ils représentent ainsi un nouveau terrain de développement et de recherche thérapeutique. L'utilisation de techniques inventives appelées « pharmacologie inverse » ont permis de trouver de nombreux ligands endogènes pour des RCPG orphelins. La plupart de ces techniques consistent à cribler différents extraits d'organe purifiés ou de vastes collections de peptides signal ou de composés chimiques sur un RCPG orphelin. Le résultat de la « reverse pharmacology » a été très bon et a servi à la découverte de nouveaux ligands endogènes. La découverte de transmetteurs inattendus (UDP-glucose, BAM22, adénine, succinate,  $\alpha$ -ketoglutarate) a soutenu l'approche pharmacologique inverse qui consiste en un criblage aléatoire des composés. Des exemples de ces études concernent les récepteurs de trace d'amine (Borowsky et al. 2001), l'identification du récepteur prokineticine (Masuda et al.

2002) et l'identification de deux récepteurs de neuromedine U (Howard et al. 2000). Dans cet exemple de nouveaux ligands ainsi que de nouveaux récepteurs ont été identifiés résultant en l'identification de nouvelles voies de signalisations liées au RCPG fournissant de nouvelles informations concernant la biologie cellulaire ainsi que les processus liés à des maladies. La caractérisation du rôle physiologique de ces récepteurs représente alors un rôle majeur.

Actuellement les RCPG orphelins sont « désorphelanisés » à la vitesse de 7 à 8 RCPG par an. Si cela se poursuit ainsi tous les RCPG seront « désorphelanisés » dans 20 ans (Civelli et al. 2005).

Un des challenges de la « désorphelanisation » est lié à l'identification des transmetteurs de ces récepteurs orphelins sachant que la séquence d'un grand nombre d'entre eux les positionnent entre des récepteurs peptidique, d'amines biogéniques et de lipides ajoutant ainsi un degré de complexité.

Il est possible que les RCPG orphelins restant soient atypiques et qu'ils ne transmettent pas leurs signalisations par l'intermédiaire de protéines G. Dans ce cas les tests actuellement utilisés ne sont pas adaptés pour ces récepteurs et de nouveaux tests doivent être mis au point.

La dimérisation des RCPG entraîne la possibilité que la combinaison de RCPG soit nécessaire à la découverte de transmetteur. Mais cela n'a pas été un problème pour la grande majorité des RCPG qui ont été exprimés individuellement.

D'autres récepteurs, tels que ceux des traces d'amine, n'atteignent pas la membrane plasmique lorsqu'ils sont exprimés dans un système hétérologue. Ainsi, parmi 5 récepteurs de traces amines (Borowsky et al. 2001) existant dans le génome humain, un seul a été correctement exprimé et peut être activé. Ces récepteurs doivent certainement avoir besoin de protéines accessoires pour atteindre la membrane comme cela est le cas pour les récepteurs RAMPS, le récepteur GABAb et les récepteurs « smoothened ».

Un autre challenge consiste en la découverte de transmetteurs présents dans des conditions basales à des concentrations indétectables par les technologies actuelles. Ce qui peut expliquer la découverte de transmetteurs inattendus.

Une autre possibilité serait qu'une partie de ces récepteurs orphelins n'aient pas de ligands associés. En effet, certains récepteurs ont été identifiés comme agissant comme des facteurs de trafic (Kaupmann et al. 1998) ou présentant une activité constitutive en l'absence de ligand (Smit et al. 2002). Ainsi la sous unité GABAb2 du récepteur GABAb est non seulement incapable de lier un agoniste GABAb (les agonistes lient la sous unité GABAb1) mais elle est également incapable de lier n'importe quel autre ligand naturel. (Kniazeff et al.

2002). Ainsi la sous unité GABAb2 est un exemple de RCPG qui ne pourrait pas être « deshorphelanisé ».

Une autre voie pourrait consister à inhiber la voie métabolique de synthèse d'un peptide afin de changer le taux d'effecteur.

Avant la recherche sur les RCPG orphelins 90 transmetteurs étaient connus, depuis, 12 nouveaux transmetteurs ont été découverts. On suppose que les 120 récepteurs orphelins restants vont permettre de découvrir au moins 50 nouveaux transmetteurs. Bien que l'assortiment des transmetteurs connus à leurs RCPG respectifs ait eu le plus de succès, la découverte de nouveaux transmetteurs issus d'extrait de tissus aura peut-être le plus d'impact. En effet, la compréhension de certains récepteurs a changé notre compréhension de la régulation de l'appétit (Xu et al. 2004). Un cas particulier correspondant à la découverte de la famille orexin/ hypocretine qui a révolutionné la thérapie narcolepsique et les autres domaines proches.

Un autre challenge consiste à savoir si un RCPG peut-être activé par un ou une famille de transmetteur. Cet ajout de complexité pourrait expliquer par exemple la complexité des réponses pour certaines fonctions du cerveau.

Le challenge des années à venir consiste à identifier la fonction biologique des RCPG orphelins restants.

# Chapitre 2 : Les objectifs et la structure du programme MepNet

# I. Les RCPG et la génomique structurale

Les industries pharmaceutiques investissent une grande part de leurs ressources dans le criblage de nouveaux médicaments dirigés contre les RCPG (Vanti et al. 2001). Cette stratégie passe traditionnellement par une stratégie de criblages moléculaires à haut débit, couplée à des approches de chimie combinatoire et s'avère souvent longue et coûteuse. Une alternative qui s'impose de plus en plus actuellement consiste à déterminer les structures tridimensionnelles des protéines à partir desquelles il serait possible d'élaborer des modèles moléculaires de composés potentiellement actifs (tels que les inhibiteurs de protéase HIV Viracept™ et Agenerase™ ou les inhibiteurs de neuraminidase tel que Relenza™ et Tamiflu™) (Kuhn et al. 2002).

Ce type d'approche a ainsi ravivé l'intérêt de la communauté scientifique pour les études structurales de protéines membranaires.

Cependant, parmi environ 32150 entrés sur le site de la PDB (http://www.rcsb.org/pdb/), seulement 176 appartiennent à des protéines membranaires ce qui correspond à la résolution de 95 différentes structures (incluant les protéines de même type appartenant à différentes espèces) de protéines membranaires (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\_Proteins\_xtal.html) contre environ 20 000 structures répertoriées pour les protéines cytosolubles. Parmi ces 95 structures de protéines membranaires, une seule appartient à la famille des RCPG, celle de la rhodopsine bovine (Palczewski et al. 2000).

Une analyse similaire à celle qui a été réalisée par Richard Dickerson en 1978, et qui avait prédit de façon assez précise le nombre de nouvelles structures de protéines solubles devant être résolu en 2000, a été réalisée par Sephen White sur les protéines membranaires (figure 19). Il prévoit plus de 100 nouvelles structures cumulatives de protéines membranaires au cours de l'année 2005 et plus de 2200 en 2025!

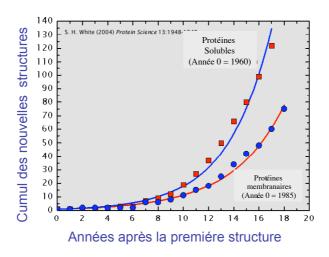


Figure 19 : Total cumulatif des nouvelles structures depuis la publication de la première structure cristallographique à haute résolution. (White. 2004)

Les nouvelles structures de protéines membranaires incluent la même protéine dans différents organismes mais exclues les structures des versions mutées des protéines déjà présentes dans la base de donnée.

Même si cette prédiction semble réaliste, cette croissance exponentielle du nombre de structures de protéines membranaires ne permettra pas de combler le retard pris sur les protéines solubles, sachant qu'un tiers des cadres de lecture des génomes codent pour des protéines membranaires intrinsèques.

Le peu de connaissances actuelles liées à la structure des RCPG peuvent s'expliquer par leurs inefficacités de transport et d'insertion dans la membrane plasmique, leur effet toxique sur les cellules hôtes, et leurs instabilités. Cela met en évidence les difficultés que l'on peut rencontrer pour l'obtention d'un rendement quantitativement et qualitativement suffisant pour des études structurales. De plus, les procédés de purification nécessitent l'utilisation de détergents qui peuvent avoir un effet négatif sur le rendement et la stabilité du récepteur. Le procédé de cristallisation est également plus compliqué dû aux faibles quantités de RCPG purifié, à la présence de détergent et à la flexibilité intrinsèque des récepteurs (Lundstrom K., 2005).

De nombreuses équipes de chercheurs d'institutions aussi bien publiques que privées ont ainsi développé depuis plusieurs années différentes approches ciblées sur un nombre limité de récepteurs et de système d'expression. Même si ces approches ont permis d'obtenir de sérieux et nombreux résultats, elles n'ont pas réussi à alimenter nos connaissances concernant la structure cristallographique des RCPG. (Tate et al. 2001).

### II. Les réseaux nationaux et internationaux

Afin de résoudre ce problème de nombreux réseaux nationaux et internationaux ayant des compétences en expression, biochimie, purification, et cristallisation se sont constitués (tableau 2). Les USA et le Japon se positionnent en tête des études de génomique structurale.

Au Japon un ambitieux programme de génomique structurale a été officiellement lancé en 1997 au centre des Sciences Genimiques RIKEN (www.rcsb.org). L'étude concerne le génome de la souris avec l'intention de sélectionner des RCPG pour des caractérisations structurales. Le centre de recherche d'information biologique (Biological information Research Center –AIST-www.jbirc.aist.go.jp) et le consortium de bioinformatique du Japon (Japan Biological Informatics Consortium-JBIC- www.jbic.or.jp) ont établi un projet commun basé sur la bactériorhodopsine et quelques cibles de RCPG de mammifères. Ainsi une cristallographie 2D et électronique ont été appliquées sur la bactériorhodopsine et le récepteur \( \mathbb{G} \)2 adrenergique ainsi que sa forme mutée. Ils ont été exprimés en grandes quantités à partir de vecteurs baculovirus dans des cellules d'insectes pour des études structurales.

Aux USA de nombreuses initiatives ont été parrainées par le NIH. Parmi lesquelles se trouve le centre de Génomique structurale (Joint Center for Structural Genomics-JCSG) en Californie qui travaille sur 180 RCPG exprimés dans *E. coli*, baculovirus et des vecteurs adenovirus. Un autre large réseau appelé la Collaboration du sud-est sur la Génomique Structurale (the South-East Collaboratory on Structural Genomics - SECSG) travail sur le génome de *Caenorabditis elegans* et comprend l'expression de RCPG dans des cellules d'insectes et de mammifères à partir de vecteurs bacculovirus et lentivirus.

En Europe, de nombreux réseaux nationaux étudiant les RCPG ont été crées. Le Centre national de compétence en recherche (National Center of competence in Research-NCCR) possède des collaborateurs constitués d'équipes de recherche présents dans les universités de Bâle et de Zurich ainsi qu'à l'institut Paul Sherrer (PSI) a Villigen. Ce réseau développe des technologies pour l'expression de protéines recombinantes, la détermination de structures macromoléculaires et la biologie computationnelle appliquée à la cristallographie aux rayons X, à la spectroscopie de masse, à la RMN et à la microscopie électronique. Ce consortium travaille sur de nombreux RCPG exprimés dans la bactérie et les cellules d'insectes.

Une plateforme de protéines membranaires a été établie dans SwiGene, un programme de technologie et de recherche Postgénomique localisé dans le sud-ouest de la suéde et ayant pour but l'étude structurale des protéines membranaires, parmi lesquels se trouve des

Chapitre 2 : les objectifs et la structure du programme MePNet

RCPG. Les systèmes d'expression utilisés concernent principalement *E. coli* et les cellules de levure.

Un projet financé par l'Europe et appelé E-MeP (European Membrane Protein) vient de débuter. Ce projet comprend 18 laboratoires présents dans six pays européens différents. Ce programme inclus des protéines membranaires eucaryotes et procaryotes. Des protéines de la famille des RCPG sont incluses parmi les cibles eucaryotes. L'expression de ces cibles sera évaluée dans de nombreux systèmes tels qu'*E.coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P.pastoris*, des cellules d'insectes infectés par baculovirus et des cellules de mammifères infectées par SFV.

RESEAU	CIBLES	RCPG	SYSTEME D'EXPRESSION	SITE WEB
E-MeP	100 PM procaryotes	100	E.coli , Lactococcus lactis , S. cerevisae , Pichia pastoris , Baculovirus, SFV, Traduction in vitro	www.e-mep.org
	200 PM eucaryotes			
Reseau Japonnais de PM	Génome de souris et de plantes	5 à 10	E.coli , baculovirus, traduction in vitro	www.rcsb.org
JCSG	Génome de souris	180	Bacuovirus, adenovirus	www.jcsg.org
MePNet	RCPG	100	E.coli,P.pastoris , SFV	www.mepnet.org
NCCR	transporteus ABC	5 à 10	E.coli , baculovirus	www.structuralbiology .ethz.ch
SECSG	Génome de <i>C.elegans</i>	RCPG de C.elegans	E.coli , baculovirus, lentivirus	www.sgce.cbse.uab.e du
SweGene	Centre de réacion bactériens et des PM eucaryotes	Quelques RCPG	E. coli	www.swegene.org

Tableau 2 : Réseaux de génomique structurale sur les RCPG (Lundstrom et al. 2005)

Abbréviation: E-MeP, European Membrane Protein Network; JCSG, Joint Center for Structural Genomics; MePNet, Membrane Portein Network; PM, Protéines membranaires; NCCR, National Center of Competence in Research (Suisse), SECSG, Southeast Collaboratory on Structural Genomics.

## III. Membrane Protein Network, MePNet : la structure du réseau

Le programme MePNet (Membrane Protein Network) a été initié en septembre 2001, en étant financé pour une période de trois ans par le secteur privé, pour l'étude de 100 RCPG.

Ce projet a été créé avec la conviction que seule une approche globale et structurée au sein d'un réseau d'excellence pourrait faire tomber les barrières technologiques rencontrées lors de l'expression, la purification et la cristallisation des protéines membranaires.

Un tel réseau a donc été constitué (figure 20), réunissant les connaissances et les compétences des différents domaines de la biologie structurale. Coordonné par la société Bio-Xtal, ce réseau de laboratoires académiques interagit en profonde synergie avec plusieurs des principaux acteurs de l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies. Les membres académiques, choisis pour leurs expertises reconnues dans les domaines des protéines membranaires et de la biologie structurale, fournissent les compétences et l'environnement scientifique privilégié permettant la réalisation du travail de recherche. Les partenaires industriels apportent un soutien à la fois scientifique et financier, manifestant de cette façon leur grand intérêt pour cette démarche unique et exemplaire.

Sur le plan pratique, les travaux de recherche se déroulent au sein des laboratoires suivants :

Coordination Scientifique : Dr. Kenneth Lundstrom, Bio-Xtal.

Laboratoire Bio-Xtal : Gif-sur-Yvette (France)

Laboratoires académiques :

- Laboratoire du Dr. Franc PATTUS, UPR9050 du CNRS (Illkirch, France)
- Laboratoire du Pr. Hartmut MICHEL, Max-Planck-Institut für Biophysik (Francfort, Allemagne)
- Laboratoire du Pr. Christian CAMBILLAU, UMR6098 CNRS / Université Aix-Marseille (Marseille, France)
- Laboratoire du Pr. Rainer RUDOLF, Halle Universitat (Halle, Allemagne)

Tous les résultats expérimentaux, positifs ou négatifs en termes de succès, alimentent une base de données qui représente une réelle interface entre les partenaires industriels et académiques. Cette base de données, développée pour les besoins du projet, est quotidiennement mise à jour par les laboratoires impliqués. Grâce à cet outil, il est possible d'effectuer à tout moment une analyse approfondie des résultats comme par

exemple l'étude des relations entre la séquence protéique d'un récepteur et son niveau d'expression, ses conditions de solubilisation ou sa cristallisation. Une évaluation statistique des protocoles et des outils testés devrait également permettre d'établir des protocoles généraux qui pourront être appliqués à l'étude structurale d'autres familles de protéines membranaires.

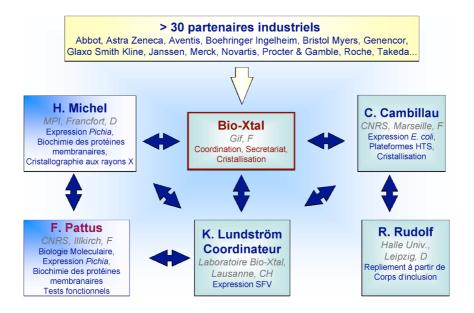


Figure 20 : Le réseau MePNet.

Présentation des différents laboratoires impliqués dans le projet et de leurs intéractions. Le projet coordonné par la société BioXtal est supporté et financé par un consortium composé d'une trentaine de partenaires industriels.

Tous les travaux effectués par les différents laboratoires sont supervisés par le Coordinateur Scientifique de MePNet. Des coordinateurs locaux, nommés dans chaque laboratoire, se réunissent régulièrement sous la direction du Coordinateur Scientifique et exposent l'avancement des travaux de leur laboratoire respectif. Par ailleurs, le Coordinateur Scientifique organise des réunions stratégiques bi-annuelles où tous les partenaires industriels et académiques confrontent leurs idées et permettent de faire progresser le projet dans les meilleures conditions.

Une des premières actions concertées réalisées au sein du réseau MePNet a consisté à tirer profit de l'expérience accumulée par ses différents membres pour élaborer une stratégie globale et structurée permettant d'accéder au mieux aux objectifs recherchés. Cette stratégie est illustrée par le diagramme ci-joint (figure 21).

Chapitre 2 : les objectifs et la structure du programme MePNet

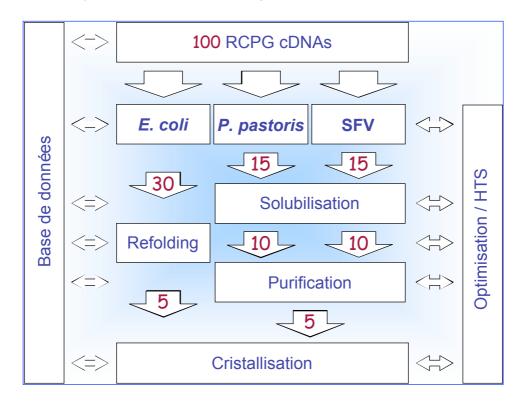


Figure 21: Structure du programme MepNet.

Présentation des différentes étapes du programme pour l'expression de 100 RCPG dans trois systèmes d'expression différents. Les meilleures cibles sont sélectionnées à chacune des étapes allant de l'expression à la cristalllisation. Des optimisations sont réalisées à chacunes de ces étapes. Des informations sont récoltées dans une base de données afin de réaliser des études statistiques.

L'objectif final de l'étude étant de disposer de quantités de matériel protéique compatibles avec des études de biologie structurale (de l'ordre du mg), trois systèmes d'expression représentatifs et parmi les mieux caractérisés ont été sélectionnés : un système levure (Pichia pastoris), un système virus / cellules de mammifère (Semliki Forest Virus / cellules BHK) permettant tous deux d'exprimer les récepteurs dans leur forme "native" (dans les membranes), ainsi qu'un système bactérien (Escherichia coli) dans lequel le but visé est l'expression des récepteurs sous forme de corps d'inclusion. Dans ces différents cas, l'objectif recherché est de ne retenir pour la suite de l'étude que les RCPGs offrant les meilleurs résultats en termes de rendement et de qualité d'expression (30 pour le système E. coli et 30 pour les systèmes P. pastoris et SFV). L'étape suivante consiste alors, dans le cas de l'utilisation de E. coli, de procéder à la dénaturation des corps d'inclusion suivie par leur renaturation dans les conditions permettant de retrouver des récepteurs fonctionnels. Dans le cas des protéines exprimées chez P. pastoris et le système SFV / cellules de mammifères, l'objectif est de déterminer les conditions de solubilisation et de purification des récepteurs sous forme active. Pour les meilleurs candidats obtenus par ces différentes approches, l'étape ultime correspond aux essais de cristallisation. A chacune de ces étapes, l'ensemble des informations collectées, sont mises en forme dans une base de données dédiée afin

Chapitre 2 : les objectifs et la structure du programme MePNet

d'être utilisée comme référence pour tenter d'établir des corrélations entre les séquences des récepteurs, les niveaux d'expression observés dans chacun des trois différents systèmes, les conditions de solubilisation et de purification, etc...

Le prochain chapitre présentera les différentes familles de récepteurs qui m'étaient confiés, afin d'en réaliser l'étude à chacune des étapes du programme MePNet.

Ce chapitre sera suivi de la présentation des trois différents systèmes d'expression qui ont été sélectionnés pour le projet.

# Chapitre 3: Les récepteurs étudiés

# I. La sérotonine et ses récepteurs

# 1. Les récepteurs à sérotonine

La diversité de structures et de fonctions des récepteurs à sérotonine a non seulement compliqué leurs classifications, mais a également crée des difficultés dans la compréhension de leurs rôles physiologiques (Hoyer et al. 1996).

L'étude des récepteurs à sérotonine a débuté en 1957 lorsque Gaddum et Picarelli ont réussi à bloquer par l'intermédiaire de différents antagonistes deux effets physiologiques de la sérotonine (Tierney et al. 2001).

Les données disponibles en 1988 ont indiqué qu'au moins six types distincts de récepteurs à sérotonine pourraient être identifiés. Ce n'est cependant qu'a la fin de l'année 1994 que 16 sous-types de récepteur à sérotonine ont été clonés à partir de tissus de mammifères (Peroutka et al. 1994). La multiplicité des récepteurs à sérotonine a ainsi dépassé toutes les prédictions. Les planaires font partie des plus anciens organismes chez lesquels ont a retrouvé des récepteurs à sérotonine. Ces récepteurs présentent une très faible identité de séquence variant entre 18 et 35% d'identité (figure 23). Sachant que les trois classes majeures de récepteurs à sérotonine ont approximativement 24% d'homologie de séquence, le premier récepteur à sérotonine qui a donné naissance à cette famille de sérotonine doit dater de plus de 750 millions d'années.

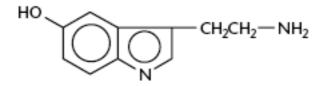


Figure 22: Structure chimique du 5 Hydroxytryptamine (Serotonine)

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5HT) (figure 22) a été initialement identifiée dans les intestins (entéramine) et le sang (sérotonine). Elle a été retrouvée aussi bien chez les plantes que chez les animaux.

Les récepteurs à sérotonine sont présents dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans de nombreux autres tissus non neuronaux tels que les intestins, le système cardiovasculaire et les cellules sanguines. La sérotonine a été impliquée dans de nombreuses maladies telles que la migraine, l'hypertension, la dépression, l'anxiété, la phobie sociale, la schizophrénie, les désordres alimentaires et les vomissements. De

### Chapitre 3 : Les récepteurs étudiés

nombreux traitements pour de telles maladies interviennent par l'intermédiaire du système à sérotonine (tableau 4).

La classification et la nomenclature des récepteurs à sérotonine (tableau 3) a connu une considérable évolution durant les 10 dernières années. Les récepteurs à sérotonine se divisent en sept classes (5HT1 à 5HT7) en fonction de leurs diversités structurales et de leurs mécanismes effecteurs (figure 24). Ces récepteurs appartiennent soit à la famille des RCPG soit à celle des canaux ioniques (famille 5HT3).

5HT1	5HT2	5HT3	5HT4	5HT5	5HT6	5HT7
5HT1A	5HT2A	5HT3A	5HT4	5ht5A	5ht6	5HT7
5HT1B	5HT2B	5HT3B		5ht5B		
5HT1D	5HT2C					
5ht1E						
5ht1F						

Tableau 3 : Les familles des récepteurs à sérotonine et les différents sous-types.

	Type de récepteur	Protéine G	Effecteur	Sous-type	Implication médicale
5HT1	RCPG	Gi/o	- AMPc	5HT1A	Anxiété
				5HT1B	Migraine
				5HT1D	Migraine
				5HT2A	Anxiété Dépression
5HT2	RCPG	Gq	+ PLC	5HT2C	Anxiété
					Dépression
					Migraine
5HT3	Canaux ioniques			5HT3	Anxiété
5HT4	RCPG	Gs	+AMPc	5HT4	Gastroparesis
5HT5	RCPG	Gs	+AMPc		
5HT6	RCPG	Gs	+AMPc		
5HT7	RCPG	Gs	+AMPc		

Tableau 4 : La famille des récepteurs à sérotonine.

Les protéines G associées, les effecteurs ainsi que les effets cliniques.

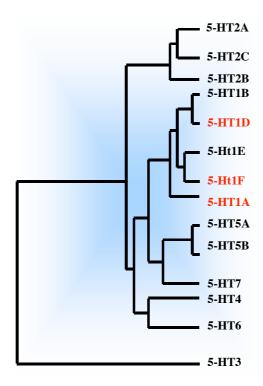


Figure 23 : Diagramme représentant l'évolution des récepteurs à sérotonine humains (à l'exception du récepteur 5HT5A et 5HT5B dont l'origine est « murine ») en fonction de leurs séquences. (Barnes et al. 1999)

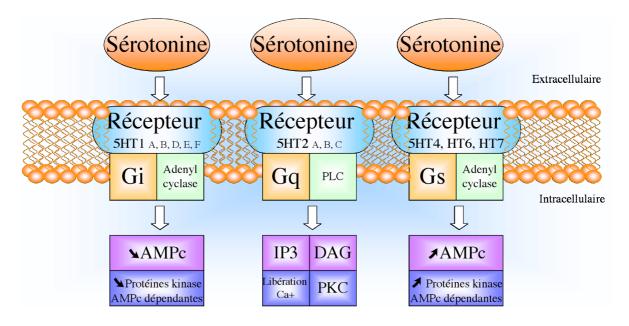


Figure 24 : Effecteurs secondaires des récepteurs à sérotonine.

# 2. La sous-classe des récepteurs 5HT1, les récepteurs 5HT1A, 5HT1D et 5HT1F

Les récepteurs 5HT1 représentent la plus importante sous-classe des récepteurs à sérotonine. La classe des récepteurs à 5HT1 comprend 5 récepteurs différents (5HT1A, 1B, 1D, 1 E, et 1F). Ces récepteurs ont 40 à 63% d'identité de séquence (figure 23). Ils se lient préférentiellement aux protéines G de type Gi/o pour inhiber la formation d'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc) (figure 25) (Gerhardt et al. 1997). Les récepteurs 5HT1F et 5HT1 E ont été provisoirement placés dans la sous classe 5HT1 dans l'attente de la découverte de ligands endogènes y correspondant et ayant un rôle pharmacologique. Cependant, la fonctionnalité des récepteurs 5HT1A, 1B, et 1D a déjà été démontrée dans de nombreux tissus d'espèces variées. On peut remarquer que la désignation 5HT1C reste vacante. En effet, ce récepteur a été renommé 5HT2C et reclassé dans la sous-classe 5HT2 (Hoyer et al. 1994).

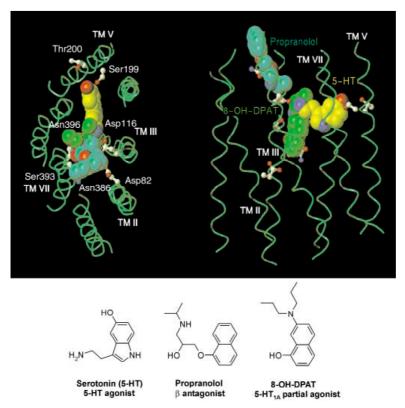


Figure 25 : (Klabunde et al. 2005) Site de liaison de trois ligands différents sur le récepteur 5HT1A selon un modèle 3D basé sur la rhodopsine.

Gauche : vue extracellulaire ; Droite : vue de côté avec la région extracellulaire en haut. Les trois ligands sont la sérotonine (5HT) en jaune, le propanolol en cyan, et le 8-OH-DPAT en vert. Les résidus identifiés par mutagenèse sont indiqués. Le site du « 5HT » est localisé entre TM3 (avec Asp116 comme site de reconnaissance clé) et TM5 (la Ser199 et et Thr200 interagissent avec le groupe 5-OH de la sérotonine). Le site de liaison du « propanolol » est localisé entre le TM3 et le TM7. Le site de liaison du « 8-OH-DPAT » est également localisé entre le TM3 et le TM7

Le récepteur 5HT1A (figure 26) a été le premier récepteur à sérotonine à être entièrement séquencé. Le récepteur 5HT1A de rat a 89% d'homologie avec son homologue humain. Les récepteurs 5HT1A sont largement distribués dans le cerveau. Ils sont somatodentritiques et ils agissent comme des autorécepteurs (Ils régulent le re-largage de leurs propres ligands) pour inhiber la transmission du signal.

Les récepteurs post-synaptiques 5HT1A sont présents dans de nombreuses structures limbiques et particulièrement dans l'hippocampe. L'activation des récepteurs 5HT1A entraîne un syndrome comportemental ainsi qu'une diminution de la pression sanguine et des battements du coeur. Les récepteurs gastro-intestinaux 5HT1A ont été identifiés chez le cochon dinde où ils fonctionnent comme des modulateurs inhibiteurs du potentiel d'excitation post synaptique rapide.

Les agonistes du récepteur 5HT1A (figure 25) tels que la buspirone ou geripirone ont été développés pour traiter l'anxiété et la dépression. L'antagoniste pindolol augmente l'efficacité thérapeutique et diminue la re-capture des inhibiteurs de sérotonine lorsqu'ils sont co-administrés chez des patients déprimés. Le flesinoxan est un agoniste développé initialement comme un agent agissant contre l'hypertension mais certains effets secondaires ont amené à l'abandon de cette approche.

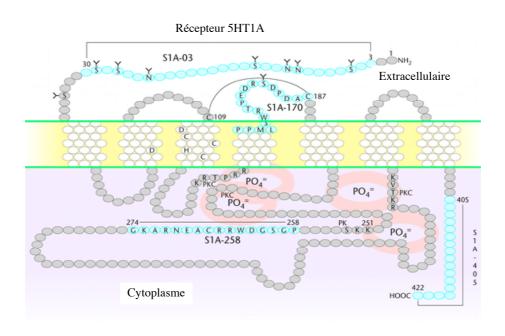


Figure 26 : Structure du récepteur 5HT1A (Azmitia 2001).

Au début des années 1990 deux clones homologues, présentant des réactions pharmacologiques proches, ont été identifiés. Ils ont été nommés  $5HT1D\alpha$  et  $5HT1D\beta$  (Hamblin et Metcalf. 1991). Puis, en comparant la séquence et la distribution du récepteur  $5HT1D\beta$  avec le récepteur  $5HT1D\beta$  de rongeurs. Le récepteur  $5HT1D\beta$  a été redéfini comme un homologue du 5HT1B et le  $5HT1D\alpha$  a été renommé 5HT1D (Hartig et al. 1996).

Le récepteur 5HT1D a 70% d'identité avec le récepteur 5HT1B. Ces récepteurs ont des profils pharmacologiques très semblables (Hartig et al. 1992). Le niveau d'expression du 5HT1D est très faible par rapport à celui du récepteur 5HT1B.

Il a été difficile de déterminer le rôle fonctionnel du récepteur 5HT1D. Cependant, l'apparition de ligands sélectifs tels que le SB216641 (5HT1B) ou le BRL15572 (5HT1D) ont facilité cette analyse. Le 5HT1D est présent dans le coeur humain où il module le re-largage de la sérotonine. Les antimigraineux disponibles actuellement ne font pas la distinction entre les deux récepteurs.

Très peu de choses sont connus sur le récepteur 5HT1F. Son gène a été détecté à l'origine chez la souris sur la base de son homologie de séquence avec les récepteurs 5HT1B/D (Amlaiky et al. 1992). Le gène humain a été séquencé peu de temps après (Adham et al. 1993). Ce récepteur a initialement été nommé 5HT1Eß sur la base de son profil pharmacologique proche de celui du récepteur 5HT1E. Cependant la distribution de l'ARNm de ce récepteur est différente de celle du récepteur 5HT1E. En effet, l'ARNm du récepteur 5HT1E humain a été identifié dans le cerveau, le mésentère, et l'utérus mais il est absent du rein, du foie, de la rate, du coeur, du pancréas et des testicules. Cette distribution indique que ce récepteur pourrait avoir un rôle d'autorécepteurs à sérotonine et interviendrait dans les fonctions visuelles et cognitives (Waeber et Moskowitz. 1995).

Des ligands sélectifs du récepteur 5HT1F ont été développés pour la migraine. Ainsi, le sumatriptan reconnaît les sites du récepteur 5HT1F. Deux agonistes sélectifs de ce récepteur existent : LY344864 et LY334370. Leurs activités chez le rat indiquent que ces drogues peuvent jouer un rôle dans le traitement de la migraine.

# II. La cholecystokinine, la gastrine et les récepteurs à cholecystokinine

#### 1. Introduction

La cholecystokinine (CCK) est une hormone peptidique qui a été découverte dans l'intestin grêle (figure 27). Il s'agit d'une hormone cholecystokinetique qui a une action pancreozyme. Mais cette hormone a également un rôle de facteur de croissance et de neurotransmission. C'est un des plus important peptide neurotransmetteur exprimé dans le cerveau.

Deux récepteurs à CCK ayant 48% d'identité ont été identifiés (Wank et al. 1992 ; Kopin et al. 1992).

### 2. Les récepteurs à CCK et le récepteur CCKB (CCK2 / gastrine)

Les récepteurs CCKA (« alimentaire ») et B (« cerveau ») ont été définis en fonction de leurs affinités pour des antagonistes spécifiques ainsi que pour une famille de peptide ayant une région C-terminal identique mais présentant des différences dans la sulfatation des résidus tyrosines. Le récepteur CCKA a de 500 à 1000 fois plus d'affinité pour le résidu sulfaté CCK que pour la gastrine. Le récepteur CCKB, quant à lui, interagit avec la gastrine et le peptide CCK avec une affinité très proche.

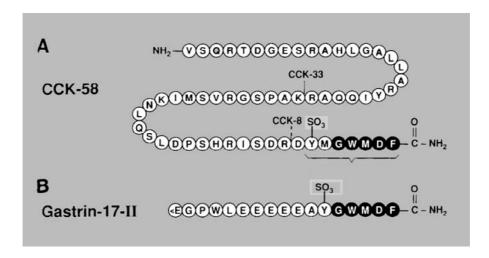
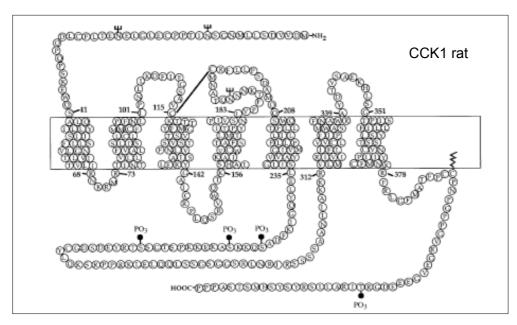


Figure 27 : (Miyasaka et al. 2003) Structure de la Gastrine (B) et de la cholecystokinine CCK-58 (A).

Ces deux peptides ont une séquence C-terminal pentapetidique identique. (A) la cholecystokinine présente une sulfatation du septiéme résidu tandis que la gastrine (B) présente une sulfatation du sixième résidu. (A) La cholecystokinine existe sous différentes formes moléculaires biologiquement actives (CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, et CCK8) qui dérivent d'un même précurseur moléculaire de 115 acides aminés.

Les récepteurs CCKA et B ont été respectivement renommés CCK1 et 2 (figure 28). La population majeure de récepteurs CCK correspond au sous-type CCK2 qui est principalement présent dans le système nerveux central, et dans quelques régions de l'estomac et du nerf vague. CCK1 est localisé dans le tractus intestinal mais également dans quelques régions du cerveau (Hill et al. 1987).



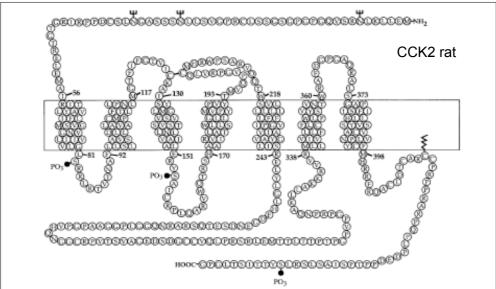


Figure 28 : (Noble et al. 1999) Représentation schématique du récepteur CCK1 et CCK2 de rat. Sont indiqués : les sites putatifs de glycosylation ( $\Psi$ ), les sites de phosphorylation Serine et Threonine (PO3) et les résidus cystéines conservés dans la première et la seconde boucle extracellulaire avec la formation possible des ponts disulfures. Ainsi qu'une cystéine conservée et probablement palmitoylée dans la région c-terminal.

Chapitre 3 : Les récepteurs étudiés

CCKB (CCK2) est présent dans les neurones vagues afférents et les neurones cholinergiques intra-pancréatique où il régule la sécrétion chez l'homme. Chez les animaux transgéniques, l'absence du gène du récepteur CCKB a pour conséquence une diminution de la croissance des cellules gastriques pariétales et des cellules ECL (enterochromaffin-like). Cela confirme l'effet activateur de la croissance de la gastrine, sur le récepteur CCKB, qui a été observé chez les patients ayant une hypergastrinemie due au syndrome de Zollinger-Ellison. De plus, ces souris présentent également une hypochlorhydrie et une hypergastrinemie. L'absence de toutes autres anomalies, connaissant la vaste expression et la grande variété de fonctions physiologiques attribuées au récepteur CCKB, peut s'expliquer par une compensation faisant intervenir d'autres hormones redondantes ainsi que leurs récepteurs. L'important rôle physiologique de ce récepteur dans la muqueuse gastrique et le SNC a particulièrement attiré l'attention. Il est ainsi devenue une cible potentielle pour le criblage de nouvelles droques.

Le récepteur CCKB interagit avec la protéine Gq et active la voie de la phospholipase entraînant un re-largage d'acide arachidonique et activant une voie MAP kinase. Dans l'estomac, la stimulation de récepteur CCKB (CCK2 / gastrine) par le peptide endogène hormonal de la gastrine déclenche la sécrétion d'acide ainsi que la croissance de la muqueuse et sa différenciation. Dans le SNC, on suppose que ce récepteur module l'anxiété et la perception de la douleur lorsqu'il est stimulé par des neurotransmetteurs endogènes tels que l'octapeptide de cholecystokinine sulfaté (CCK-8). Les fonctions physiologiques associées à ce récepteur ont amené un intérêt pour le développement de drogues ayant un potentiel thérapeutique, tel que le traitement de l'anxiété ou de l'ulcère. Ceci a permis le développement d'un grand nombre de molécules liant spécifiquement le récepteur CCKB. Ces ligands comprennent des dérivés peptidiques de la gastrine et de la cholecystokinine ainsi que de petites molécules (peptides) et des ligands synthétiques.

# III. L'histamine et les récepteurs histaminergiques

### 1. Introduction

L'histamine (ß-imidazolylethylamine) (figure 29) a été isolée en 1910 par Dale et Laidlaw à partir de tissus biologiques (Dale H. and Laidlaw P. , 1910). C'est un médiateur des conditions physiologiques et pathophysiologies. L'histamine peut également fonctionner comme un neurotransmetteur. L'histamine est synthétisée par une grande variété de cellules dans l'organisme telles que les plaquettes, les basophiles, les cellules ECL, les cellules endothéliales et les neurones. Au début du siècle l'histamine a été considérée comme un médiateur important de l'allergie et de l'inflammation. Ceci a permis de développer des antihistaminiques utilisés pour inhiber certains syndromes de l'allergie. C'est en 1942, que « l'Antergan » fût le premier antihistaminique à être utilisé chez l'homme. On pouvait en 1950 dénombrer 20 composés disponibles cliniquement et capables de bloquer l'effet de l'histamine.

Figure 29 : Structure de l'histamine

L'observation que les antihistaminiques ne bloquent pas tous les effets induits par l'histamine (c'est-à-dire au niveau de l'estomac et du coeur) amena en 1966 Ash et Schild à proposer la présence de deux sous-types de récepteur H1 et H2. Trois types distincts de récepteur à histamine ont par la suite été identifiés (H1, H2, et H3) sur la base d'études quantitatives sur des tissus périphériques et du cerveau (tableau 5).

Le récepteur H1 est présent dans de nombreux tissus. Il influence l'homéostasie cellulaire en activant la PLC. Le récepteur H2 entraîne quant à lui une réponse intracellulaire médiée par la protéine Gs et qui se caractérise par une augmentation d'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc). Les deux nouveaux membres de cette famille nommés H3 et H4 agissent par l'intermédiaire de ces deux voies et font intervenir une troisième voie qui entraîne une diminution des niveaux d'AMPc. Le récepteur à histamine H3 est présynaptique. Ce sous-type régule le re-largage et la synthèse d'histamine (autorécepteur) mais il est également impliqué dans le re-largage de nombreux autres neurotransmetteurs tels que la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine, et l'acétylcholine. Le récepteur H4 est

principalement exprimé dans les cellules hematopoïétiques et immunocompétentes. Il se couple comme le récepteur H3 à la protéine Gi/o. Le rôle physiologique de ce récepteur doit encore être déterminé ainsi que les ligands qui lui sont spécifiques.

Récepteurs à histamine	Clonage	Protéine G	Effecteurs	Localisation
H1	1991	Gαq	PLC, Ca2+, NOS, cGMP, PLA2	Largement exprimé
H2	1991	Gαs + d'autres mécanismes GTP dépendant	CAMP, PLC, Ca2+, c-fos	Largement exprimé
H3	1999	Gi/o	Inhibition de l'accumulation d'AMPc, Ca2+, MAPK	Cerveau
H4	2000	Gi/o	Inhibition de l'AMPc (moins que pour le H3), MAPK	Hematopoietic, intestins

Tableau 5 : Caractéristiques de principaux récepteurs à histamine.

Abréviation : MAPK, mitogen-activated protein kinase ; NOS, nitric oxide synthase ; PLA2, phospholipase A2 ; PLC, phospholipase C.

### 2. Le récepteur à Histamine H2

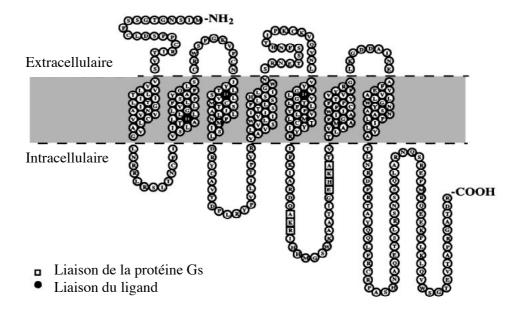


Figure 30 : (Del valle et al. 1997) Structure du récepteur à histamine H2. Les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison du ligand et de la protéine Gs sont indiqués.

Figure 31 : (Del valle et al. 1997) Modèle théorique de la liaison de l'histamine sur le récepteur à histamine H2.

Le résidu Asp présent dans le troisième domaine transmembranaire (Asp98) lie par l'intermédiaire de son groupe NH3+ chargé positivement la chaîne d'éthyle ammonium de l'histamine. On suppose que le nitrogène de l'imidazole de l'histamine forme un pont hydrogène avec les résidus Asp186 et thr190 du cinquième domaine transmembranaire du récepteur à histamine H2.

La 3H-cimetidine a été développée en 1970 pour étudier les récepteurs à histamine H2 (figure 30) ceci à été suivi par la production de sondes plus spécifiques telles que la tiotidine, et la ranitidine. Ce récepteur est présent dans de nombreux tissus et types cellulaires comprenant la muqueuse gastrique, le cerveau et les cellules basophiles.

Le récepteur H2 est couplé au système d'adénylate cyclase qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. Ainsi, suite à la liaison de l'histamine sur le récepteur (figure 31), une protéine Gs est activée et peut activer à son tour l'adénylate cyclase, ce qui résulte par une augmentation d'AMPc intracellulaire. L'action des RCPG semble être souvent médiée par les changements de taux intracellulaires d'AMPc, qui est capable de réguler de nombreuses fonctions. L'augmentation d'AMPc stimule la sécrétion d'acide dans les cellules pariétales de la muqueuse gastrique.

# IV. Les récepteurs métabotropiques du glutamate

### 1. Le L-Glutamate et les récepteurs du glutamate

Le L-Glutamate est un neurotransmetteur important présent dans le système nerveux central. Il agit sur une grande variété de récepteurs ionotropiques (canaux ioniques) et métabotropiques (RCPG).

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont des récepteurs largement présents dans le système nerveux central. Ils agissent pour moduler des fonctions synaptiques par des interactions avec d'autres récepteurs, des mécanismes de signalisation et (probablement) l'expression de gènes. Huit sous-types de récepteurs métabotropiques du glutamate ont été clonés. Ils se répartissent en 3 groupes différents en fonction de leurs similarités de séquence, de leurs voies de signalisation ainsi que de leurs pharmacologies :

groupe I (mGLUR1 et 5), le groupe II (mGLUR2 et 3) et le groupe III (mGLUR 4, 6, 7, 8) (figure 32). Ils appartiennent avec les récepteurs GABAb, les récepteurs à phéromone et les récepteurs sensibles au calcium à la superfamille C des RCPG (Pin et al. 2003).

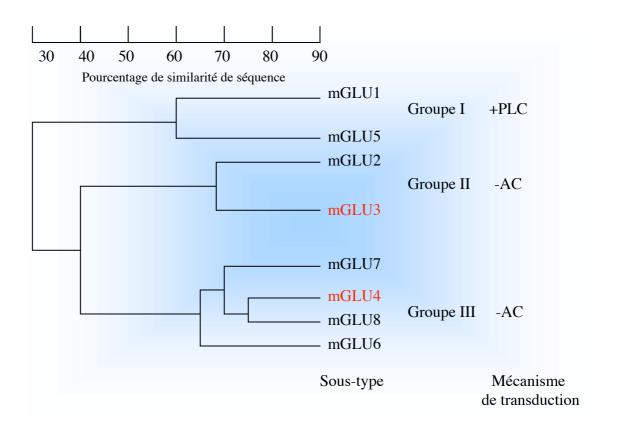


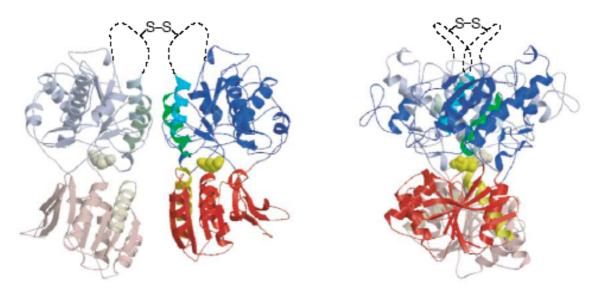
Figure 32 : Diagramme des récepteurs de la famille métabotropique du glutamate (Doherty et al. 2001)

Le diagramme représente l'identité de séquence entre les différents membres de la famille des récepteurs du glutamate. Les récepteurs ont été divisés en trois groupes selon leurs identités de séquence, leurs mécanismes de transduction du signal (+PLC, stimulation de la PLC; -AC, inhibition de l'adénylate cyclase) et de leurs pharmacologies.

Les récepteurs mGLU sont composés de plus de 1000 acides aminés. Ils ont une très grande région N-terminal qui peut correspondre à elle seule à la longueur de certains récepteurs adrénergiques (400-500 acides aminés). On peut également remarquer que la troisième boucle intracellulaire est moins grande que pour la plupart des RCPG. Cette particularité est partagée avec les RCPG de type adrénergique. Ces récepteurs se distinguent aussi par une région C-terminal pouvant présenter des différences d'épissage. Ainsi un seul gène peut fournir jusqu'à quatre types différents de récepteurs présentant une région C-terminal plus ou moins grande.

La fixation du glutamate sur les récepteurs mGLU se situe dans la région N-terminal (de même que pour les récepteurs GABA appartenant à la même famille) (figure 33). La

fixation du ligand dans cette région a été démontrée par mutagenèse (Sato et al. 2003) et par cristallographie aux rayons X (Tsuchiya et al. 2002).



**Figure 33**: **Structure de la région liant le ligand du récepteur mGLU1** (Jingami et al. 2003). Structure correspondant à la liaison du glutamate représenté en jaune. Deux vues orthogonales sont présentées.

Ce site de liaison se situe plus précisément dans les deux premiers tiers de la région N-terminal. On sait que cette région est constituée de deux domaines globulaires réunis par une région charnière. On suppose que le glutamate lie le premier domaine ce qui entraînerait la fermeture du second domaine sur le premier enfermant l'acide aminé dans une poche. À l'exception du récepteur mGLU6 qui n'est présent que dans la rétine tous les membres de la famille des récepteurs métabotropiques du glutamate sont exprimés dans le système nerveux central des mammifères (dans les cellules gliales et neuronales). Ils sont également exprimés dans la périphérie (système nociceptif).

Le groupe I des récepteurs mGLU comprend les sous-types mGLU1 et mGLU5 qui activent les phospholipases C par l'intermédiaire de la protéine G Gq/G11. L'activation de la phospholipase permet la production d'inositol phosphate (IP3 principalement) qui entraîne le re-largage de Ca2+ à partir des régions de stockages. Ce re-largage est un mécanisme de signalisation commun dans les cellules de mammifères, qui active une myriade d'enzymes sensibles au Ca2+. La cascade de signalisation liée à la PLC peut aussi permettre la production de diacylglycerol qui active la PKC. Pris individuellement, les différents soustypes de mGLU récepteurs peuvent lier différentes cascades de signalisation.

Bien que cette famille de récepteurs mGLU puisse permettre une transmission synaptique par l'activation de potentiels excitateurs post-synaptiques lents, ils ont généralement un rôle modulateur en régulant l'activité neuronale, la transmission synaptique et la plasticité.

# 2. Les récepteurs mGLU du groupe II : mGLUR 3 & mGLUR 4

Les récepteurs du groupe II se couplent à la protéine  $G\alpha i/o$  pour inhiber l'activité de l'adénylate cyclase. Ils sont présents dans le SNC où ils ont une expression variant entre modérée et forte dans différentes régions du cerveau qui sont associées à des désordres anxieux.

Le récepteur mGLU 3 a été localisé par Tamaru en al. (Tamaru et al. 2001) sur des souris KO pour le gène du récepteur mGLU 2 et en utilisant un anticorps anti mGLU3. Ils ont ainsi montré une localisation pour ce récepteur post et pré synaptique sur les neurones ainsi qu'une expression dans certaines cellules gliales. Le récepteur mGLU 3 est également exprimé dans l'hippocampe et le thalamus et est lié au re-largage de neurotrophines dans les cellules gliales. Le composé LY354740 a été le premier agent sélectif du groupe II et semble avoir une action dans les désordres anxieux.

Les récepteurs mGLU du groupe III comme ceux du groupe II sont négativement couplés à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G  $G\alpha i/o$ . L'AMPc contrôle principalement les protéines kinases dépendantes de l'AMPC (PKA). Les protéines kinases activées sont alors capables de phosphoryler différentes protéines substrats incluant les récepteurs eux-mêmes.

Le mGLU 4 est localisé dans les régions pré et post-synaptiques sur des synapses glutamatergiques ou utilisant d'autres neurotransmetteurs où il régule le re-largage de neurotransmetteurs. Il est également présent dans les régions pré-synaptiques des fibres parallèles cérébrales et est lié à la plasticité cérébrale et à l'apprentissage.

# V. L'hormone de melano-concentration (MCH) et les récepteurs à MCH

#### 1. Introduction

La MCH est un peptide cyclique isolé et séquencé à partir d'un saumon en 1983. elle n'a été identifiée chez les mammifères que plusieurs années après (figure 34). L'homologue chez le rat a été purifié à partir de l'hypothalamus en utilisant des anticorps dirigés contre la MCH de saumon, et sa structure primaire a alors été identifiée (Vaughan et al.1989)

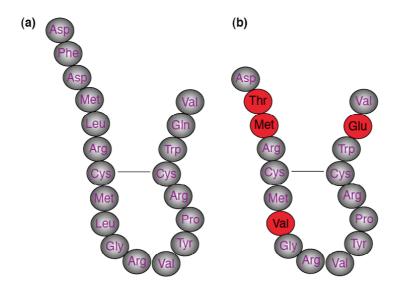


Figure 34 : Représentation schématique de l'hormone de mélano-concentration des mammifères (a) et du saumon (b) (Pissios. et al. 2003).

Les résidus qui diffèrent sont colorés en rouge. En plus des substitutions, la MCH de saumon présente deux acides aminés en moins dans la région N-terminal.

La MCH de rat est composée de dix-neuf acides aminés et elle est identique à celle de l'homme (Presse et al. 1990). Son rôle chez le poisson est de réguler les changements pigmentaires. Chez les mammifères, elle régule l'alimentation et l'énergie homéostasique. Elle est présente chez ces derniers dans le SNC ce qui suppose un rôle de neurotransmetteur.

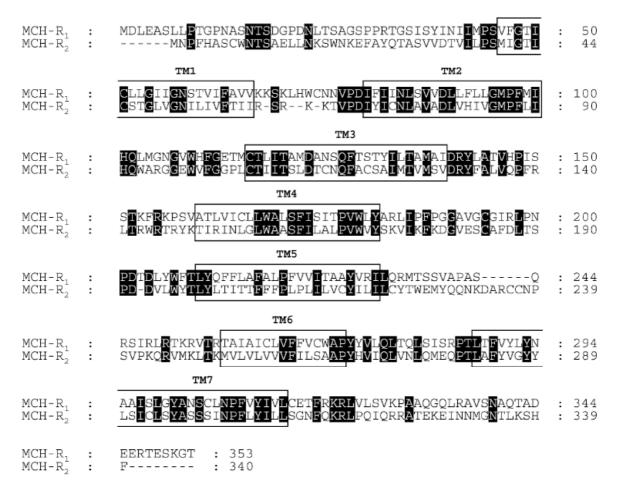


Figure 35 : (Eberle et al. 2004) Alignement de séquences protéiques du MCHR1 et MCHR2 humain.

Les acides aminés identiques sont en noir. Les potentiels domaines transmembranaires sont encadrés.

Deux récepteurs de la MCH ont été caractérisés MCHR1 et MCHR2 (figure 35). Ces récepteurs ne présentent que 38% d'homologie de séquence.

Le profil d'expression du récepteur MCHR2 est très semblable au MCHR1 avec une forte expression dans le cerveau. Ce récepteur se lie préférentiellement à la protéine Gq. MCHR2 semble curieusement présent dans peu d'espèces. Il est, en effet, absent chez les rongeurs, les cochons dindes, les lapins, mais présent chez les carnivores tels que le furet, le chien, le singe et l'homme.

#### 2. Le récepteur MCHR1 (SLC1)

Le RCPG SLC1 (Somatostatin like receptor 1) qui fût découvert en 1996 (Kolakowski et al. 1996) a été caractérisé comme un récepteur orphelin. Il présentait 40% d'homologie dans ses régions hydrophobes avec les récepteurs à somatostatine. Il est composé de 353 acides aminés avec trois sites potentiels de glycosylation dans la région N-terminal. L'utilisation d'extrait de peptides issu de tissus de cerveau a permis de découvrir le ligand du récepteur SLC-1. Le peptide qui a été séquencé correspondait au MCH (Shimomura et al. 1999). Il existe 96% d'homologie entre le MCHR1 de rat et celui de l'homme. L'étude des ligands de ce récepteur a permis de montrer que le dodecapeptide MCH6-17 correspond à la plus petite séquence capable d'entraîner une réponse agoniste (Audinot et al. 2001).

Lorsque ce récepteur est transfecté dans différentes cellules, il transmet différents types de réponses intracellulaires comprenant l'activation de la mobilisation de Ca2+, la rectification de canaux potassium, l'inhibition de l'accumulation d'AMPc induite par la forskoline. Il interagit avec différentes protéines Galfa : Gi, Go et Gq. Il a également été montré que la MCH pouvait inhiber le Ca2+ en agissant sur les canaux Ca2+ voltage dépendant, dans les neurones et l'hypothalamus latéral, ce qui inhibe la transmission synaptique.

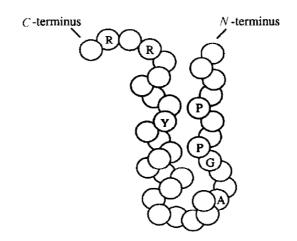
Son expression est localisée à de forts niveaux dans le cerveau et à des niveaux plus modérés dans les yeux et les muscles squelettiques. Il est également exprimé à de faibles niveaux dans la langue et l'hypophyse. Rien n'est actuellement connu sur son rôle possible dans les yeux, les muscles squelettiques et la langue. Cependant, sa présence dans l'hypophyse est en adéquation avec l'action de la MCH sur le re-largage de l'hormone adrenocorticotropique (ACTH).

Il a été montré chez des souris déficientes en ce récepteur, une diminution de la masse graisseuse qui se confirme même lorsque ces souris sont soumises à un régime gras. Un effet similaire est observé après une administration chronique d'antagonistes du MCHR1 tel que le SNAP-7941. La grande présence de ce récepteur dans le cerveau semble indiquer un rôle dans d'autres systèmes comportementaux que le système alimentaire. Ainsi le MCH est supposé comme pouvant intervenir dans l'anxiété.

# VI. Les récepteurs à neuropeptide Y

#### 1. Introduction

Le neuropeptide Y (NPY), peptide YY (PYY) et le polypeptide pancréatique (PP) sont des membres d'une famille d'hormone peptidique appelés famille NPY (figure 36). Le neuropeptide Y a été isolé à partir d'extraits de cerveau de porc (Tatemoto et al. 1982). Actuellement quinze espèces différentes de NPY sont connues. C'est le peptide le plus conservé au cours de l'évolution avec au moins 61% d'identités. Sept positions d'acides aminés ont été conservées chez les différents membres de la famille des NPY. Le NPY ainsi que d'autres membres de la famille des NPY (peptide YY, polypeptide pancréatique) présentent une structure en forme d'épingle à cheveux ce qui permet une proche proximité de la région C et N-terminal du peptide. Il a été montré que le peptide NPY était présent sous forme monomérique et dimérique dans des conditions d'équilibre (Nordmann et al. 1999).



pNPY YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY

pPYY YPAKPEAPGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRY

hPP APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY

Figure 36 : (Cabrele et al. 2000) Séquence en acides aminés du peptide pNPY, pPYY et hPP.

Les positions conservées ont été soulignées. La caractéristique du repliement PP est présentée en haut et les sept positions constantes entre NPY, PYY et PP sont indiquées.

Le NPY est l'un des peptides les plus abondants dans le cerveau. Il est principalement localisé dans le SNC, la source la plus abondante étant l'hypothalamus. Le NPY est également présent dans la périphérie tel que dans le système neuronal sympathique. Il est également exprimé dans le foie, le cœur, la rate, les cellules endothéliales et les vaisseaux sanguins. Le NPY a des propriétés de neurotransmetteurs tandis que PYY et PP agissent comme des hormones endo et exocrines.

Le neuropeptide Y a été, depuis sa découverte il y a plus de 20 ans, impliqué dans de nombreuses pathologies. Des expériences pharmacologiques impliquant des analogues peptidiques du NPY montrèrent l'existence de deux récepteurs pour ce peptide. Les clonages suivant de six récepteurs aux NPY (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 et Y6) et la production de souris KO facilitèrent leurs études et montrèrent leurs implications dans de nombreuses maladies comprenant les désordres alimentaires, les maladies métaboliques, les anxiétés, l'hypertension, les défaillances du cœur et les maladies respiratoires. Ces récepteurs agissent par l'intermédiaire des protéines Gi et Go.

Le récepteur Y1 a d'abord été caractérisé comme étant post-synaptique, Y2 est connu comme étant pré-synaptique, Y3 a le plus d 'affinité pour le NPY, Y4 a d'abord été caractérisé comme un récepteur à PP, Y5 est impliqué dans l'alimentation et Y6 a été cloné malgré le fait qu'il soit non fonctionnel chez l'homme.

#### 2. Le récepteur NPY1

C'est le premier récepteur Y a avoir été cloné (Eva et al. 1990). Il est fortement conservé dans les différentes espèces mammifères avec des identités de 94% ou plus. C'est le seul gène de cette famille à contenir un intron dans sa région codante. Le comportement pharmacologique de ce récepteur est caractérisé par une forte affinité pour le NPY et le PYY mais une faible affinité pour les formes analogues tronquées en N-terminal ainsi que le PP. Il a également été montré que ce récepteur pouvait former des homodimères (Dinger et al. 2003).

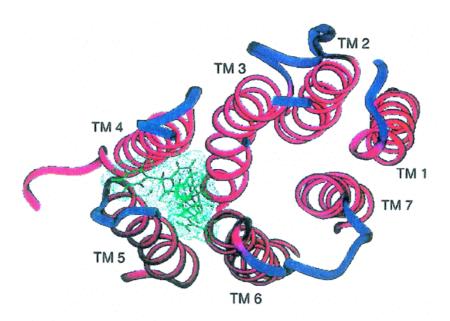


Figure 37 : (Cabrele et al. 2000) Modèle représentant la liaison de l'antagoniste BIBP3226 (vert) sur le récepteur NPY1 humain.

Vue du bas en fonction de l'axe des hélices transmembranaires (TM en rouge). Les boucles extracellulaires sont présentées en bleu.

La région N-terminal du peptide NPY détermine sa liaison et l'activation du récepteur NPY1. Les antagonistes peptidiques du récepteur sont nombreux et correspondent principalement à des formes tronquées dans la région N-terminal du NPY (ex : GR231118). Des antagonistes non-peptidiques ont également été synthétisés (ex : BIBP3226) (figure 37). Ce récepteur est principalement présent dans les vaisseaux sanguins et le système nerveux central. L'effet le plus important médié par le NPY sur le récepteur Y1 est la vasoconstriction ainsi que l'anxiolyse. De plus, ce récepteur avec le récepteur Y5 semble avoir un rôle important dans le comportement alimentaire.

# VII. Les récepteurs purinergiques

#### 1. Introduction

L'important rôle de l'ATP a été montré dans les années 1950. Burnstock proposa en 1972 l'existence de récepteurs spécifiques à l'ATP (Burnstock. 1972) et cela fût démontré au cours des années 1980. On sait que l'ATP joue un rôle physiologique et / ou pathophysiologique important, dans de grandes variétés de systèmes biologiques comprenant la neurotransmission dans des neurones centraux et périphériques.

Différents nucléotides tels que l'ATP, l'ADP et l'UTP agissent comme des messagers intercellulaires et ont une grande influence sur des fonctions cellulaires en agissant sur un grand nombre de récepteurs situés à la surface cellulaire appelés récepteurs P2. Abbracchio et Bunstock (Abbracchio et al. 1994) proposèrent l'existence de deux familles séparées de récepteurs P2 : P2X et P2Y. Le clonage des récepteurs P2 a confirmé cette idée. Les récepteurs P2X sont des canaux ioniques tandis que les récepteurs P2Y appartiennent à la famille des RCPG.

Huit récepteurs P2Y ont été clonés ils comprennent de 328 (P2Y6) à 538 (P2Y8) acides aminés ce qui correspond à une masse moléculaire allant de 40 à 70 kDa dans leur forme glycolsilée. Il y a huit récepteurs P2Y qui sont exprimés dans les tissus humains : P2Y1, Y2, Y4, Y6, Y11, Y12, Y13 et Y14. P2Y1, Y6, Y11, Y12, Y13, et Y14 sont exprimés dans le SNC. P2Y1, P2Y12, et P2Y13 sont seulement sensibles aux nucléotides à adénine, tandis que P2Y6 est un récepteur sensible aux nucléotides à uracile.

Les autres récepteurs sont exclusivement présents dans les espèces non mammifères. Cette famille de récepteur se caractérise par une grande variabilité de séquence entre ses différents membres. Ainsi P2Y1 et P2Y11 ne possèdent que 33% d'acides aminés identiques malgré leurs ressemblances au niveau pharmacologique. La plupart des séquences codant pour les récepteurs P2Y semblent ne pas contenir d'intron à l'exception de P2Y11 qui en contient un.

### 2. Le récepteur P2Y1

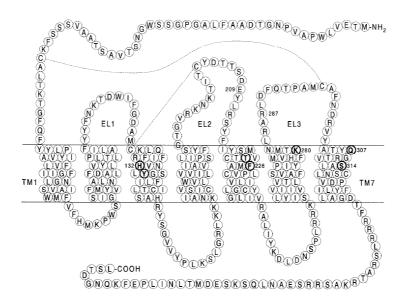


Figure 38 : (Kügelgen et al. 2000) Prédiction de la structure secondaire du récepteur humain P2Y1.

Les cercles et les lettres en gras représentent les acides aminés susceptibles d'être impliqués dans la liaison du nucléotide. Les pointillés représentent les probables ponts disulfures. (TM, région transmembranaire ; EL, boucle extracellulaire).

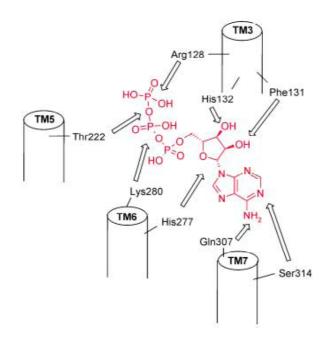


Figure 39 : (Klabunde et al. 2002) Schéma de l'interaction de l'ATP avec le récepteur P2Y1 en fonction des études de mutagenèse et de modélisation.

Pour des raisons de clarté, l'interaction avec Arg310 (TM7) n'est pas montrée.

Le récepteur P2Y1 (figure 38) a été cloné à partir de cerveau d'embryon de poulet. Cette séguence a ensuite été détectée dans de nombreuses espèces de mammifères incluant celle de l'homme. Dans toutes les espèces, ce récepteur est sélectif pour les nucléotides adénine. Il est activé par l'ATP, ADP, 2-methylthio-ADP, 2-methylthio ATP et ATP gammaS, mais pas par les nucléotides uracile (figure 39). Le 2-methylthio-ADP est un agoniste. L'on peut noter qu'en fonction des conditions expérimentales et de la densité du récepteur, les nucléotides triphosphates peuvent avoir un rôle d'agoniste, d'agoniste partiel ou d'antagoniste. Ainsi l'ATP à été montré comme pouvant jouer un rôle d'antagoniste dans certains cas (Leon et al. 1997; Palmer et al. 1998). Les P2Y1 humain et de rat préfèrent les nucléotides diphosphates aux triphosphates. Ce récepteur agit dans divers tissus tels que les muscles mous, l'endothélium et les tissus neuronaux. L'ARNm de ce récepteur est exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, l'endothélium aortique, le pancréas, la rate, le cerveau et la moelle épinière ainsi que les plaquettes du sang. Les modèles d'animaux, où ce récepteur est absent, ont permis de démontrer le rôle de ce récepteur dans l'agrégation des plaquettes du sang induit par l'ADP (Fabre et al. 1999). L'absence de ce récepteur entraîne un prolongement du temps de saignement et protége les animaux du thromboembolisme induit par l'ADP et le collagène.

Tous les récepteurs P2Y clonés sont capables de se coupler à la voie de l'inositol phosphate (IP3). Cela consiste à activer la phospholipase C qui augmente la quantité IP3 et mobilise alors le Ca2+ à partir des régions de stockage intracellulaire. En plus de la voie d'activation de la PLC de nombreuses voies de transduction de signaux ont été impliquées dans l'activation des récepteurs P2Y tels que PKC, PLA2, les canaux ioniques sensibles au calcium.

# VIII. Les récepteurs à somatostatine

La somatostatine est un neuropeptide qui a été isolé à partir de l'hypothalamus comme un inhibiteur de sécrétion de l'hormone de croissance. La somatostatine est exprimée dans des régions du système nerveux ainsi que dans des organes endo et exocrines. Cette neurohormone est également impliquée dans la régulation de l'insuline, la sécrétion du glucagon et des comportements complexes tels que la locomotion et l'apprentissage. (Reisine et Bell. 1995).

Il existe deux formes biologiquement actives de la somatostatine. La somatostatine 14 qui est composée de 14 acides aminés. Elle est présente dans le système nerveux central. C'est un des rares composés naturels correspondant à un peptide cyclique. Cette cyclisation est capitale pour sa fonctionnalité. La somatostatine 28 correspond à la somatine 14 avec une

extension de 14 acides aminés dans la région N-terminal. Ces deux formes de somatostatine dérivent d'un clivage endoprotéolytique d'une même prosomatostatine. La somatostatine 14 est la principale forme de somatostatine présente dans le cerveau. Elle est exclusivement exprimée dans la rétine et le pancréas. La somatostatine 28 est, quant à elle, la principale forme de somatostatine présente dans la muqueuse de l'intestin. Un troisième peptide ressemblant à la somatostatine a été identifié dans le cerveau. Il s'agit de la cortistatine (De Lecea et al. 1996).

L'action de la somatostatine est médiée par la stimulation de cinq sous-types différents de récepteurs membranaires (Reisine et Bell. 1995). Ils se nomment sst1, 2, 3, 4, et 5. Ces cinq récepteurs lient la somatostatine 14 et 28 avec une forte affinité. Ces récepteurs ont une forte similarité de séquence. Les ARNm de sst1, 2, 3 et 4 sont fortement exprimés dans le cortex cérébral et l'hippocampe ainsi que dans d'autres régions limbiques. Le récepteur sst5 est le seul récepteur dont l'ARNm est difficilement détectable dans le cerveau. L'ARNm des récepteurs sst1-4 est présent dans l'hypothalamus qui correspond à une région du cerveau impliquée dans certaines fonctions neuroendocrines de la somatostatine (Beaudet et al. 1995). Le récepteur sst2 est exprimé dans les neurones excrétant une hormone de croissance (GHRH). Les ligands liant ce récepteur inhibent la sécrétion de GHRH. Les récepteurs à somatostatine lient différentes protéines G. Il a été montré que sst2 se lie à Gia1, 2, 3 et Go (Law et al. 1995). Sst2 et sst3 sont couplés à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la même sous unité  $\alpha$  de la protéine G. Les nombreuses protéines G liant les récepteurs à somatostatine permettent à la somatostatine de réguler d'une manière indépendante différents seconds messagers.

La seconde boucle extracellulaire de sst1 semble être le site de liaison de ligand sélectif. (Liapakis et al. 1996). L'effet le mieux caractérisé de la somatostatine est l'inhibition de l'excrétion d'hormone de croissance par l'hypothalamus. Sst1, 2 et 5 semblent aussi jouer un rôle dans la prolifération des tissus. Sst1 a également un rôle important dans le traitement des cancers. C'est le seul récepteur à somatostatine qui est exprimé dans le cancer de la prostate. Alors qu'il n'est pas exprimé dans des prostates normales, le ligand de ce récepteur serait donc utile pour la détection des cancers de la prostate ainsi que pour la réduction de la prolifération des tumeurs de la prostate.

# IX. Les récepteurs à vasopressine

Le nonapeptide appelé arginine vasopressine (AVP) est également connu sous le nom d'hormone antidiurétique (ADH). Cette hormone est également présente chez les invertébrés ce qui indique que le gène ancestral de cette protéine est apparu avant la séparation des vertébrés et des invertébrés, c'est à dire il y a environ 700 millions d'années (Acher et al. 1995). Elle est synthétisée par l'hypothalamus sous la forme d'un précurseur qui sera clivé pour produire l'AVP, la neurophysine2 et la co-peptine. Elle régule l'homéostasie osmotique et cardiovasculaire. L'AVP est relarguée dans le sang. Elle active alors des récepteurs cibles ce qui entraîne une augmentation d'AMPc ce qui permet de recruter les canaux à aquaporine pour augmenter la réabsorption de l'eau.

Trois récepteurs à vasopressine ont été décrits. Les récepteurs vasculaires V1, V1 rénaux, V2 pituitaire et V3. Le signal de la vasopressine est transmit par l'intermédiaire des protéines Gs et Gq/11. La voie Gs se caractérise par une inhibition de l'adénylate cyclase tandis que la voie Gg/11 stimule la phospholipase ß.

Le récepteur V1 (figure 40) utilise la voie Gq/11 en activant les isoformes ß de la phospholipase C. On peut distinguer la présence de récepteur V1a et V1b.

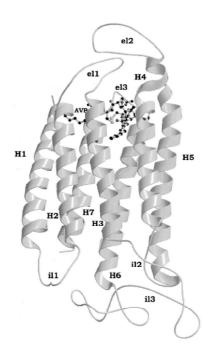


Figure 40 : (Holmes et al. 2003) Représentation de la vasopressine humaine V1.

L'AVP est liée au récepteur. Les boucles intracellulaires sont nommées il1,2,3. Les boucles extracellulaires sont nommées el1,2,3. Les segments transmembranaires sont nommés H1-7.

De nombreuses voies de signalisation sont associées à ce récepteur. Ces voies incluent le flux de calcium, la phospholipase A2, la phospholipase C, et la phospholipase D. Ces récepteurs sont présents dans les muscles mous vasculaires et entraînent une contraction. Ils sont également présents dans les myocytes cardiaques. De plus, ce récepteur est localisé dans le cerveau, le foie, les vaisseaux sanguins, et la medulla rénale. Le rôle physiologique exact de ce récepteur dans ces différents tissus reste encore inconnu. Il existe de nombreuses variations de ce récepteur entre les espèces. Ainsi malgré le fait que la vasopressine de rat et d'humain soient identiques, le récepteur humain V1 présente seulement 80% d'homologie avec le récepteur de rat. V1a et 1b qui activent la phospholipase par l'intermédiaire de la protéine Gq/11 et V2 active l'adénylate cyclase en interagissant avec la protéine G Gs. Le récepteur V1b est très proche du récepteur de l'oxytocine.

# X. Les récepteurs à Phéromone

Les récepteurs à phéromones Ste2 et Ste3 sont présent dans la levure Saccharomyces cerevisiae et participent à l'activation de la voie de conjugaison.

Ce processus de conjugaison consiste en la formation d'une cellule diploïde à partir de cellules haploïdes ayant des signes de conjugaison (ou des types sexuels) différents. Ces types cellulaires produisent une molécule signal (ou facteur) et un RCPG capable de reconnaître le type cellulaire opposé. Ainsi, les cellules du « type a » produisent un facteur a et possédent un récepteur à phéromone  $\alpha$  (ste2) tandis que le facteur  $\alpha$  et le récepteur à phéromone a (Ste3) sont présents dans les cellules de « type  $\alpha$  ».

La liaison de ces hormones peptidiques (ou facteurs de conjugaison) sur les récepteurs de la cellule du type opposée, entraı̂ne l'activation d'une voie MAP-kinase (Leberer et al. 1992) qui aboutit à la conjugaison de ces cellules et à la formation d'une cellule diploïde (appelé  $a/\alpha$ ). Ces cellules diploïdes possédent des propriétés distinctes puisqu'elles sont incapables de fusionner. Elles peuvent cependant former des spores lorsqu'elles sont en manque de nourriture ce qui conduit par méiose à la formation de cellules haploîdes.

# Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

La comparaison du nombre de structures 3D à haute résolution (obtenues par résonance nucléaire magnétique (NMR) ou par cristallographie au rayons X) disponibles pour les protéines solubles (>25,000) et membranaires (95) dans la base de données des protéines, reflète clairement les difficultés rencontrées avec les protéines membranaires (http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html).

La présence d'un environnement lipidique essentiel au maintien de leur conformation active, ainsi que leurs hauts poids moléculaires, complique considérablement la détermination de leurs structure 3D. Un autre obstacle à la détermination de la structure biologique des RCPG est leur comportement dynamique intrinsèque qui est caractéristique des protéines à hélices  $\alpha$  et qui est directement lié à leurs activités de transmission de signaux à travers la membrane biologique. Les deux techniques majeures disponibles pour obtenir des structures 3D à haute résolution (NMR et cristallographie à rayon X) nécessitent de grandes quantités de protéines purifiées (de l'ordre du milligramme).

A l'exception de quelques rares exemples tels que la rhodopsine bovine et le récepteur nicotinique à acétyl choline (nAChR) de Torpille (Stroud et al. 1985; Miyazawa et al. 2003), la plupart des RCPG sont naturellement peu exprimés, ce qui rend impossible toute tentative de purification directe à partir des sources naturelles. En effet, il a par exemple fallut utiliser 1000 cerveaux de cochon pour obtenir 190 μg de récepteur à neuropeptide Y2 pur afin de réaliser des études fonctionnelles (Wimalawansa et al. 1995). La surexpression hétérologue des RCPG est par conséquent une étape obligatoire et essentielle au développement d'une stratégie efficace.

Pour certains récepteurs, des modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour une expression fonctionnelle du RCPG. Ainsi, la glycosylation en Asn15 de la rhodopsine qui possède deux sites de glycosylation est essentielle à la stabilité de la conformation photoactivable metarhodopsine II qui permet le couplage à la protéine G transducine. Dans le cas du récepteur à peptide intestinal vasoactif de type 1, une modification par du carbohydrate sur deux sites parmi les quatre existants est nécessaire et suffisant pour assurer une localisation correcte du récepteur à la membrane plasmique lorsqu'il est exprimé dans des cellules de type COS (Couvineau et al. 1996).

La quantité nécessaire à l'obtention d'1mg de RCPG (en considérant un RCPG ayant un poids moléculaire moyen de 45kDa) dans cinq litres de culture est respectivement de 13,5 et 26 pmol / mg de protéines membranaires pour *E. coli*, la levure et les cellules eucaryotes supérieures (cellules d'insectes et de mammifères) ; (Sarramegna et al. 2003).

# I. Système d'expression procaryote : Escherichia coli

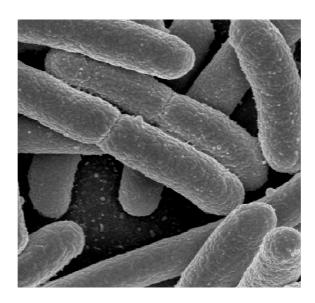


Figure 41 : Vue au microscope électronique d' E. coli.

Escherichia coli (figure 41) est l'un des organismes procaryotes les plus utilisés pour des manipulations génétiques et pour la production industrielle de protéines ayant un intérêt commercial ou thérapeutique. Son caractère procaryote le limite à la fois pour le repliement correct de certaines protéines et la réalisation de modifications post-traductionnelles. Ceci restreint par conséquent le type de protéine qui peut y être exprimé. Cependant, certaines protéines peuvent être produites sous forme insoluble dans des corps d'inclusions mais des étapes supplémentaires de solubilisation et de repliements sont alors nécessaires.

Les avantages majeurs de ce système d'expression sont son faible coût, l'homogénéité des protéines recombinantes produites (pas de modification post-traductionnelles), la capacité de fermentation à de hautes densités cellulaires et un temps de génération court (20 minutes) ainsi qu'un délai d'expression court (Grisshamer et al. 1995). Grâce à un niveau d'expression qui peut dépasser 50% des protéines cellulaires totales, la purification est généralement facile. Ce système possède une longue histoire avec une génétique bien caractérisée. De nombreux outils ont, par conséquent, été développés pour faciliter le clonage et l'expression des gènes. Ce système permet également de tester rapidement un grand nombre de séquences étiquettes ou de protéines fusion ayant un code génétique différent et d'optimiser ainsi les niveaux d'expression avant de débuter la purification (Grisshammer et al. 1993; Tucker et al. 1996).

E. coli est très approprié aux contraintes liées à la biologie structurale. Cependant ce système n'est pas le plus convenable en ce qui concerne l'étude fonctionnelle des récepteurs in vivo (mécanisme de transduction du signal), puisque les bactéries ne

contiennent pas de protéines G endogènes. Cette absence de protéine G peut être associée à l'absence de sites de haute affinité pour les agonistes. Cependant, il a été montré que l'ajout de protéines G purifiées aux membranes d' *E. coli* exprimant le récepteur 5HT1A permet la restauration de sites de haute affinité (Bertin et al. 1992). La co-expression de protéines G et de récepteurs aux opioides par fusion de gène, restaure également des sites de hautes affinités (Stanasila et al. 2000).

Il faut néanmoins noter que, dans certains cas, l'utilisation d'*E. Coli* peut-être un inconvénient pour le maintien de la fonctionnalité de certains RCPG. En effet, la fonctionnalité de certains récepteurs peut dépendre de la présence de modifications post-traductionnelles. Ces modifications telles que la glycosylation, l'acetylation, l'amidation et la phosphorylation sont souvent nécessaires aux protéines de mammifères. La phosphorylation de la rhodopsine, par exemple, permet d'augmenter la proportion d'état MII qui active la protéine G.

D'autre part, la composition lipidique des membranes d' *E. coli* est très différente de celle des cellules eucaryotes ce qui peut affecter grandement les propriétés de liaison des RCPG. L'activité de certains RCPG tels que l'oxytocine, la transferrine, et le récepteur opioide mu dépendent fortement de l'environnement lipidique de la protéine.

L'environnement réducteur du cytoplasme de la bactérie peut considérablement diminuer la production de protéines membranaires particulièrement si le repliement correct du récepteur en une conformation active nécessite la formation de ponts disulfures. La fusion de protéines membranaires périplasmiques d' *E. Coli* telles que la protéine liant le maltose (Maltose binding protein MBP) au RCPG d'intérêt peut permettre de dépasser ce problème en dirigeant le récepteur recombinant dans l'environnement périplasmique oxydatif (Di Guan et al. 1988).

E. Coli peut également être utilisé pour la production de protéines hétérologues dans des corps d'inclusions (Kiefer et al. 1996). Ces structures contiennent principalement la protéine exogène d'intérêt (qui est souvent pure à 80%) et sont purifiables très facilement. Cette stratégie peut être très attractif. De plus, l'accumulation des protéines recombinantes dans ces corps d'inclusions les protége des dégradations protéolytiques par les protéases cytosoliques, membranaires et périplasmiques. Cependant, bien que certains facteurs, tels que la modulation de la température, favorisent l'apparition de ces corps d'inclusions, leur formation reste difficile à contrôler. Les protéines accumulées dans ces structures sont généralement inactives et un repliement fonctionnel après purification est ensuite nécessaire. Cette approche qui a déjà été employée pour des protéines solubles, l'a été beaucoup plus rarement pour des protéines membranaires (Kiefer et al. 1999).

Le récepteur  $\beta 2$  adrénergique est le premier RCPG à avoir été exprimé dans la bactérie en étant fusionné dans sa partie N-terminal aux 279 premiers résidus de la  $\beta$ -galactosidase, qui est une protéine cytosolique naturellement exprimée dans  $E.\ coli.$  (Marullo et al. 1988). De nombreuses tentatives pour améliorer le niveau d'expression initial ont été réalisées en changeant le promoteur et en fusionnant le récepteur à différents partenaires. La fusion du récepteur avec des protéines appartenant à la membrane interne ou externe de  $E.\ coli$  telle que MBP (Hampe et al., 2000) ou la protéine LamB (Marullo et al., 1988 ; Chapot et al., 1990 ; Emorine et al., 1989) a permis d'augmenter jusqu'à 10 fois l'expression initiale. Une amélioration identique a été obtenue en l'absence de protéines fusions mais en présence d'un promoteur inductible à l'IPTG (isopropyl1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside) (Breyer et al., 1990). Par conséquent, l'adressage correct de RCPG vers la membrane d' $E.\ coli$  n'est pas nécessairement lié à la fusion à une protéine bactérienne membranaire. Bien que, la fusion du récepteur à neurotensine à la protéine MBP a permis d'augmenter de 40 fois son niveau d'expression (Grisshammer et al., 1993). Cela suggère, par conséquent, un effet récepteur dépendant.

Les niveaux d'expressions observés chez *E. Coli* varient entre 0,2 et 15 pmol/mg (15-450 sites par cellules) quelque soit la stratégie employée (tableau 6), ce qui n'est pas très élevé.

Des différences d'expression ont été observées entre différents récepteurs d'une même famille. Par exemple, le récepteur β1 adrénergique présente une expression quatre fois plus faible que le récepteur β2adrenergique. L'observation de telles différences peut être expliquée par la présence dans certaines séquences de codons qui sont rarement utilisés par *E. Coli* et qui peuvent pas conséquent ne pas être ou être mal exprimés. Ainsi le récepteur à leukotriene B4 (LTB4) a été surexprimé dans *E. Coli* après un remplacement de l'ensemble des codons rares initialement présents (ce qui a permis une purification de 2 à 3 mg de récepteurs purs par litre de culture) (Baneres et al. 2003).

De plus, différentes populations de récepteurs ayant une forte et basse affinité ont été mis en évidence lors d'expression hétérologue dans *E. Coli.* Ce fût, ainsi, le cas du récepteur à neurokinine NK2. L'hypothèse qui a alors été proposée consiste à la formation de deux différentes conformations lors de l'insertion du récepteur dans la membrane (Grisshammer et al. 1994).

Lors de la réalisation de corps d'inclusion Kiefer et al. ont montré que la présence de résidus chargés positivement dans la boucle 1 intracellulaire permettrait de prévenir l'insertion du récepteur olfactif OR5 dans la membrane. En effet, si la protéine exprimée est toxique pour la bactérie, son insertion dans la membrane peut limiter son expression (Kieffer et al. 1996). Les études réalisées par Kiefer et Banéres (Banéres et al. 2003) sur

l'expression des RCPG dans les corps d'inclusion sont allées jusqu'à l'étape de reconstitution fonctionnelle. Ainsi même si la reconstitution de tous les RCPG n'est pas possible cela reste très prometteur.

Récepteur	Origine	Protéine fusion	Localisation du récepteur	Expression	Tags	Référence	
ß2-Adrenergique	humaine	MBP	M	6 pmol/mg	6-his Ct	Hampe W et al.2000	
ß1-Adrenergique	humaine	LamB	М	1 pmol/mg		Chapot M et al. 1990	
Serotonin 5HT1A	humaine	MBP	M	0,6 pmol/mg (120 sites/ celll)		Bertin B et al. 1992	
5-HT4	mouse	Ketosteroid isomerase	CI	5-8 mg/L	6-his Ct	Baneres J et al. 2005	
Endothelin ETB	humaine		M	0,2 pmol/mg (41sites/cell.)		Haendler B et al., 1993	
Neurotensine	rat	MBP	М	15 pmol/mg	c-myc / 5-his Ct	Grisshamer R et al. 1993	
Neurokinine NK2	rat	MBP	М	7,2 pmol/mg	C-myc/ 5-his Ct	Grisshamer R et al. 1994	
Adenosine A1	human	PhoA	М	0,4 pmol/mg	c-myc Nt	Lacatena R et al. 1994	
Neuropeptide Y1	human	MBP	М	3,5 pmol/mg	FLAG et 6-his Ct	Munch G et al. 1995	
Olfactive OR5		GST	CI		6-his Ct	Kiefer H et al. 1996	
Adenosine A2a	human	MBP	М	13,7 nmol/mg	10-hist et Flag Ct	Weiss H et al. 2002	
Vasopressin V2	human	PhoA/-gal	М			Schulein R et al. 1996	
Opioid $\mu$ , $\delta$ , $\kappa$	human	MBP	М	0,5 pmol/mg		Stanasila L et al. 1999	
M2 mAch	human	MBP	М	6 pmol/mg		Furukawa H et al. 2000	
TSH	human	ND	ND	2,5 mg / L	6-his Ct	Busuttil B et al. 2001	

Tableau 6 : (inspiré de Sarramegna et al. 2003) Expression de RCPG dans E. Coli

MBPou MalE : Protéine liant le maltose et présente dans la membrane interne d'*E. Coli*. LamB : La protéine LamB est une protéine de la membrane externe d'*E. Coli*.

PhoA: Phosphatase alkaline, protéine localisée dans le cytoplasme de la bactérie. GST: Glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum*. ND: non déterminé. Tous les promoteurs sont inductibles à l'IPTG, Nt: N-terminal; Ct: C-terminal;5-his, 6-his, et 10-his: étiquettes penta-, hexa-, et decahistidines, Bio: étiquette de biotynilation, M: membrane, CI: corps d'inclusion, TSH: hormone stimulant la thyroide (Thyroid-stimulating hormone), mACh: muscarinique cholinergique. Les caractères en gras représentent les niveaux d'expression permettant d'obtenir au minimum 1mg (ou plus) de protéines recombinantes dans 5L de milieu de culture (le niveau d'expression minimum déterminé pour E. Coli est de 13 pmol/mg). Les caractères en bleu représentent les expressions réalisées en corps d'inclusion.

# II. Les systèmes d'expressions eucaryotes

On peut facilement remarquer que de bons résultats proviennent souvent de l'expression de protéines membranaires procaryotiques dans un système d'expression procaryote tel que *E. Coli* par exemple (Loll et al. 2003; Bannwarth et al. 2003). Cependant, lorsque l'on produit une protéine membranaire eucaryote dans un système procaryote les rendements sont souvent beaucoup moins bons. L'utilisation d'un système eucaryote semble donc être un choix intéressant pour la surexpression de protéines membranaires eucaryotes (Grisshammmer et al. 1995).

Les systèmes d'expressions eucaryotes prédominants comprennent les levures, les cellules d'insectes et les cellules de mammifères.

#### 1. Les cellules de mammifères

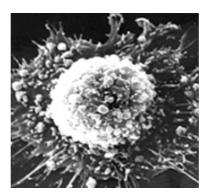


Figure 42 : Cellule CHO adhérente.

Les principaux avantages de ces systèmes d'expressions sont liés au fait que les cellules représentent un environnement proche de celui des tissus natifs des RCPG. Ces cellules sont capables de réaliser des modifications post-traductionnelles complexes et ont une composition lipidique proche de celle de l'environnement natif des RCPG. Elles peuvent également fournir des protéines G capables d'interagir avec les récepteurs produits et des effecteurs secondaires pour l'étude de la transduction du signal. Ainsi, les cellules de mammifères (figure 42) sont parfaites pour des études fonctionnelles nécessitant des RCPG fonctionnels qui ne soient pas pour autant exprimés en grandes quantités.

L'expression des RCPG dans les cellules de mammifères peut se faire d'une manière stable ou transitoire. Dans le cas d'une expression stable, les cellules poussent sous des conditions restrictives grâce à l'utilisation de marqueurs de sélection co-transfectés avec l'ADN recombinant. L'ADN recombinant peut soit être intégré dans le génome de la cellule hôte en utilisant un vecteur approprié soit ne pas y être intégré dans le cas de l'utilisation

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

d'un vecteur capable d'une réplication épisomale. Dans ce dernier cas, le gène d'intérêt est inséré prés d'un gène codant pour la réductase dihydrofolate ou la glutamine synthétase et il peut alors être amplifié. La sélection de clone ayant des événements d'insertion multiple peut être réalisé en utilisant une forte pression de sélection (de forte concentration d'antibiotique, par exemple). Quelle que soit la stratégie employée la génération d'une lignée cellulaire stable surexprimant un RCPG est longue (quelques mois).

Dans le cas d'une expression transitoire, les cellules peuvent être transfectées par le gène d'intérêt soit par l'intermédiaire d'un plasmide ou d'un virus recombinant. De nombreux virus peuvent être utilisé tel que celui de la vaccine ou le virus de la forêt de Semliki par exemple. Même si l'infection de ces cellules en utilisant ces virus est très efficace, les cellules meurent quelques jours après.

De grand nombre de RCPG ont été exprimés dans des cellules de mammifère, mais ce système d'expression a été principalement utilisé pour étudier les résidus intervenant dans la liaison du ligand, et les structures possibles correspondant au site actif du récepteur en associant une expression transitoire et des expériences de mutagenèse (Strader et al. 1994). Ces cellules ont été particulièrement utilisées durant l'étape de clonage respectif des différents RCPG ainsi que dans le cas de récepteur mutant ou chimérique ou pour l'étude du mécanisme d'internalisation ou d'oligomérisation.

#### 2. Cellules de mammifère infectées par SFV

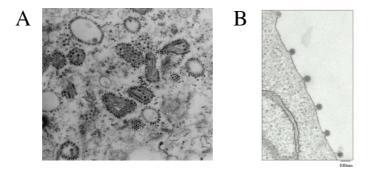


Figure 43 :(A) Vue au microscope électronique de cellules infectées par SFV (B) Image en microscopie électronique d'une section fine de cellule animale à partir de laquelle bourgeonnent plusieurs particules virales enveloppées (virus de la forêt de Semliki). (A)Observation de particules et de différents stades de la réplication virale.

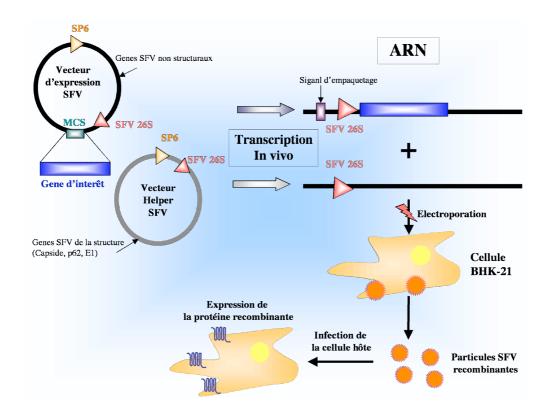


Figure 44 : (Lundstrom et al. 2003) Ilustration schématique de la production de particules SFV recombinantes.

L'ARN recombinant et helper sont transcrits in vitro à partir du plasmide d'ADN correspondant linéarisé. Les cellules BHK sont co-electroporées et les particules recombinantes SFV sont récoltées. Les particules générées peuvent être utilisées pour infecter des lignées cellulaires variées pour produire la protéine recombinante.

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

Le système d'expression dérivé du virus de la forêt de Semliki (figure 43) est un système d'expression très efficace, facile à utiliser et qui a un large spectre d'hôtes. Ce système basé sur un réplicon du SFV consiste en une molécule d'ARN autorépliquante capable d'autotranscription et qui utilise seulement la machinerie traductionnelle de la cellule hôte.

Le SFV a été initialement isolé en 1944, à partir de moustiques. L'alpha virus SFV est un petit virus enveloppé (70nm) à génome ARN simple brin de polarité positive et de 11,7 kilobase. Il peut se répliquer dans toutes les cellules animales.

Lors de l'infection, l'enveloppe virale permet l'entrée du virion dans la cellule cible. Le captage de la particule virale s'effectue par un processus dépendant de l'endocytose du récepteur. A l'intérieur des endosomes le milieu acide induit la fusion des membranes virales et endosomales. Le résultat est un relarguage de la nucléocapside et du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. Après libération de l'ADN simple brin dans le cytoplasme, le cycle viral commence (figure 44).

Les particules virales (ou virions) sont formées à la membrane plasmique (figure 43) et s'accumulent dans le fluide extracellulaire à de forte concentration. Les virions sont relativement stables et peuvent être conservés à –70°C pour des périodes prolongées sans perte de leurs infectivités. Le génome d'ARN porte sa propre réplicase et peut commencer de lui-même une nouvelle infection, lorsqu'il pénètre dans une nouvelle cellule hôte. L'infection par SFV supprime la traduction de ARNm de l'hôte tout en maintenant une forte expression de ses propres protéines structurales.

Afin de transformer SFV en un système d'expression une copie du cDNA du génome est placée sous le contrôle du promoteur SP6. La seconde étape consiste à créer un plasmide d'expression en remplaçant le gène codant pour des protéines virales structurales par un site de clonage multiple où le gène codant pour la protéine hétérologue peut y être inséré. Puis, ce plasmide contenant le gène étranger peut-être utilisé pour la production in vitro de transcrits SFV qui initieront leurs réplications lors de leurs introductions dans des cellules animales. Les protéines de la structure sont fournies par un vecteur « helper » contenant les gènes codant pour les protéines de la capside et de l'enveloppe. Puis les transcrits obtenus in vitro de l'ARN recombinant et de l'ARN helper sont cotransfectés dans les cellules BHK21. Cela génère un fort titre de particules SFV recombinantes. Ces particules sont capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires mammifères et autres (amphibien, reptilien, insecte, ...). Cependant, puisque le signal ARN d'empaquetage n'est présent que sur l'ARN recombinant, aucun ARN helper ne sera empaqueté, ce qui rend les particules générées incapables de se répliquer. Après infection de la cellule hôte une expression rapide et forte du transgène est obtenue à partir de vecteurs SFV sans que cela ne génère des virus. L'avantage de ce système est de pouvoir réaliser des études d'expression sur de nombreuses lignées cellulaires en parallèle. L'adaptation de la technologie de SFV à des cultures de cellules de mammifères en suspension a permis de grandement faciliter la production de grandes quantités de protéines recombinantes (Lundstrom et Michel. 1997).

Récepteur	Origine	Type cellulaire	Niveau d'expression	Référence
α1B-Adrenergique	ND	COS-7/CHO BHK	4-5 pmol/mg 24 pmol/mg	Scheer et al. 1999
Histamine H2	rat	COS-7	50 pmol/mg	Hoffmann et al. 2001
Endotheline A, B	humain	BHK/ COS	20 pmol/mg	Cramer et al. 2001
Neurokinin 1 NK1	humain	ВНК	40 pmol/mg	Lundstrom et al. 1994
Glutamate mGlu2,3	rat	CHO	0,5 pmol/mg	Schweitzer et al. 2000
Glutamate R8	humain	CHO	10-13 pmol/mg	Malherbe et al. 1999
Olfactive OR 17-40	Humain/rat	HEK-293	ND	Hatt et al. 2001

Tableau 7 : (Sarramegna et al. 2003) Expression de RCPG sur des cellules de mammifères infectés par le virus de la forêt de Semliki.

CHO: cellules d' ovaire d'hamster chinois (Chinese hamster ovary); HEK: cellules d'embryon de rein humain (Human embryonic Kidney); BHK: cellules de rein de petit d'hamster (baby hamster kidney); COS: cellules de singes d'Afrique. Les caractères en gras correspondent aux RCPG pour lesquels la surexpression est supérieure à 26 pmol/mg.

L'expression de différents RCPG par l'intermédiaire de vecteur SFV a donné de bons résultats (tableau 7). Cependant, cette forte expression reste liée à la possibilité que l'ensemble des récepteurs ne soit pas exprimé à la membrane plasmique. Ceci a été confirmé par des études de localisation des récepteurs olfactifs étiquetés qui ont montré que tous les récepteurs n'étaient pas localisés à la membrane plasmique. Des résultats similaires ont été observés sur le récepteur à neurokinine NK1 fusionné à un site de biotinylation en Cterminal. Le choix de la cellule hôte joue un rôle important. En effet, aucune expression n'a pu être détectée pour le récepteur olfactif dans la membrane plasmique des cellules BHK alors qu'une forte expression du récepteur a été observée dans la lignée cellulaire épithéliale olfactive OLF442 (Lundstrom et al. 2003). Le niveau d'expression peut également varier en fonction du temps de post-infection. Ainsi, l'expression du récepteur humain à neurokinine 1 dans les cellules de CHO présentait une expression maximale après 10h de post-infection (Lundstrom et al. 1994). Par contre, les cellules de BHK infectées avec un vecteur portant le gène du récepteur adrénergique α1b de hamster présentait un pic d'expression après 30 h de post-infection (Scheer et al. 1999). Une faible affinité à également été décrite et semble être due à l'inhibition, induite par SFV, de la synthèse des protéines de la cellule hôte. Ansi le ratio défavorable de la protéine exogéne et de la protéine G endogène est dûe à la surexpression du récepteur ainsi qu'à l'inhibition de la synthèse des protéines G endogènes. La quantité limitée de protéines G endogènes peut-être compensée par une co-expression médiée par SFV de sous unité de protéine G (Scheer et al. 1999). L'amélioration de la capacité d'expression du récepteur par le vecteur SFV a été réalisée en fusionnant la construction au gène de la capside de SFV. Il a en effet été montré que la région terminal 5' des gènes de la capside contient un signal permettant d'améliorer la traduction, ce qui peut augmenter le niveau d'expression de 5 à 10 fois (Sjöberg. 1994). Il a également été montré lors de la fusion de la séquence entière du gène de la capside au transgène, que la protéine recombinante était efficacement clivée grâce à l'activité de clivage autocatalytique de la protéine capside. Une telle fusion réalisée sur le récepteur humain à neurokinine NK1 apporta une amélioration du rendement d'environ 5 fois par rapport au récepteur hNK1 ne possédant pas de gène de la capside (Lundstrom. 1995).

#### 3. Le système d'expression levure

De nombreuses lignées différentes de levures sont utilisées pour la production de protéines recombinantes (Cregg et al. 2000; Porro et al. 2004). Hansenula polymorpha, Klyveromyces lactis, Pichia methanolica, Candida maltosa ou Yarrowia lipolytica ont été utilisées pour la production de protéines solubles recombinantes, mais seulement trois levures ont été utilisées pour l'expression hétérologue de protéines membranaires. Il s'agit de Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe et Pichia pastoris. Saccharomyces cerevisiae est le système le plus étudié et le mieux connu génétiquement et physiologiquement.

La levure a l'avantage d'avoir un temps de génération court (2h). Elle pousse dans des milieux très simples et sa manipulation est aisée et peu coûteuse. De plus, l'expérience développée par les industries dans le domaine de la fermentation facilite la production à haut débit.

De nombreux vecteurs sont disponibles pour l'expression de gènes hétérologues. Ces vecteurs peuvent être maintenus sous forme épisomale ou intégrés dans le génome de la levure sélectionnée. Dans la levure, des promoteurs forts ont été identifiés et peuvent être soit constitutif soit inductible, tel que pPGK1 (constitutif) et pGAL1 (inductible au galactose) dans *S. cerevisiae*, ou pAOX1 (inductible au méthanol) dans *Pichia pastoris*. Contrairement aux bactéries, la levure possède des RCPG et des protéines G endogènes. La nature eucaryote de ces organismes leur confère la capacité de réaliser des modifications post traductionnelles qui sont quelques fois essentielles à la fonctionnalité de la protéine. Néanmoins, la composition et la quantité de N-glycans ajoutés par les levures sont

différentes de celles des cellules de mammifères. Cela peut devenir problématique lorsque des structures précises d'oligosaccharides sont essentielles à la fonctionnalité des RCPG.

La composition lipidique des membranes des levures est également différente de celle des mammifères. Ainsi la levure ne synthétise pas de cholestérol comme les cellules de mammifères mais de l'ergostérol et cette différence a quelquefois créé des problèmes de fonctionnalité pour certains RCPG (Lagane et al. 2000). Finalement, la levure est entourée d'une paroi cellulaire qui doit être rompue pour extraire les membranes et les protéines intracellulaires par lyse mécanique (en utilisant des billes de verres par exemple) ou enzymatique (telle que la zymolyase).

Le système d'expression de la levure a génèralement été exploité pour la production de RCPG (Reilander et al. 1998) (tableau 8, page 103).

#### 3.1. Saccharomyces cerevisiae

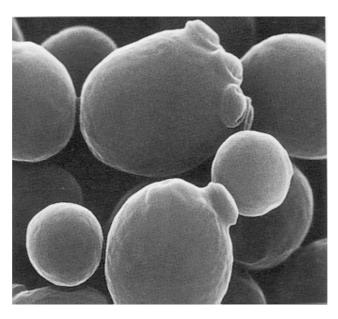


Figure 45 : Levures bourgeonnantes S. cerevisiae en microscopie électronique

C'est certainement le modèle eucaryote le plus étudié. C'est le premier génome eucaryote à avoir été séquencé (Goffeau et al. 1996). S. cerevisiae (figure 45) possède de nombreux avantages tels qu'une vitesse de croissance rapide (90 min), une facilité d'utilisation, une caractérisation et isolation de mutant rapide, ainsi qu'un système génétique bien défini. En plus de la lignée haploïde S288C séquencée en 1996, de nombreuses autres souches ayant différents marqueurs génétiques sont actuellement disponibles.

Les promoteurs les plus couramment employés pour la production de protéines recombinantes sont ceux qui sont inductibles par le galactose tel que pGAL1 et pGAL10.

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

On a très rapidement conclu que la fusion d'une séquence signal de levure en N-terminal du récepteur favorise son insertion dans la membrane. Parmi les séquences signal les plus utilisées, on trouve celle du prepropeptide  $\alpha$ -mating factor qui est un facteur de croisement sexuel excrété par *S. cerevisiae* et qui se fixe au récepteur Ste2. La région N-terminal du Ste2 peut également être utilisée comme une séquence signal.

Les premières tentatives d'expression de RCPG dans cette levure concernent les récepteurs β1 adrénergiques et muscariniques M1 (King et al. 1990; Payette et al. 1990). Le récepteur muscarinique M1 peut fixer de nombreux ligands spécifiques, mais il présente un niveau d'expression très faible (20 fmol/mg). Ce résultat est en accord avec ceux qui sont décrits par Erlenbach qui a obtenu des rendements de production d'environ 5 fmol/mg, pour les récepteurs muscariniques M1, M3 et M5 (Erlenbach et al. 2001). Une délétion de la partie centrale de la troisième boucle intracellulaire entraîna pour les trois récepteurs une amélioration du rendement de 10 à 40 fois (5 fmol/mg pour les formes sauvages et de 53 à 214 fmol/mg pour les récepteurs délétés). Par contre le récepteur β2 adrénergique est très fortement exprimé (115 pmol/mg). Ce dernier résultat a été obtenu dans certaines conditions. En effet, la région N-terminal du gène du récepteur β2 adrénergique a été remplacée par les 14 premiers acides aminés du récepteur Ste2, le promoteur fort GAL1 a été utilisé avec la co-expression de son transactivateur transcriptionnel (LAC9) et enfin. l'induction de ce récepteur a été réalisée en présence d'un antagoniste dans le but de stabiliser la structure de ce récepteur. Dans cette étude, la liaison du récepteur à la protéine Gas (coexprimée) a été démontrée. Cependant, l'utilisation d'une stratégie identique pour le récepteur dopaminergique D2S n'aboutit qu'à une faible expression (1 à 2 pmol/mg) (Sander et al 1994). Ces résultats mettent en relief le comportement spécifique de chaque RCPG et le problème lié à la transposition d'une stratégie sur plusieurs récepteurs.

De plus, le passage de la culture optimisée à la fermentation peut également entraı̂ner des modifications du niveau d'expression. Ainsi, le récepteur  $\beta 2$  AR a une expression de 115 pmol/mg après une culture en erlen, mais la transposition en fermentation ramène l'expression à 36 pmol/mg (Sizmann et al. 1996). Dans cette étude, un milieu sans glucose a été utilisé, le pH a été maintenu entre 7,2 et 7,5 et un antagoniste a été ajouté dans le milieu d'induction. Ces mêmes conditions transposées au récepteur  $\alpha$  2-C2 adrénergique fusionné en C terminal avec une étiquette 10-histidines ont permis d'obtenir des valeurs variant entre 7 et 70 pmol/mg en fonction des conditions testées (Sizmann et al. 1996).

Le récepteur VPAC1 a été produit en grande quantité dans S. cerevisiae (Hansen et al. 1999). Le récepteur a été fusionné à la séquence signal du facteur  $\alpha$  et a été cloné en aval du promoteur inductible par le galactose (CYCGAL). La lignée utilisée etait déficiente

en protéase. Les clones alors obtenus possédaient plus de 200 copies du vecteur. Puis des optimisations de l'induction ont été réalisées en utilisant un milieu minimum enrichi en acides aminés et en faisant passer la température de 30 à 15°C. Cela a permis d'obtenir un rendement de production d'environ 66 pmol/mg. Mais comme cela a été montré pour d'autres récepteurs exprimés dans la levure, le profil pharmacologique est resté similaire à celui du récepteur sauvage bien que l'affinité pour les ligands testés soit plus faible.

Le récepteur de souris 5HT5 (Bach et al. 1996) a été exprimé dans S. cerevisiae. Sa construction a été fusionnée en N-terminal à la séquence signal de la (1-3 ,1-4)  $\beta$ -glucanase de Bacillus macerans et en N-terminal à l'étiquette myc pour permettre son immunodétection. Le récepteur a été cloné sous le contrôle du promoteur de l'endopeptidase vacuolaire (pPRB1) qui est induit lors d'une déficience en glucose du milieu. La lignée de levure qui a été utilisée est déficiente en protéase. Les études ont révélé la production d'environ 16 pmol/mg. Le rendement de production de récepteur fonctionnel a pu être doublé à la suite d'un choc thermique ce qui a eu également pour conséquence d'améliorer l'affinité du récepteur.

Le meilleur niveau de production obtenu pour un RCPG chez *S. cerevisiae* concerne le récepteur Ste2p (David et al. 1997). Le récepteur fusionné à l'étiquette FLAG et 6 Histidine a été produit à plus de 350 pmol/mg dans une lignée déficiente en protéase. 1mg de récepteur purifiés a été obtenus à partir de 60g de cellules de levures. La reconstitution du récepteur purifié dans des vésicules de phospholipides (avec un rapport de 3:2 de POCP:POPG) était nécessaire pour permettre la mesure d'une fonctionnalité. Cependant, seulement 6 % de la fonctionnalité attendue a pu être observé par fixation de ligand à l'équilibre. L'ajout dans les vésicules de membrane de levures solubilisées (n'exprimant pas le récepteur Ste2) améliora la fonctionnalité. Cela suggère, par conséquent, que d'autres lipides que le POPC et POPG sont importants à la fonctionnalité du récepteur. Il faut noter que ce cas particulier de forte expression concerne une expression homologue.

Il a été aussi observé que les récepteurs recombinants pouvaient ne pas être convenablement couplés aux protéines G de la levure. Ce phénomène peut-être expliqué par la différence existant entre les protéines G des levures et des eucaryotes supérieurs.

#### 3.2 Schizosaccharomyces pombe



**Figure 46 : Schizosaccharomyces pombe**Cellule eucaryote simple qui se divise par une fission médiale, ce qui la distingue de la levure bourgeonnante *S. cerevisiae.* 

S. pombe (figure 46) a été initialement utilisée pour exprimer la bactériorhodopsine (Hildebrant et al. 1989; Hildebrant et al. 1993). Elle a permis d'exprimer quelques RCPG en utilisant généralement un promoteur fort, appelé pNMT1 qui est réprimé par la thiamine. Un des premiers RCPG à avoir été exprimé dans S. pombe est une forme courte du récepteur dopaminergique D2 (D2s), placé sous le contrôle du promoteur pNMT1 et fusionné en N-terminal à une partie du récepteur Ste2 (Sander P. et al., 1994). Ce récepteur recombinant présente le même profil pharmacologique que le récepteur dopaminergique D2s mais avec une faible affinité suggérant une absence de couplage avec la proteine G endogéne de la levure. L'expression de ce récepteur a été améliorée jusqu'à 7 fois en passant de S. cerevisiae à S. pombe et en utilisant un promoteur fort dans les deux cas nommé respectivement pGAL1 et pNMT1. L'expression de la forme longue du récepteur dopaminergique D2 (D2L) dans S. pombe a été réalisé sous le contrôle du promoteur pNMT1. Le niveau d'expression qui a ainsi été obtenu était d'environ 1 pmol/mg avec une faible affinité indiquant que le récepteur ne se couple pas à la protéine G endogène de S. pombe (Presland et al. 1998).

Le récepteur NK2 s'exprime faiblement à 1,2 pmol/mg lorsqu'il est fusionné à la séquence signal de l'acide phosphatase Phol (protéine de levure localisée à la surface cellulaire). Cependant, aucun récepteur fonctionnel n'est détecté en l'absence de cette séquence signal (Arkinstall et al. 1995). Cette séquence permet de cibler la protéine à la surface membranaire.

Le récepteur β2 adrénergique a également été exprimé dans cette levure. Le niveau d'expression du récepteur β2 adrénergique a été d'améliorer grâce à l'utilisation d'une construction où les 14 premiers acides aminés du récepteur β2 adrénergique ont été remplacés par la séquence correspondante présente sur le géne STE2 (Ficca et al. 1995). De plus, l'ajout d'un antagoniste (alprenolol) dans le milieu de culture a permis d'augmenter le rendement et d'obtenir environ 7,5 pmol/mg de protéines membranaires.

### 3.3 Pichia pastoris



Figure 47 : (Grunewald et al. 2004) Observation au microscope électronique de la morphologie de *Pichia pastoris* (SMD1163). V : vacuole.

C'est en1969 que Kiochi Ogata a décrit la capacité de certaines levures à utiliser le méthanol comme source de carbone (Ogata et al. 1969). Les levures methylotrophes tel que *P. pastoris* (figure 47), *Hansenula polymorpha* et *Candida boidinii* ont été utilisées pendant de nombreuses années pour la production de protéines recombinantes (Faber et al. 1995).

La particularité de ces levures réside dans leur capacité à utiliser le méthanol comme source de carbone. Ainsi le méthanol joue un rôle central dans le métabolisme de ces levures et les enzymes clés impliquées dans l'assimilation du méthanol sont fortement exprimées dans ces levures et peuvent représenter jusqu'à 80% des protéines totales. Ainsi l'utilisation du promoteur fort et inductible par le méthanol qui contrôle l'expression de ces enzymes a permis la production d'un grand nombre de protéines recombinantes. Ces levures sont très intéressantes car elles poussent rapidement, peuvent atteindre de fortes densités cellulaires en fermentation (Cereghino al. 2002), et n'entraînent pas de phénomène d'hyperglycosylation.

La compagnie de pétrole BP, durant les années 1970, a été la première à développer les milieux et les protocoles de croissance de *P. pastoris* en présence de méthanol en culture continue et à de fortes densités cellulaires (Cereghino et al. 2000; Wegner et al. 1990). Puis, cette compagnie s'associa à l'institut de biotechnologie Salk (SIBIA, La Jolla, CA) pour faire de la levure *P. pastoris* un système d'expression hétérologue.

La levure *Pichia pastoris* est particulièrement intéressante pour l'expression hétérologue puisqu'elle permet des manipulations génétiques aisées telles que l'intégration ciblée de gène, le clonage par complémentation fonctionnelle, l'expression de protéines de manière intra et extracellulaires. Elle possède également une machinerie d'excrétion très

efficace et une simple purification des protéines recombinantes sécrétées est possible grâce aux faibles taux de protéines natives excrétées (Cregg et al. 1985). *P. pastoris* est également capable de réaliser des modifications postraductionnelles telles que la glycosylation (figure 50), la formation de ponts disulfures et le clivage protéolytique (Reilander et al. 1998). Par conséquent, les techniques génétiques disponibles ainsi que l'économie liée à l'utilisation de cette levure font de *P. pastoris* un système de choix pour l'expression de protéines hétérologues.

De nombreuses protéines solubles ont été produites dans la levure *Pichia pastoris* avec des niveaux d'expression supérieurs à plusieurs grammes de protéines recombinantes solubles par litre de culture (Lin-Cereghino et al. 2000; Sreekrishna et al. 1997). Grâce à ces caractéristiques, des RCPG n'étant pas efficacement exprimés dans les bactéries, *S. cerevisiae* ou les cellules d'insectes infectées par baculovirus, ont été efficacement produits dans une forme active dans la levure *Pichia pastoris* (Cereghino et al. 2000; Cereghino et al. 2002).

Il n'y a actuellement qu'un petit nombre de RCPG qui ait été exprimé dans *Pichia pastoris*. Pour cela, le promoteur fort de l'alcool oxydase I inductible par le méthanol (pAOXI) est placé en amont du gène (Cregg et al. 1993). Il n'existe pour cette levure que des vecteurs pouvant s'intégrer dans le génome de la levure, ce qui garantie une expression stable (figure 48, 49). Les niveaux d'expression des RCPG dans cette levure varient de 0,3 à 100 pmol/mg.



Figure 48 : (Daly et al. 2005) Exemple d'un vecteur d'expression de la levure *P. pastoris* : le vecteur pPIC9K.

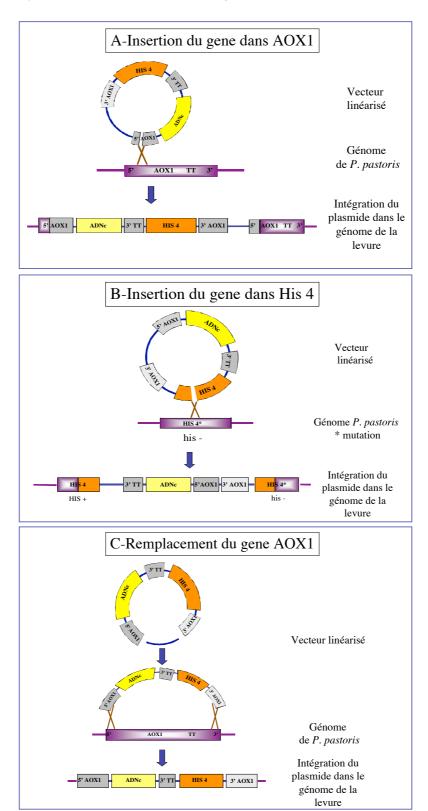


Figure 49: Intégration dans le génome de *Pichia pastoris* par insertion dans un gène ou par remplacement d'un gène. A, Le vecteur d'expression est linéarisé au niveau de la région 5' AOX1 et intégré de manière ciblée au niveau du promoteur AOX1 du génome de la levure par l'intérmédiaire d'un évènement de recombinaison homologue. B, Le vecteur d'expression est linéarisé au niveau du géne HIS4 et intégré de manière ciblée au niveau du gène HIS4 du génome de la levure par l'intérmédiaire d'un évènement de recombinaison homologue. C, Le vecteur d'expression est digéré en amont de la région 5'AOX1 et en aval de la région 3' AOX1. Le fragment de vecteur contenant l'ADNc va par l'intermédiaire de deux évènements de recombinaison homologue remplacer le géne AOX1 du génome de la levure.

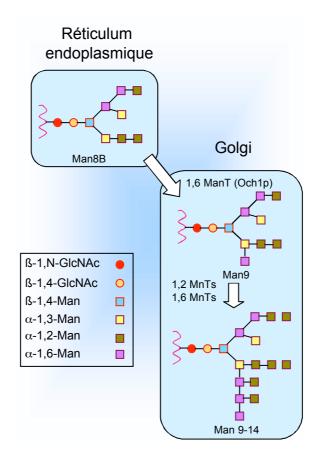


Figure 50 : (Gerngross et al. 2004) Voie de glycosylation de la levure. MnT, Mannosyltransferase ; Man, Mannose.

Le récepteur de souris 5HT5 a été le premier récepteur à être exprimé dans *Pichia pastoris* avec un niveau d'expression d'environ 22 pmol/mg (Weiss et al. 1995), ce qui est supérieur aux résultats obtenus avec *S. cerevisiae* (16 pmol/mg). Dans cette étude, deux types de protéines de fusion ont été utilisées avec deux séquences signal différentes. L'une des constructions contient le peptide signal de l'acide phosphatase (Pho1) de *P. pastoris*, l'autre contient le pré-propeptide du facteur de croisement α (ppαMF) de *S. cerevisiae*. Les meilleurs résultats ont été atteints en utilisant la séquence signal ppαMF dans une lignée de levure déficiente pour deux protéases : SMD1163. La sélection des clones présentant de nombreuses copies du vecteur d'expression insérées dans le génome et l'ajout de ligand dans le milieu d'induction a permis d'atteindre un niveau d'expression de 40 pmol/mg.

Les résultats concernant la séquence signal du facteur  $\alpha$  ont été confirmés sur le récepteur humain à dopamine D2 (Grunewald et al. 2004) où la fusion de la séquence signal du facteur  $\alpha$  a permis d'augmenter de plus de 20 fois le niveau d'expression.

La séquence signal du facteur  $\alpha$  de *S. cerevisiae* est un pré-propeptide qui est clivé de la fusion protéique par une peptidase signal durant le transport dans le réticulum endoplasmique. La pro-séquence restante doit ensuite être clivée par la protéase Kex2 localisée dans le golgi tardif (Julius et al. 1984).

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

Cependant, il a été montré pour de nombreux récepteurs tels que le récepteur de souris 5HT5 (Weiss et al. 1995), le récepteur D2 humain (Grunewald et al. 2004), le récepteur adrénergique β2 humain (Weiss et al. 1998), le récepteur à endothéline B humain (Schiller et al. 2000) et le récepteur à cannabinoïde CB2 (Feng et al. 2002) que le clivage de la séquence signal par la protéase Kex2 n'avait pas lieu. Il a été montré pour certains récepteurs que la délétion de sites putatifs de N-glycosylation localisés dans la région N-terminal permettait d'améliorer ou de restaurer un clivage correct de la séquence signal du récepteur. Ce problème de clivage semble donc avoir pour origine la présence de carbohydrate près du site de clivage de la protéase Kex 2 créant ainsi un encombrement stérique.

La fusion en N-terminal de différentes étiquettes telles que l'étiquette 10-histidine, FLAG, myc ou la fusion en C-terminal d'autres protéines telles que la protéine fluorescente verte améliorée de la méduse Aequoria victoria (eGFP) n'entraîne pas de modification significative de l'expression des RCPG dans Pichia pastoris (Weiss et al. 1998; Schiller et al. 2000; Sarramegna et al. 2002). Cependant, la fusion en C-terminal de l'étiquette 10-histidine diminue de deux à trois fois la production de récepteur à endothéline B (Schiller et al. 2001). Pour le récepteur à dopamine D2 aucun changement n'a été observé lorsque l'étiquette histidine est ajoutée en N ou en C-terminal. Cependant, pour ce même récepteur une augmentation significative de l'expression est observée lorsqu'un domaine de biotinylation de la transcarboxylase de Propionibacterium shermanii est fusionné en C-terminal du récepteur. Le même effet est observé sur le récepteur 5HT5A de souris, le récepteur D2S et le récepteur à endothéline B. Cet effet a également été observé sur des RCPG exprimés dans des cellules d'insectes infectées par baculovirus. L'addition d'un domaine de biotinylation semble par conséquent stabiliser le récepteur recombinant soit en le protégeant de la dégradation soit en maintenant la fidélité de repliement (Reinhart et al. 2005).

Les expériences de quantification du récepteur opioïde mu total (par des expériences de fluorescence) en comparaison avec les récepteurs actifs (par fixation de ligand à l'équilibre) montrent que la majorité des récepteurs exprimés dans *Pichia pastoris* ne sont pas détectés par des expériences de « binding » (Sarramegna et al. 2002). De plus, sachant que la quantité totale de récepteur produit reste constante, la proportion de récepteur actif a pu être augmenté jusqu'à quatre fois en améliorant les conditions d'induction (Sarramegna et al. 2002).

La rhodopsine bovine a également été exprimée dans *Pichia pastoris* sous le contrôle du promoteur AOX1 et en fusion avec la séquence signal Pho I (Abdulaev et al. 1997). Le niveau d'expression obtenu est de  $3.7 \times 10^6$  sites par cellules que l'on peut comparer aux  $2.4 \times 10^6$  sites par cellules obtenus dans *S. cerevisiae*. Cela confirme à nouveau que l'efficacité

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

de l'expression d'une protéine dans un système particulier dépend de la nature de la protéine à exprimer.

Les techniques de microscopie électronique utilisant de anticorps fusionnés à des molécules d'or montrent que les RCPG exprimés dans *Pichia pastoris* se localisent principalement dans le réticulum endoplasmique et les membranes de Golgi. Il n'y a qu'une faible fraction de RCPG qui se trouve localisé dans la membrane plasmique. L'on a également remarqué que le récepteur humain D2S (figure 51) et le récepteur humain ETB étaient localisés dans des membranes entassées atypiques localisées dans le cytoplasme de *Pichia pastoris*.

Des optimisations des niveaux d'expression peuvent être réalisées en sélectionnant les clones ayant intégrés de nombreuses copies du vecteur d'expression. Il a été montré que pour le récepteur β2 adrénergique que le plus fort niveau d'expression était atteint avec 4 copies de la cassette d'expression. Pour le récepteur 5HT5A ainsi que pour le récepteur à dopamine D2 le niveau d'expression maximum était atteint avec seulement deux copies. Au contraire pour le récepteur opioïde mu le nombre de copies ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'expression. Par conséquent, la correspondance entre le nombre de copie intégrée et le niveau d'expression du récepteur n'est pas évidente et reste dépendante de chaque récepteur testé.

Jusqu'à présent la fermentation à forte densité cellulaire a été réalisée sur le récepteur à endotheline B (Schiller et al. 2001). Le résultat de cette production ayant un niveau d'expression de 45 pmol/mg a permis d'obtenir par fermentation à forte densité cellulaire environ 3 kg de cellules à partir d'un fermenteur de 8 litres.

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

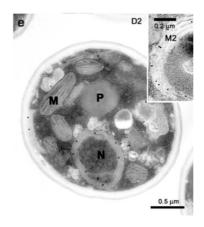


Figure 51 : (Grunewald et al. 2004) Localisation au microscope électronique du récepteur D2s exprimé dans Pichia pastoris.

La localisation à été réalisée par l'intermédiaire d'anticorps marqués à l'argent dirigés contre le récepteur (D2) ou contre son étiquette FLAG (M2). Localisation intracellulaire du récepteur.

Récepteur	Origine	Levure	Promoteur	Peptide signal	Niveau d'expression	Ligand Binding	Couplage à la protéine G	ettiquettes	références
ß2 Adrenergique	Humaine	S.cerevisiae	GAL1	Ste2	115 pmol/mg	+	+	-	King K. et al., 1990
	Humaine	S.cerevisiae	GAL1	Ste2	36 pmol/mg	+	+N+D+	+	Sizmann D. et al., 1996
	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	25 pmol/mg	+	ND	Flag Nt Bio Ct	Weiss H. et al., 1995
	Humaine	S. pombe	ADH	Ste2	7,5 pmol/mg	+	ND	-	Ficca A. et al., 1995
	Humaine	S.cerevisiae	GAL10-CYC1	-	0,16 pmol/mg	+	ND		Duport C; et al., 2003
	Humaine	S.cerevisiae	GAL10-CYC1	-	0,18 pmol/mg	+	ND		Duport C; et al., 2003
α2-C2-Adrenergique	Humaine	S.cerevisiae	GAL1	-	30-60 pmol/mg	+	ND	Histag Nt	Sizmann D; et al., 1996
Serotonine 5HT5A	souris	P. pastoris	AOX1	ррαМF	22 pmol/mg	+	ND	c-myc Nt	Weiss H. et al., 1995
	souris	S.cerevisiae	PRN1	Bm	16 pmol/mg	+	ND	c-myc Nt	Bach M. et al., 1996
	souris	P. pastoris	AOX1	ррαМF	40 pmol/mg	+	ND	Flag Nt/Bio Ct	Weiss H. et al., 1998
Endothelin ETB	humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	30-60 pmol/mg	+	ND	Flag Nt Bio Ct	Schiller H. et al., 2000
Neurokinin NK2	Humaine	S. pombe	NMT1	Pho1	1,16 pmol/mg	+	-	-	Arkinstall S; et al., 1995
Adenosine A2a	rat	S.cerevisiae	ADH1	-	0,45 pmol/mg	+	+	-	Price L et al., 1996
Adenosine A2a	Huamine	S.cerevisiae	GAL1/10	GAL1/10	0,6 pmol/mg	+	ND	c-myc Ct	Butz J. et al., 2003
Cannabinoide CB2	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	1,7 pmol/mg	+	-	c-myc + 6hist Ct	Feng W. et al.,2002
Cannabinoide CB1	Humaine	P.pastoris	AOX1	ррαМF	3,6 pmol/mg	+	-	Flag Nt / c-myc, 6His Ct	Kim T. et al., 2005

Chapitre 4 : Les systèmes d'expression hétérologue

	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	0,4 pmol/mg	+	-	-	Talmont F; et al., 1996
	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	4 pmol/mg	+	-	GFP Nt, c- myc, 6 his Ct	Sarramegna V. et al., 2002 (opti)
μ-Opioide	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	100 pmol/mg	-	-	GFP Nt, c- myc, 6 his Ct	Sarramegna V. et al., 2002
	Humaine	S.cerevisiae	GRAP1	17 aa Ste2	0,4 pmol/mg	+	-	-	Gaibelet G et al., 1999
	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	12mg/L	-	-	GFP Nt, c- myc, 6 his Ct	Sarramegna V. et al., 2005
M1 muscarinique	Humaine	S.cerevisiae	ADH	-	0,02 pmol/mg	+	ND	-	Payette P et al., 1990
M5 muscarinique	rat	S.cerevisiae	MF	ppαMF	0,13 pmol/mg	+	-	-	Huang H. et al., 1992
D2s Dopaminergique	Humaine	S.cerevisiae	PMA1	Ste2	1-2 pmol/mg	+	ND	-	Sander P. et al., 1994
D2s Dopaminergique	Humaine	S.cerevisiae	GAL10	Ste2	1-2 pmol/mg	+	ND	-	Sander P. et al., 1994
D2s Dopaminergique	Humaine	S. Pombe	NMT1	Ste2	14 pmol/mg	+	ND	-	Sander P. et al., 1994
D2s Dopaminergique	Humaine	P. pastoris	AOX1	ррαМF	80 pmol/mg	+	ND	Flag, Bio Ct	Grunewald S. et al. 2004
D1A Dopaminergique	Humaine	S.cerevisiae	GAP	Ste2	0,13 pmol/mg	+	ND	Flag + his Ct	Andersen B et al., 1998
D2 Dopaminergique	Humaine	S. Pombe	NMT1	-	1 pmol/mg	+	-	-	Presland J. et al., 1998
Somatostatin SSTR2	rat	S.cerevisiae	GAL1/10	-	0,2 pmol/mg	+	+	-	Price L et al., 1995
Rhodopsine	Bovine	S.cerevisiae	GAL1	-	2mg/10(10) dellules	+	-	-	Mollaaghababa R. et al., 1996
Rhodopsine	Bovine	P. pastoris	AOX1	Pho1	0,3mg/L	+	-	-	Abdulaev N. et al., 1997
GHRH	Humaine	S.cerevisiae	GAL1/10	-	ND	+	+	-	Kajkowski E ; et al., 1997
LysoPA Edg2/Vzg1	Huamine	S.cerevisiae	GAL	-	ND	+	+	-	Erickson J e tal., 1998
VPAC1	Rat	S.cerevisiae	GAL10-CYC1	ррαМF	70 pmol/mg	+	-	HSV Ct	Hansen M. et al., 1999
Ste2	S.cerevisae	S.cerevisiae	GAP	-	350 pmol/mg	+	+	Falg+His Ct	David N. et al, 1997

Tableau 8 : (inspiré de Sarramegna et al. 2003) Expression de RCPG dans la levure.

pp $\alpha$ MF : facteur  $\alpha$  de croisement prépropeptide ; AOX1 : Promoteur du gène de l'alcool oxydase 1 ; Pho 1 : peptide signal de l'acide phosphatase ; Bm : peptide signal de Bacillus macerans ; GAP : promoteur du gène de la glyceraldehyde –3- phosphate dehydrogenase ; NMT1 : « no message in thiamine » promoteur inhibé en présence de thiamine ; PMA1 : promoteur de l'ATPase de la membrane plasmique ; PRB1 : promoteur du gène de l'endopeptidase B ; Ste2 : récepteur du facteur  $\alpha$  ; ND : non déterminé ; Flag : étiquette flag composé d'une séquence de 8 acides aminés : DYKDDDDK ; Bio : domaine de biotinylation de la transcarboxylase de *Propionibacterium shermanii* ; GHRH : hormone de relagage d'hormone de croissance ; GAL : Promoteur inductible au galactose ; lysoPA : acide lysophosphatique. Les caractères en gras indiquent les RCPG pour lesquels la surexpression est égale ou supérieure à 5pmol/mg. En gris sont indiqués les RCPG exprimés dans *Pichia pastoris*.

# Chapitre 5 : Collecte et clonage des gènes codant pour les RCPG

# I. Introduction : stratégies globales, de collecte et de clonage, élaborées pour le projet MePNet

#### 1. Sélection des cibles

Les cent RCPG retenus pour ce projet ont été sélectionnés de façon rigoureuse sur la base de plusieurs critères objectifs :

- Afin que cette étude soit la plus représentative de cette superfamille de protéine, il a été décidé que les récepteurs qui constituent cette liste reflètent à la fois les différentes sous-familles existantes, mais aussi différents sous-types de certains récepteurs majeurs et soient issus de plusieurs organismes modèles tels que l'homme bien évidemment, mais aussi la souris, le rat, la drosophile, le bœuf ou encore la levure ;
- Dans le but de faciliter les étapes de « contrôle-qualité » nécessaires tout au long du projet, nous avons pris en compte la disponibilité de protocoles et de ligands à haute affinité permettant de tester la « fonctionnalité » des récepteurs exprimés ;
- Enfin, nous avons également retenu certains critères moins prioritaires mais tout aussi importants tels que l'implication de certains récepteurs dans des mécanismes pathologiques ou thérapeutiques majeurs (récepteurs adrénergiques, opioïdes...), ou encore l'intérêt marqué par certains des partenaires académiques et industriels.

Sur la base de ces différents critères, une liste d'environ 153 candidats a été établie en prenant en compte les aléas du travail de collecte pour la sélection de la centaine de récepteurs prévus. Les 107 RCPG qui ont ainsi pu être collectés sont présentés dans le tableau 9.

Chapitre 5: Collecte et clonage des gènes codant pour les RCPG

1 . 1		5-HYDROXYTRYPTAMINE 1A RECEPTOR (5-HT-1A) (SEROTONIN			
1	5H1A_HUMAN	RECEPTOR) (5-HT1A) (G-21).			
2	5H1B_HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR)(5-HT-1D-BETA) (S12).			
3	5H1D_HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 1D RECEPTOR (5-HT-1D) (SEROTONIN RECEPTOR)(5-HT-1D-ALPHA).			
4	5H1E HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 1E RECEPTOR (5-HT-1E) (SEROTONIN			
5	5H1F HUMAN	RECEPTOR) (5-HT1E) (S31).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 1F RECEPTOR (5-HT-1F) (SEROTONIN			
$\vdash$		RECEPTOR). 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2A RECEPTOR (5-HT-2A) (SEROTONIN			
6	5H2A_HUMAN	RECEPTOR (5-HT-2A) (SEROTONII RECEPTOR (5-HT-2A) (SEROTONII 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2A RECEPTOR (5-HT-2A) (SEROTONII			
7	5H2A_MOUSE	RECEPTOR)(5-HT-2).			
8	5H2B_HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 2B RECÊPTOR (5-HT-2B) (SEROTONIN RECEPTOR).			
9	5H2C_HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 2C RECEPTOR (5-HT-2C) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT-1C).			
10	5H5A_HUMAN	5-HYDROXYTRYPTAMINE 5A RECEPTOR (5-HT-5A) (SEROTONIN			
12	5H7 HUMAN	RECEPTOR)(5-HT-5).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN			
14	A1AA RAT	RECEPTOR)(5HT7).  ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).			
15	A1AB HUMAN	ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).			
16	A2AB HUMAN	ALPHA-2B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2B ADRENOCEPTOR)			
10	AZAD_HUIVIAIN	(SUBTYPE C2).			
18	A2AC_RAT	ALPHA-2C ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2C ADRENOCEPTOR) (SUBTYPE C4).			
19	AA1R_HUMAN	ADENOSINE A1 RECEPTOR.			
20	AA2A_HUMAN	ADENOSINE A2A RECEPTOR.			
21	AA2B_HUMAN	ADENOSINE A2B RECEPTOR.			
23	ACM1 HUMAN	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR M1.			
24	ACM1 MOUSE	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR M1.			
25	ACM2 HUMAN	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR M2.			
26	ACM2 PIG	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR M2.			
27	ACTR HUMAN	ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE RECEPTOR (ACTH-R)			
28	AG2R HUMAN	(MELANOCORTIN-2RECEPTOR)  TYPE-1A ANGIOTENSIN II RECEPTOR (AT1A) (AT1AR).			
31	B3AR HUMAN	BETA-3 ADRENERGIC RECEPTOR.			
		DE IT O ADILLIENOIO NEOLE TON.			
32	BRB1 HUMAN				
		B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).			
32	BRB1_HUMAN				
32	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR). B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR). CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).			
32 33 34	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR). B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR). CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R). EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)			
32 33 34 35	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR). B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR). CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R). EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR) CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).			
32 33 34 35 36 37	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR). B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR). CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R). EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR) CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6). CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).			
32 33 34 35 36	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R;			
32 33 34 35 36 37 38 39	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).			
32 33 34 35 36 37 38 39	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CCR-1) (CCR-1)			
32 33 34 35 36 37 38 39 40	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CCR-1) (CCR-1) (CCR-1) (CCR-1) (CCR-2) (CCR-			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1) (mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CCK1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_MOUSE	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CCR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN CKR6_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_MOUSE D3DR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 5 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_MOUSE D3DR_HUMAN D4DR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CCR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR6_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN EDG3_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50	BRB1 HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR6_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN EDG3_HUMAN ET1R_BOVIN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR6_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN EDG3_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR.  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50	BRB1 HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR6_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN EDG3_HUMAN ET1R_BOVIN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR.  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CCK1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR.  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ETBR_BOVIN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN B RECEPTOR PRECURSOR (ET-B) (ENDOTHELIN RECEPTOR NON-SELECTIVE TYPE).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CCB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ETBR_BOVIN GALR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR3).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ETBR_BOVIN GALR_HUMAN GALS_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL3-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR)			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54 55 56	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ET1R_BOVIN GALR_HUMAN GALS_HUMAN GALS_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (ID10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL3-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR) (CCK-BR).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54 55 56 57	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCKR_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ET1R_BOVIN GALR_HUMAN GALR_HUMAN GALT_HUMAN GASR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL3-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR)			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54 55 56 57 59	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ET1R_BOVIN GALR_HUMAN GALR_HUMAN GALS_HUMAN GASR_HUMAN GASR_HUMAN GASR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (CXCR-3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) ((CCR1)(mip1alpha, rantes))  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-B) (ENDOTHELIN RECEPTOR NON-SELECTIVE TYPE).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL2-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR) (CCK-BR).			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54 55 56 57 59 60	BRB1_HUMAN BRB2 HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ET1R_BOVIN GALR_HUMAN GALS_HUMAN GALS_HUMAN GASR_HUMAN GASR_HUMAN GRR_HUMAN GRR_HUMAN GAR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (ID10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL3-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR) (CCK-BR).  GLUCAGON RECEPTOR PRECURSOR (GL-R).  PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR24 (SLC-1)			
32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 48 50 51 52 54 55 56 57 59 60 61	BRB1_HUMAN BRB2_HUMAN CALR_HUMAN CASR_HUMAN CASR_HUMAN CB1R_HUMAN CB2R_HUMAN CCKR_HUMAN CCK3_HUMAN CKR1_HUMAN CKR1_HUMAN CKR2_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D2DR_HUMAN D4DR_HUMAN ET1R_BOVIN ET1R_HUMAN ET1R_BOVIN GALR_HUMAN GALS_HUMAN GALS_HUMAN GASR_HUMAN GASR_HUMAN GRR_HUMAN GRR_HUMAN GRR_HUMAN GRR_HUMAN GAR_HUMAN GAR_HUMAN GAR_HUMAN GAR_HUMAN	B1 BRADYKININ RECEPTOR (BK-1 RECEPTOR).  B2 BRADYKININ RECEPTOR (BK-2 RECEPTOR).  CALCITONIN RECEPTOR PRECURSOR (CT-R).  EXTRACELLULAR CALCIUM-SENSING RECEPTOR PRECURSOR (CASR)  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CANNABINOID RECEPTOR 2 (CB2) (CB-2) (CX5).  CHOLECYSTOKININ TYPE A RECEPTOR (CCK-A RECEPTOR) (CCK-AR).  C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (CXC-R3) (IP10; Mig R; GPR9)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 1 (C-C CKR-1) (CC-CKR-1) (CCR-1) (CCR1)(mip1alpha, rantes)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 2 (C-C CKR-2) (CC-CKR-2) (CCR-2) (CCR2)(mcp1)  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6)  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(2) DOPAMINE RECEPTOR.  D(3) DOPAMINE RECEPTOR.  D(4) DOPAMINE RECEPTOR (D(2C) DOPAMINE RECEPTOR).  LYSOSPHINGOLIPID RECEPTOR (EDG-3).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN-1 RECEPTOR PRECURSOR (ET-A).  ENDOTHELIN B RECEPTOR PRECURSOR (ET-B) (ENDOTHELIN RECEPTOR NON-SELECTIVE TYPE).  GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).  GALANIN RECEPTOR TYPE 3 (GAL3-R) (GALR3).  GASTRIN/CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR (CCK-B RECEPTOR) (CCK-BR).  GLUCAGON RECEPTOR PRECURSOR (GL-R).  PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR24 (SLC-1) HISTAMINE H2 RECEPTOR (GASTRIC RECEPTOR I).			

Tableau 9 : Liste (1/2) des 107 RCPG collectés pour le projet.

Chapitre 5: Collecte et clonage des gènes codant pour les RCPG

65 MCAR HUMAN MELANOCORTINA RECEPTOR (MCAR.) 66 MCAR HUMAN MELANOCORTINA RECEPTOR (MCSR, IMC.2) 67 MGR2 HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 2 PRECURSOR 68 MGR3 HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR 69 MGR4 HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR 70 NKIR, HUMAN SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (MK-I RECEPTOR) (NK-IR). 71 NKIR, RAT SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (MK-I RECEPTOR) (NK-IR). 72 NKIR, HUMAN SUBSTANCE-R RECEPTOR (SPR) (MK-I RECEPTOR) (NK-IR). 73 NKIR, RAT SUBSTANCE-R RECEPTOR (SPR) (MK-I RECEPTOR) (NK-IR). 75 NK2R_HUMAN SUBSTANCE-R RECEPTOR (SPR) (MK-IR RECEPTOR) (NK-IR). 76 NK3R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NK-IR). 77 NMBR_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NK-IR). 78 NY1R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NK-IR). 79 NY1R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NK-IR). 80 NY2R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF) (NEVERORE). 81 NY4R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF) (NF) (NF) (NF) (NF) (NF) (NF) (NF)		MC3R HUMAN	MELANOCORTIN-3 RECEPTOR (MC3-R).
MGSR_HUMAN   METABOTROPIC GILUTAMATE RECEPTOR 2 PRECURSOR	_		` /
67 MGR2 HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 2 PRECURSOR 88 MGRA HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR 89 MGRA HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 3 PRECURSOR 72 NKIR HUMAN SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R) 73 NKIR, RAT SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R) 74 NK2R HUMAN SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R) 75 NK2R_HUMAN SUBSTANCE-R RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R) 76 NK3R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (SKR) (NEUROKININ A RECEPTOR) (NK-2 76 NK3R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NK) (NEUROKININ B RECEPTOR) (NK-3 77 NMBR_HUMAN NEUROMEDIN-B RECEPTOR (NK-3R) 80 NY2R_HUMAN NEUROMEDIN-B RECEPTOR (NK-3R) 81 NY4R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NK-3R) 82 NY5R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-2) (NF-1Y-2) RECEPTOR) 83 OPRO HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-2) RECEPTOR) 84 OPRO MOUSE NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-3) (NF-1Y-3) RECEPTOR) 85 OPRK_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-3) (NF-1Y-3) RECEPTOR) 86 OPRK_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-3) (NF-1Y-3) RECEPTOR) 87 P2UR_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NF-1Y-3) (NF-1Y-3) RECEPTOR) 88 P2Y5_HUMAN DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NOR-1) (NS-1). 89 OPRK_HUMAN KAPPA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NOR-1) (NS-1). 80 OPRK_HUMAN KAPPA-TYPE OPIOID RECEPTOR) 81 P2R_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 82 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 83 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 84 OPRC_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 85 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 86 OPRK_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 87 P2URINAM P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 88 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 89 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 80 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 81 P2TA_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 82 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 83 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR (NOR-1) (NS-1). 84 SSR2_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR (NOR-1) (NS-1). 85 P2Y5_HUMAN P000000000000000000000000000000000000			
B8   MGRA HUMAN   METABOTROPIC GILITAMATE RECEPTOR A PRECURSOR   27 NKTR, HUMAN   SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPP) (INK-1 RECEPTOR) (INK-1R)   73   NKTR, RAT   SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPP) (INK-1 RECEPTOR) (INK-1R)   74   NKZR, HUMAN   SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPP) (INK-1 RECEPTOR) (INK-1R)   75   NKZR, HUMAN   SUBSTANCE-R RECEPTOR (SPP) (INK-1 RECEPTOR) (INK-1R)   76   NKZR, HUMAN   NEUROMEDIN K RECEPTOR (INK-ZR)   76   NKZR, HUMAN   NEUROMEDIN-B RECEPTOR (INK-ZR)   77   NMBR, HUMAN   NEUROMEDIN-B RECEPTOR (INK-SR)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   DELTA-TYPE (INF)   TYPE (INF)   NEUROMEDIN-B PREFERRING   NEU	67	MGR2 HUMAN	
72 NKIR, HUMAN  SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-I RECEPTOR) (NK-IR).  73 NKIR, RAT  SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-I RECEPTOR) (NK-IR).  74 NK2R, HUMAN  SUBSTANCE-R RECEPTOR (SRR) (NK-I RECEPTOR) (NK-IR).  75 NK2R, HUMAN  NEUROMEDIN K RECEPTOR (SRR) (NK-I RECEPTOR) (NK-IR).  76 NK3R, HUMAN  NEUROMEDIN K RECEPTOR (NKR) (NEUROKININ A RECEPTOR) (NK-IR).  77 NMBR, HUMAN  NEUROMEDIN K RECEPTOR (NKR) (NEUROKININ B RECEPTOR) (NK-IR).  78 NY1R, HUMAN  NEUROMEDIN-B RECEPTOR (NKR) (NEUROMEDIN-B-PREFERRING BOMBES) INSPERIENCE PTOR).  80 NY2R, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR) (NPY-IR).  81 NY4R, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR) (NPY-IR).  82 NY5R, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR) (NPY-IR).  83 OPRO, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  84 OPRO, MOUSE  DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (DOR-I).  85 OPRK, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  86 OPRK, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  87 P2UR, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  88 OPRK, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  89 P2YF, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (TYPE I (NPY-IR)).  80 OPRK, MOUSE  DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NCR-I).  81 OPRK, MOUSE  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (DOR-II).  82 OPRK, HUMAN  NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (DOR-II).  83 OPRE HUMAN  P2V PURINOCEPTOR I (ATP) RECEPTOR (DOR-II).  84 OPRE MOUSE  P2YR HUMAN  P2V PURINOCEPTOR I (ATP) RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  85 P2YR HUMAN  P2V PURINOCEPTOR I (ATP) RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  86 P2YR HUMAN  PROSTAGLANDIN P2-LPHA RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  87 STE3, HUMAN  PROSTAGLANDIN P2-LPHA RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  88 P2YR HUMAN  PROSTAGLANDIN P2-LPHA RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  90 P233 HUMAN  PROSTAGLANDIN P2-LPHA RECEPTOR (P2UT) (PURINERSIC RECEPTOR).  91 P3 STE3, YEAST  PHEROMONE A PACT A THAR (PACT	68	MGR3_HUMAN	
NKIR_RAT   SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-17)	69	MGR4_HUMAN	METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 4 PRECURSOR.
TAY	72	NK1R_HUMAN	SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R).
75 NK2R_RAT  76 NK3R_HUMAN  77 NM8R_HUMAN  78 NURSH NUMBR_HUMAN  79 NY1R HUMAN  79 NY1R HUMAN  79 NY1R HUMAN  79 NY1R HUMAN  80 NY2R_HUMAN  80 NY2R_HUMAN  80 NY2R_HUMAN  81 NY4R_HUMAN  82 NY3R_HUMAN  83 OPRO HUMAN  84 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  86 OPRO HUMAN  87 PUR HUMAN  88 OPRO HUMAN  88 OPRO HUMAN  89 OPRO HUMAN  89 OPRO HUMAN  80 OPRO HUMAN  80 OPRO HUMAN  80 OPRO HUMAN  80 DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NPY-YS)  80 OPRO HUMAN  81 NY4R_HUMAN  82 NY5R_HUMAN  83 OPRO HUMAN  84 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  86 OPRO HUMAN  87 PUR HUMAN  88 OPRO HUMAN  89 PUR HUMAN  89 PUR HUMAN  80 OPRO HUMAN  81 NY4R_HUMAN  82 NY5R_HUMAN  84 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  85 OPRO HUMAN  86 OPRO HUMAN  87 PUR HUMAN  88 PUR HUMAN  89 PUR HUMAN  89 PUR HUMAN  80 PUR HU	73	NK1R_RAT	SUBSTANCE-P RECEPTOR (SPR) (NK-1 RECEPTOR) (NK-1R).
TO NKZR_RAT  TO NKZR_RAT  TO NKZR_RAT  TO NKZR_RAT  TO NKZR_HUMAN  TO NKZR_HUMAN  TO NMBR_HUMAN  TO NMBR_HUMAN  TO NMBR_HUMAN  TO NMBR_HUMAN  TO NYZR_HUMAN  TO PORD HUMAN	74	NK2R HUMAN	
76 NK3R_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NIK?) (NEUROKININ B RECEPTOR) (NK-3 77 NMBR_HUMAN NEUROMEDIN K RECEPTOR (NIKR) (NEUROKININ B RECEPTOR) (NK-3 78 NY1R HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR (NIKM-1) (NEUROMEDIN-B-PREFERRING BOMBESINRECEPTOR).  80 NY2R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY-2R) (NPY-Y-R) (NPY-Y-R) 81 NY4R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY-2R) (NPY-Y-R) (NPY-Y-R) 82 NY5R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY-2R) (NPY-Y-R) (NPY-Y-R) 83 OPRO HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY-3R) (NPY-Y-R) RECEPTOR).  84 OPRO HUMAN DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NPY-S), (NPY-Y-S) RECEPTOR).  85 OPRO HUMAN DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NOR-1) 86 OPRK MOUSE DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (NOR-1) 86 OPRK MOUSE PUPURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (NSL-1).  87 P2UR, HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  88 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 5 (P2Y5) (PURINERGIC RECEPTOR S).  89 P2YR_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 5 (P2Y5) (PURINERGIC RECEPTOR S).  89 P2YR_HUMAN PROSTAGLANDIN P2 RECEPTOR.  90 P2S3_HUMAN PROSTAGLANDIN P2 RECEPTOR.  91 P2R_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).  92 SSR2_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).  93 SSR1_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).  94 SSR2_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 1 (SSIR) (SRIF-2).  95 SSR3_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).  95 SSR3_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3 (SS3R) (SS2-28).  96 STE2_YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR.  97 TIRE, HUMAN ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPR VIB).  104 A1AA HUMAN ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPR VIB).  105 A1AB HAMSTER ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPR VIB).  106 A1AB HAMSTER ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPR VIB).  107 A2AA HUMAN ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPRA 1A-ADRENOCEPTOR).  108 A1AB HAMSTER ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPRA 1A-ADRENOCEPTOR).  109 DADR_HUMAN ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPRA 1A-ADRENOCEPTOR).  101 A1AB HAMSTER ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPRA 1A-ADRENOCEPTOR).  102 CLT1_HUMAN ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (APPRA 1A-ADREN			RECEPTOR)(NK-2R).
NK3R_HUMAN   NEUROMEDIN K RECEPTOR (NKR) (NEUROKININ B RECEPTOR) (NK-3)	75	NK2R_RAT	
NEUROMEDIN-B RECEPTION (NIMB-R), NIEUROMEDIN-B-PREFERRING	76	NIKSD HITMAN	
NWIST_NUMBAN   BOMBESINRECEPTOR	76	NK3K_HUMAN	RECEPTOR)(NK-3R).
NY1R_HUMAN   NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 1 (NPY1-R)	77	NMBR HUMAN	
80	70	=	
NY4R_HUMAN	_		
POLYPEPTIDERECEPTOR 1) (PP1).  82 NY5R_HUMAN  84 NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR 1 (PP 5, INPY-5'), INPY-5') RECEPTOR)  85 OPRE HUMAN  86 OPRE HUMAN  87 P2UR_HUMAN  88 P2Y5_HUMAN  89 P2Y5_HUMAN  89 P2Y5_HUMAN  89 P2Y5_HUMAN  80 P2Y5_HUMAN  81 P2Y5_HUMAN  82 P2Y5_HUMAN  83 P2Y5_HUMAN  84 P2Y5_HUMAN  85 P2Y5_HUMAN  86 P2Y5_HUMAN  87 P2UR_HOUGEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  87 P2UR_HUMAN  88 P2Y5_HUMAN  89 P2Y7_HUMAN  80 P2Y7_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y9_HINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y9_HINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y9_HINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  81 P2Y9_HUMAN  80 P2Y9_HINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2V1) (PURINERGIC RECEPTOR).  82 P2Y8_HUMAN  80 P2Y8_HUMAN  80 P2Y9_HUMAN  80 P2Y9_HU		_	NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 4 (NPY4-R) (PANCREATIC
82	81	NY4R_HUMAN	
1986   1987	92	NVED LUMAAN	
A		_	
SPECYPLANT   SAPPA-TYPE OPIOID RECEPTOR (KOR-1).			
86         OPRK_MOUSE         KAPPA-TYPE OPIDID RECEPTOR (KOR-1) (MSL-1).           87         P2UR_HUMAN         P2U PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2U1) (PURINERGIC RECEPTOR).           88         P2Y5_HUMAN         P2Y PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR).           89         P2Y6_HUMAN         P2Y PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR).           89         P2Y8_HUMAN         P2Y PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR).           90         PE23_HUMAN         PROSTAGLANDIN E2 RECEPTOR.           91         PF2R_HUMAN         PROSTAGLANDIN E2 RECEPTOR.           93         SSR1_HUMAN         SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 1 (SS1R) (SRIF-2).           94         SSR2_HUMAN         SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).           95         SSR3_HUMAN         SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3 (SS3R) (SSR-28).           96         STE2_YEAST         PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR.           97         STE3_YEAST         PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR.           99         THER HUMAN         THROMBIN RECEPTOR (APPA 14-ADRENOCEPTOR).           104         A1AA_HUMAN         ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 14-ADRENOCEPTOR).           105         A1AB_HAMSTER         ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 14-ADRENOCEPTOR).           107         A2AA_HUMAN         ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 14-ADRENOCEPTOR). <td< td=""><td>_</td><td>_</td><td></td></td<>	_	_	
P2UR_HUMAN			
88 P2Y5_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 5 (P2Y5) (PURINERGIC RECEPTOR 5) 89 P2YR_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 1 (ATP RECEPTOR) (P2Y1) (PURINERGIC RECEPTOR 1) 90 PE23_HUMAN PROSTAGLANDIN E2 RECEPTOR, E93 SUBTYPE 91 PF2R_HUMAN PROSTAGLANDIN F2-ALPHA RECEPTOR 93 SSR1_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 1 (SS1R) (SRIF-2). 94 SSR2_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1). 95 SSR3_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3 (SS2R) (SSRIF-1). 96 STE2_YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR 97 STE3_YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR. 99 THRR HUMAN VASOPRESSIN V19 RECEPTOR (AVPR V18). 101 V19R_HUMAN VASOPRESSIN V19 RECEPTOR (AVPR V18). 102 A1AB_HAMSTER ALPHA-18 ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 18-ADRENOCEPTOR). 105 A1AB_HAMSTER ALPHA-19 ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 18-ADRENOCEPTOR). 106 A1AD_RAT ALPHA-19 ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 18-ADRENOCEPTOR). 107 A2AA_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 18-ADRENOCEPTOR). 108 DADR_HUMAN D(18) DOPAMINE RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR). 110 DBDR_HUMAN D(18) DOPAMINE RECEPTOR (B) DOPAMINE RECEPTOR) 111 SH6_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (6-H1-6) (SEROTONIN RECEPTOR). 112 SH7_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR. 114 MGR7_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR (FS-H1-7) (SHTO). 115 SH7_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (FS-H1-7) (SHTO). 116 TSHR_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (FS-H1-7) (SHT-N) (SEROTONIN RECEPTOR). 117 SH7_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (FS-H1-7) (SHT-N) (SEROTONIN RECEPTOR). 118 SHR_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR. 119 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR (FS-H1-7) (SHT-N) (SEROTONIN RECEPTOR). 120 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR (FS-H1-7) (SHT-N) (SEROTONIN RECEPTOR). 130 CLT2_HUMAN FSHLHUMAN F	86	OPRK_MOUSE	
P2Y PURINOCEPTOR 5 (P2Y5) (PURINERGIC RECEPTOR 5)   P2YR_HUMAN	87	P2UR_HUMAN	
P2YR_HUMAN	88	P2Y5 HUMAN	
90 PE23_HUMAN 91 PP2R_HUMAN 91 PP2R_HUMAN 93 PROSTAGLANDIN F2-RECEPTOR, EP3 SUBTYPE 94 SSR2_HUMAN 95 SSR3_HUMAN 96 SSR3_HUMAN 97 SSR3_HUMAN 98 SSR3_HUMAN 99 SSR3_HUMAN 99 SSR3_HUMAN 90 SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1). 95 SSR3_HUMAN 96 STE2_YEAST 97 STE3_YEAST 97 PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR 99 THRR_HUMAN 103 V18R_HUMAN 104 A1AA_HUMAN 105 A1AB_HAMSTER 106 A1AD_RAT 107 A2AA_HUMAN 108 ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 DADR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 A1AA_HUMAN 105 A1AB_HAMSTER 106 A1AD_RAT 107 A2AA_HUMAN 108 ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 DADR_HUMAN 105 A1AB_HAMSTER 106 A1AD_RAT 107 A2AA_HUMAN 108 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 105 A1AB_HAMSTER 106 A1AD_RAT 107 A2AA_HUMAN 108 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 105 A1AB_HAMSTER 106 A1AD_RAT 107 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 108 A1AD_RAT 109 DADR_HUMAN 109 DADR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 105 A1AD_RAT 107 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 107 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 101 DBDR_HUMAN 102 DADR_HUMAN 103 DADR_HUMAN 104 SHAPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 107 SHAPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (B-HT-2) (SEROTONIN RECEPTOR). 108 SHAPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (B-HT-2) (SEROTONIN RECEPTOR). 109 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 100 DADR_HUMAN 101 SHAPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (B-HT-2) (SEROTONIN RECEPTOR). 107 SHAPHA-1D ADRENERGIC RECE			
91	89	_	
93   SSR1 HUMAN   SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 1 (SS1R) (SRIF-2).   94   SSR2 HUMAN   SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).   95   SSR3 HUMAN   SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).   96   STE2_YEAST   PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR   97   STE3_YEAST   PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR   98   THRR HUMAN   THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR.   109   THRR HUMAN   THROMBIN RECEPTOR (AVPR V1B)   104   A1AA_HUMAN   ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).   105   A1AB_HAMSTER   ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).   106   A1AD_RAT   ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).   107   A2AA_HUMAN   ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR).   108   DADR_HUMAN   ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR).   109   DADR_HUMAN   DARENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR).   110   DBDR_HUMAN   DARENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR).   111   5H6_RAT   5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR).   112   SHT_RAT   SHYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR 7 PRECURSOR.   114   MGR7_HUMAN   METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.   116   TSHR_RAT   SHYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)   117   5H7_RAT   5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)   129   CLT1_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT1)   130   CLT2_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT1)   131   FSHR_HUMAN   FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR)   132   LSHR_RAT   PRECURSOR (LHCR_R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR (PSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR)   133   LSHR_RAT   PRECURSOR (LHCR_R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR 6 (P2Y6).   134   FSHR_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING RECEPTOR TYPE 2).   135   FSHR_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING PRECEPTOR) (LSR POLORONING RECEPTOR)   144   SHT4_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING PRECEPTOR) (LSR POLORONING PRECEPTO	90		,
94   SSR2_HUMAN   SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 2 (SS2R) (SRIF-1).     95   SSR3_HUMAN   SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3 (SS3R) (SSR-28).     96   STE2_YEAST   PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR     97   STE3_YEAST   PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR     99   THRR_HUMAN   THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR.     103   V1BR_HUMAN   VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (AVPR V1B)     104   A1AA_HUMAN   ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).     105   A1AB_HAMSTER   ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).     106   A1AD_RAT   ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).     107   A2AA_HUMAN   ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).     108   DADR_HUMAN   ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).     110   DBDR_HUMAN   DIA DOPAMINE RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)     111   SH6_RAT   S-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-17-6) (SEROTONIN RECEPTOR)     112   SH6_RAT   S-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-17-6) (SEROTONIN RECEPTOR)     113   MGR5_HUMAN   METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR     114   MGR7_HUMAN   METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR     117   SH7_RAT   S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-11-7) (S-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)     117   SH7_RAT   S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)     120   CLT1_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 7 PRECURSOR (FSH-7)     130   CLT2_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-7)     131   FSHR_HUMAN   FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR 1 (CYSLT1)     132   CKBR_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING RECEPTOR)     144   SHT4_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING RECEPTOR)     145   CKR7_HUMAN   FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (LIDRONING RECEPTOR) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-7) (CCC-CKR-11) (CCC-C	91		
95 SSR3_HUMAN SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3 (SS3R) (SSR-28). 96 STE2 YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR. 97 STE3_YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR. 107 STE3_YEAST PHEROMONE A FACTOR RECEPTOR. 108 THRR HUMAN THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR. 109 THRR HUMAN ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 105 A1AB_HAMSTER ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 106 A1AD_RAT ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR). 107 A2AA_HUMAN ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 108 DADR_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 110 DBDR_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 111 SH6_RAT ALPHA-3D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 112 DDPAMINER RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 113 MGR5_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 114 MGR7_HUMAN D1A DOPAMINE RECEPTOR. 115 SH6_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR). 116 TSHR_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR 5 PRECURSOR. 117 SH7_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR 7 PRECURSOR. 118 MGR5_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR. 119 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CS1) (CS-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (SHT7). 120 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CS1) (CS-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR). 130 LSHR_RAT FOLLIC STIMULATING HORMONE RECEPTOR 1 (CS1) (CS-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR). 131 FSHR_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKINS RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-9R RECEPTOR). 132 LSHR_RAT FOLLIC STIMULATING HORMONE RECEPTOR 1 (PSP) (MM3) 133 LSHR_RAT FOLLIC STIMULATING HORMONE RECEPTOR 1 (PSP) (MM3) 134 SH1_HUMAN FINE PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-11) (CC-CKR-1			
96 STEZ_YEAST PHEROMONE ALPHA FACTOR RECEPTOR 97 STE3_YEAST PHEROMONE A FACTOR RECEPTOR. 99 THRR HUMAN THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR. 103 VIBR_HUMAN VASOPRESSIN VIB RECEPTOR (AVPR V1B) 104 A1AA_HUMAN ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 105 A1AB_HAMSTER ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 106 A1AD_RAT ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 107 A2AA_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 108 A1AD_RAT ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR). 109 DADR_HUMAN D1A DOPAMINE RECEPTOR. 110 DBDR_HUMAN D1BDOPAMINE RECEPTOR. 111 5H6_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR); THE ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR); THE ALPHA-1D ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (5-HT-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1)	-	_	
97         STE3_YEAST         PHEROMONE A FACTOR RECEPTOR.           99         THRR_HUMAN         THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR.           103         V1BR_HUMAN         VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (AVPR V1B)           104         A1AA_HUMAN         ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).           105         A1AB_HAMSTER         ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).           106         A1AD_RAT         ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).           107         A2AA_HUMAN         ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR).           109         DADR_HUMAN         D1A DOPAMINE RECEPTOR.           110         DBDR_HUMAN         D1B DOPAMINE RECEPTOR (10f.) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINE RECEPTOR).           111         5H6_RAT         5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR).           114         MGR7_HUMAN         METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.           116         TSHR_RAT         ITYROTROPIN RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-A) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-A) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-A) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-A) (5-HT-X)			
THRR_HUMAN			
103	_	_	
104			THROMBIN RECEPTOR PRECURSOR.
105			
106	_		
A2AA_HUMAN  A2AA_HUMAN  DADR_HUMAN  DIA DOPAMINE RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  DBDR_HUMAN  DIA DOPAMINE RECEPTOR.  DBDR_HUMAN  DIBDR_HUMAN  SHIPDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  TIBDR_RAT  THYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR.  THYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR)  THYROTROPIN RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-HT).  THYROTROPIN RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)  THYROTROPIN RECEPTOR (1 (CBH) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  THYROTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR  THYROTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR  THYROTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR  THE CORPORATION OF THE CORPOR (SH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  THE CORPOR TO THE CORPOR (SH-R) (SH-R) (SEROTONIN RECEPTOR) (SH-R) (SH-R) (SEROTONIN RECEPTOR) (SH-R) (SH-R	105	ATAB HAMSTER	ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).
109 DADR_HUMAN   D1A DOPAMINE RECEPTOR   D1BDR_HUMAN   D1A DOPAMINE RECEPTOR   D1BDR_HUMAN   D1A DOPAMINE RECEPTOR   D1BDR_HUMAN   D0PAMINE RECEPTOR   D1BDR_HUMAN   D0PAMINE RECEPTOR   D1BETA   D1BETA   D0PAMINE RECEPTOR   D1BETA   D1BETA	106		
DADR_HUMAN		A1AD_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).
111 5H6_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  113 MGR5_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  114 MGR7_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  116 TSHR_RAT IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (ISH-R) (IHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  117 5H7_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(SHT7).  121 CB1R_MOUSE CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR).  133 LSHR_RAT LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HMCs) (FHCS) (S-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (S-HT-4).  144 SHT4_HUMAN C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR 1)  153 CKRR HIIMAN C-C Chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11)		A1AD_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)
111 5H6_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  113 MGR5_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  114 MGR7_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  116 TSHR_RAT IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (15H-R) (11HYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  117 5H7_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  121 CB1R_MOUSE CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  131 FSHR_HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  133 LSHR_RAT LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR).  134 P2Y6_HUMAN PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINISING HORMONINE RECEPTOR).  135 IL8B_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 SHT4_HUMAN S-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (S-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR 1)  153 CKRR HIMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CC	107	A1AD_RAT A2AA_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).
111 SHO_RAT RECEPTOR)(ST-B17).  113 MGR5_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  114 MGR7_HUMAN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  116 TSHR_RAT IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1SH-R) (1HYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  117 SH7_RAT S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  121 CB1R_MOUSE CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  133 LSHR_RAT LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINISING HORMONE RECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN FULL CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINISING HORMONE RECEPTOR).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 SHT4_HUMAN FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (S-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-11) (CC-CKR-11	107 109	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA
113   MGR5_HUMAN   METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.     114   MGR7_HUMAN   METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.     116   TSHR_RAT   THYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (ISH-R) (IHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).     117   SH7_RAT   S-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).     121   CB1R_MOUSE   CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).     129   CLT1_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)     130   CLT2_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)     131   FSHR_HUMAN   FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).     133   LSHR_RAT   LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR     134   FSHR_HUMAN   HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).     137   P2Y6_HUMAN   P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).     139   FML1_HUMAN   FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)     144   SHT4_HUMAN   S-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (S-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (S-HT4).     145   CKR7_HUMAN   C-C CHEMOKINE RECEPTOR 1 (PP CCCCKR-11) (CCCCKR-11) (CCCCK	107 109	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).
TSHR_RAT   SHYDROXYTRYPTAMINE TRECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)	107 109 110	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN
TSHR_RAT  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5H7_RAT  6ANNABINOID RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR  PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN  FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipxxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  C-C CHEMOKINE RECEPTOR 1 (PP T PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-1) (CC-CKR-7)	107 109 110 111	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).
117 5H7_RAT  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  121 CB1R_MOUSE  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 7 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN  133 LSHR_RAT  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN  137 P2Y6_HUMAN  138 FML1_HUMAN  139 FML1_HUMAN  FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-11) (CCR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR)  153 CKRB_HUMAN  C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-1) (CC-CKR-11) (CCR-1) (CC-CKR-11) (CC-	107 109 110 111 113	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D18 DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.
RECEPTOR)(5HT7).  121 CB1R_MOUSE CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINECEPTOR).  133 LSHR_RAT PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR)  136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN SHTAL-HUMAN RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR 1 (YPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-11) (CC	107 109 110 111 113 114	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.
TECEPTOR)(SHT/).  121 CB1R_MOUSE CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  129 CLT1_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  130 CLT2_HUMAN CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  131 FSHR_HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  133 LSHR_RAT LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 SHT4_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-1) (CC-CKR-11)	107 109 110 111 113 114	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (ISH-R) (IHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).
129	107 109 110 111 113 114 116	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN
130   CLT2_HUMAN   CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)     131	107 109 110 111 113 114 116	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5-HT-7).
Table   Tabl	107 109 110 111 113 114 116 117	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5-HT-7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).
131 FSHR_HUMAN (FOLLITROPINRECEPTOR).  133 LSHR_RAT LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN FMLP-RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-11) (CC-CK	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1SH-R) (1HYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-7) (CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)
LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN S-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR 17PE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (SEROTONIN RECEPTOR) (SEROTONIN RECEPTOR)  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (SHT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)
136 IL8B_HUMAN HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2)  137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor)  144 SHT4_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor)  145 CKR7_HUMAN C-C-C CHEMOKINE RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  153 CKRB_HUMAN C-C-C Chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-  153 CKRB_HUMAN C-C-C Chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  THYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5-HT-7) (CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R)
137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR 1)  153 CKR8_HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CC-CKR-11)	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (ISH-R) (ITHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).
137 P2Y6_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-4).  145 CKR7_HUMAN 7-1 (CC-CKR-7) (C	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).
139 FML1_HUMAN FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  144 5HT4_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 1)  153 CKRB_HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN MGR7_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR. METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR. IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (H/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONIE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2)
144 5HT4_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-4) (C-C CKR-7) (CC-CKR-14) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 1)  153 CKRB_HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR.  DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR); METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1SH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).
144 5HT4_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-4).  145 CKR7_HUMAN C-C CHEMOKINE RECEPTOR 1 (PPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 1)  153 CKRB_HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1SH-R) (ITHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTRINIZING HORMINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).
C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-145 CKR7_HUMAN 7) (CCR-7)(MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 1)  CCC Chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLITE STIMULATING HORMONE RECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (H/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)
145 CKR7_HUMAN 7) (CCR-7)(MIP-3 BETA RECEPTOR) (EBV-INDUCED G PROTEIN- COUPLED RECEPTOR 1)  153 CKRB_HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133 136 137	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN FML1_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  THYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR) (DBH) (CBH) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (H/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  FMLP-related receptor 1 (FMLP-R-1) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN
COUPLED RECEPTOR 1)  153 CKRB HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133 136 137	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN FML1_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1'SH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(SHT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (MM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR)
CKRR HUMAN C-C chemokine receptor type 11 (C-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CCR-	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133 136 137 139	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN FML1_HUMAN 5HT4_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 7 PRECURSOR.  IHYROTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (1SH-R) (ITHYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(5HT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR 1 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HORMINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-88 BB) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (FSH-T4).  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR
11)(Chemokine receptor-like 1) (CCX CKR)	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133 136 137 139	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN FML1_HUMAN 5HT4_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  (ALPHA-2AARSUBTYPE C10).  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINE RECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (G1-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (G1-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (G1-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR) (G1-HT-7) (G1-HT-X) (G1-H
	107 109 110 111 113 114 116 117 121 129 130 131 133 136 137 139	A1AD_RAT A2AA_HUMAN DADR_HUMAN DBDR_HUMAN 5H6_RAT MGR5_HUMAN TSHR_RAT 5H7_RAT CB1R_MOUSE CLT1_HUMAN CLT2_HUMAN FSHR_HUMAN LSHR_RAT IL8B_HUMAN P2Y6_HUMAN FML1_HUMAN 5HT4_HUMAN CKR7_HUMAN	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR).  ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR) (ALPHA-2A ADRENOCEPTOR)  D1A DOPAMINE RECEPTOR.  D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (D(5) DOPAMINE RECEPTOR) (D1BETA DOPAMINERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)(ST-B17).  METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 PRECURSOR.  METABOTROPIN RECEPTOR PRECURSOR (TSH-R) (THYROID STIMULATING HORMONERECEPTOR).  5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR (5-HT-7) (5-HT-X) (SEROTONIN RECEPTOR)(SHT7).  CANNABINOID RECEPTOR 1 (CB1) (CB-R) (CANN6).  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT1)  CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR TYPE 2 (CYSLT2)  FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (FSH-R) (FOLLITROPINRECEPTOR).  LUTROPIN-CHORIOGONADOTROPIC HORMONE RECEPTOR PRECURSOR (LH/CG-R)(LSH-R) (LUTEINIZING HOROMINE RECEPTOR).  HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (IL-8R B) (CXCR-2) (GRO/MGSARECEPTOR) (IL-8 RECEPTOR TYPE 2).  P2Y PURINOCEPTOR 6 (P2Y6).  FMLP-related receptor I (FMLP-R-I) (Lipoxin A4 receptor) (LXA4 receptor) (RFP) (HM63)  5-HYDROXYTRYPTAMINE 4 RECEPTOR (5-HT-4) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-4).  C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 7 PRECURSOR (C-C CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (CC-CKR-7) (MIP-3 BETA RECEPTOR) (1E-8 LIP) (LC-C CKR-11) (CC-CKR-11) (CC-CKR-

Tableau 9 (Suite) : Liste (2/2) des 107 RCPG sélectionnés pour le projet MePNet.

# 2. Clonage d'ADN

Le principal but recherché dans cette partie du projet est de définir et mettre en oeuvre une stratégie globale et cohérente qui permette d'obtenir le plus rapidement possible tous les plasmides d'expression devant servir à l'étude. Les difficultés majeures rencontrées dans cette phase de la recherche sont plus spécifiques de la dimension que de la nature du projet. Elles sont en effet davantage liées au vaste travail de collecte de matériel ou de clonage d'ADN, qu'à la nature des séquences elles-mêmes.

#### 2.1. Les vecteurs d'expression

#### a. Les différents vecteurs utilisés pour le projet MePNet

Afin de répondre au mieux aux objectifs et aux contraintes spécifiques du projet, un important travail de réflexion et de recherche a dû être mené pour élaborer les vecteurs d'expression les plus adaptés. Ces choix ont été guidés par la série de critères objectifs suivants : (i) les « squelettes » plasmidiques parmi les plus performants pour chacun des systèmes d'expression ont été sélectionnés : le vecteur pET15b pour *E. coli*, pPIC9K pour *P. pastoris* et pSFV2gen pour SFV/cellules de mammifères ; (ii) afin de produire des protéines de structure la plus proche possible de la conformation native, il a fallu veiller à n'introduire qu'un minimum de séquences additionnelles ; (iii) pour favoriser la production, la détection et dans certains cas la stabilisation des récepteurs, des séquences de fusion optimisées ont été utilisées et donc (iv) des sites permettant le clivage spécifique de ces séquences additionnelles ont été introduits.

Les différents vecteurs ainsi définis (cartes représentées sur la figure 52) ont été obtenus par des approches classiques de biologie moléculaire, le plus souvent par des méthodes de clonage d'oligonucléotides linker.

Les vecteurs destinés à l'expression des RCPG dans les systèmes *E. coli* et SFV sont basés sur la synthèse de nombreux travaux de recherche. Cependant, afin de déterminer la position optimale des séquences fusionnées au gène d'intérêt permettant d'obtenir les meilleurs rendements d'expression, deux versions de vecteurs ont été réalisées dans chaque cas (pET15N, pET15C, pSFV2genB et pSFV2genC).

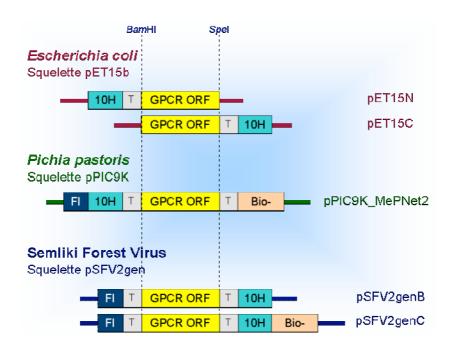


Figure 52 : Carte des différentes étiquettes fusionnées aux récepteurs

10H: étiquette 10 histidines ; T: Séquence de clivage par la protéase TEV; FI: étiquette Flag ; Bio-: domaine de biotinylation.

#### b. Le vecteur *pPIC9K-MePNet pour l'expression chez* P. pastoris

Le vecteur élaboré pour le système d'expression *P. pastoris* est le résultat de plusieurs années de mises au point dans le laboratoire partenaire de Francfort (figure 53). Ces travaux antérieurs nous ont permis de sélectionner un promoteur fort et inductible, le promoteur du gène *AOX1* de *P. pastoris*, une souche de levure déficiente en protéase, la souche SMD1163, ainsi que différentes séquences de fusion.

C'est ainsi que la séquence signal de la phéromone de type  $\alpha$  issue de Saccharomyces cerevisiae a été sélectionnée en raison des précédents résultats ayant démontré que la présence de cette séquence signal permettait d'augmenter les niveaux d'expression pour de nombreux RCPGs, notamment pour le récepteur de sérotonine 5HT5 de souris (Weiss H et al. 1995).

Parmi les nombreuses séquences étiquettes exploitées pour l'expression de protéines membranaires, celles introduites dans le vecteur pPIC9K comprennent une étiquette Flag (GACTACAAGGACGATGACGATAAG) suivie d'une étiquette 10-histidines fusionnées en 5' du gène codant le récepteur, ainsi qu'une séquence de biotinylation

provenant d'une transcarboxylase de *Propionibacterium shermanii* et fusionnée en 3' du récepteur.

Ces différentes étiquettes ont été sélectionnées pour les raisons suivantes :

- Fusionnée en N-terminal du récepteur, la séquence Flag est utilisée pour une détection efficace des RCPG exprimés grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques, mais également dans les étapes de purification par chromatographie d'affinité. Cependant, l'étiquette Flag ainsi que l'étiquette 10 histidines n'ont montré aucun effet significatif sur l'expression (Weiss et al.1998).
- L'étiquette 10-Histidine est principalement utilisée dans les étapes de purification mais peut également servir à la détection ;
- L'ajout d'un domaine de biotinylation (Cronan et al. 1990) en C-terminal du récepteur peut être utilisé pour la détection et la purification. En outre, plusieurs travaux ont également montré pour certains RCPG une amélioration significative des niveaux d'expression due à la présence de ce domaine de biotinylation (Weiss et al. 1998; Schiller et al. 2001).
- Le clivage par la TEV protéase permettra, en fin de purification et préalablement aux tests de cristallisation, de retirer l'ensemble des étiquettes.

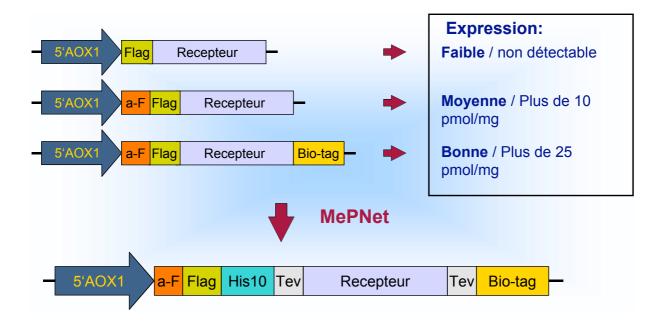


Figure 53: Optimisation du vecteur d'expression pPIC9K.

a-F : séquence signal du facteur  $\alpha$  ; Flag : étiquette flag ; Bio-tag : domaine de biotinylation.

TEV : séquence de clivage par la TEV protéase

#### 2.2. Stratégie globale de clonage

La procédure standardisée qui a été élaborée consiste dans un premier temps à cloner dans un vecteur intermédiaire la centaine de gènes sélectionnés afin d'en contrôler la séquence avant de les sous-cloner dans l'ensemble des différents plasmides d'expression choisis pour le projet (Figure 54). De façon plus détaillée, cette procédure comporte 4 phases majeures : (i) l'amplification par PCR haute-fidélité des ADNc sélectionnés à l'aide d'oligonucléotides spécifiques introduisant les sites de restrictions nécessaires au sous-clonage, (ii) le clonage proprement dit dans un vecteur intermédiaire optimisé pour la ligation de produits de PCR, (iii) le contrôle de la séquence clonée et (iv) le sous-clonage dans les différents plasmides d'expression.

Grâce à l'utilisation d'un vecteur intermédiaire approprié, cette procédure présente l'avantage majeur de ne contrôler qu'une seule fois la séquence de tous les gènes amplifiés avant de les sous-cloner à la manière de « cassettes » et de façon standardisée dans tous les plasmides d'expression prévus par le projet ou ajoutés ultérieurement.

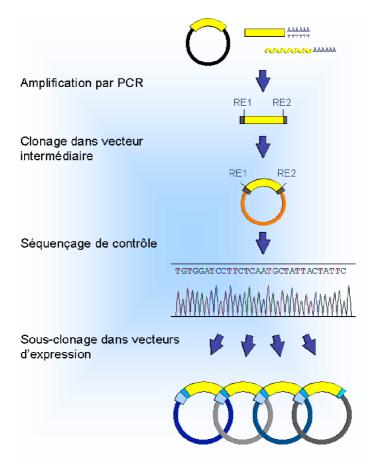


Figure 54 : Stratégie globale de clonage

(RE : Restriction Enzyme)

Chapitre 5: Collecte et clonage des gènes codant pour les RCPG

Afin de pouvoir réaliser l'étape de sous clonage de manière structurée et cohérente un certain nombre de contraintes spécifiques ont du être considérées. En effet, le choix des constructions de biologie moléculaire retenues pour le projet a été guidé par plusieurs critères objectifs : (i) le souci de n'introduire qu'un minimum de séquences additionnelles afin de produire des protéines de structure la plus proche possible de la conformation native, (ii) l'utilisation de séquences de fusion optimisées pour favoriser la production, la détection et la stabilisation des récepteurs et donc (iii) l'introduction de sites permettant le clivage spécifique des séquences additionnelles. Ces choix ont ainsi conduit à opter pour un sous clonage par restriction / ligation au détriment d'une approche par recombinaison (de type Gateway par exemple), puisque, pour rester compatible avec la stratégie de clonage, cette dernière approche présente l'inconvénient d'introduire de longues séquences additionnelles (au moins 8 acides aminés) non clivables.

Dès lors, une stratégie adaptée a du être élaborée pour rendre le sous clonage de gènes par restriction / ligation compatible avec les contraintes de séquence. Tout d'abord, afin de permettre un sous-clonage standardisé et orienté, deux sites de restriction BamHI et Spel ont été sélectionnés pour l'insertion des gènes dans les différents vecteurs d'expression. Une analyse de la fréquence d'apparition des sites de restriction BamHI et Spel dans la séquence codante des ADN des récepteurs de la liste MePNet a permis d'identifier 13 candidats pouvant être directement clonés en utilisant ces enzymes. Pour les 90 gènes restants, deux enzymes de restriction de classe IIS ont été sélectionnées, les enzymes Esp31 et Bbs1. Ces enzymes ont la particularité de reconnaître une séquence d'ADN spécifique et de la couper en aval, à une distance définie. Présentes à une fréquence relativement faible sur les gènes de RCPG, ces enzymes ont en outre l'avantage de générer des extrémités cohésives et complémentaires avec celles produites par d'autres enzymes de restriction. En clair, en choisissant avec soin les séquences additionnelles apportées par les oligonucléotides lors de la phase d'amplification par PCR, on peut digérer les gènes clonés dans le vecteur intermédiaire par l'une de ces deux enzymes et générer un fragment dont les extrémités seront compatibles avec celles qui sont produites par une digestion BamHI / Spel des vecteurs d'expression utilisés (figure 55).

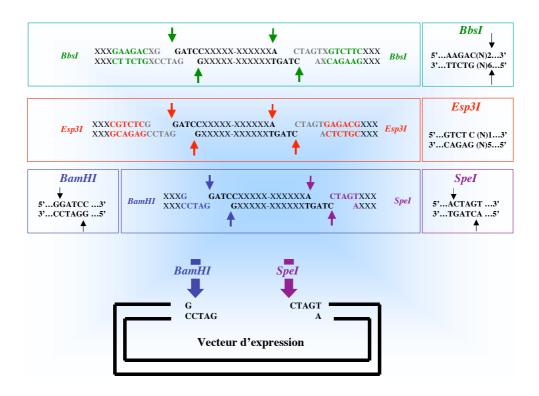


Figure 55 : Stratégie de clonage.

Les vecteurs d'expression des trois différents systèmes d'expression sont ouverts en utilisant les sites de restriction *BamHI* et *SpeI*. Les ADNc peuvent êtres digérés avec ces mêmes enzymes ou en utilisant des enzymes de classe II *BsmBI* ou *BbsI* qui génèrent des extrémités compatibles avec *BamHI* et *SpeI*. N correspond à G,T,A ou C

# 3. Problématique liée à la collecte des ADN codant les RCPG sélectionnés

#### 3.1. Sources d'ADN plasmidiques

Dans un premier temps, cet effort de collecte s'est principalement porté sur la recherche d'ADNc déjà clonés comme matériel de départ afin de mener à bien la phase de clonage le plus rapidement et le plus efficacement possible. Étant donné que de telles molécules ne sont que très faiblement représentées dans les catalogues des sociétés qui les commercialisent (un seul ADN a été obtenu par ce biais), nous avons sollicité de manière organisée l'aide non seulement des partenaires industriels du projet, mais aussi d'un grand nombre de laboratoires académiques et d'organisations publiques (collections d'ADN de la fondation Guthrie, banques de clones du consortium IMAGE et celles du Genoscope...).

Cependant, si ces démarches se sont révélées efficaces de façon globale (60 à 70 % des cibles ont pu être collectées par ce biais), elles ont montré un certain nombre de faiblesses pour l'obtention rapide des ADN recherchés. En effet, l'accès aux collections

d'ADN des partenaires industriels est très souvent barré par des contraintes juridiques qui, lorsqu'elles sont surmontées, n'aboutissent qu'à la mise à disposition d'ADN en quantité limitée (une vingtaine d'ADN obtenus de cette manière pour plus de 30 compagnies sollicitées). De ce point de vue, la contribution des laboratoires académiques s'est montrée davantage payante puisqu'une quarantaine d'ADN ont pu être obtenus par ce biais. Quant aux ressources offertes par les réseaux de séquençage, seuls quelques ADN du centre de séquençage d'Evry ont pu être récupérés (une dizaine environ), ceux proposés par le consortium IMAGE correspondant systématiquement à des séquences incomplètes pour les cibles que nous recherchions. Face à ces difficultés et à la lenteur de ce travail de collecte, des solutions alternatives ont dû être envisagées.

#### 3.2. Sources alternatives et procédures correspondantes

La première partie véritable de mon travail de thèse a ainsi débuté par le développement et la validation d'une approche de clonage de gènes de RCPG à partir de différentes sources alternatives. Aucune étude similaire n'ayant été réalisée dans ce domaine avec une telle dimension pour cette famille de gènes, on a par conséquent entrepris une étude pilote sur 19 cibles que nous avons cherché à amplifier de façon comparative à partir de préparations d'ADNc double brins (Human Brain QUICK-Clone cDNA, Clontech), de sources d'ARN totaux (Human Brain Total RNA, Clontech) ou encore de préparations d'ARN enrichis en messagers (Human Brain PolyA+ RNA, Clontech). Pour cela, nous avons testé en parallèle différentes approches d'amplification optimisées, comprenant des techniques de PCR classique, de Transcription Inverse suivie de PCR (RT-PCR) permettant d'obtenir et d'amplifier un ADNc à partir de sources d'ARN ainsi que des méthodes de RT-nested-PCR.

# II. Résultats et Discussion

# 1. Développement et validation d'approches alternatives aux stratégies initialement envisagées

#### 1.1. Les sources d'ADN et d'ARN sélectionnées

Le choix des 19 RCPG retenus pour cette étude a été réalisé sur la base de données bibliographique diverses décrivant l'expression de ces récepteurs dans un tissu commun. Ce panel de RCPG, présenté dans le tableau 10, a pu par conséquent être criblé dans différentes préparations d'ADN et d'ARN provenant de cerveau humain.

Parmi les différentes sources de préparation d'ADN et d'ARN disponibles, trois ont été choisies pour réaliser ce travail de criblage :

- Les préparations d'ARN total (Human Brain Total RNA, Clontech). Bien qu'elles ne contiennent que 5% d'ARN messagers (elles sont majoritairement composées d'ARN de transfert et d'ARN ribosomaux), ces préparations ont l'avantage de représenter le contenu complet global des ARN exprimés dans un tissu donné. Selon le fournisseur, ces sources d'ARN sont en outre préalablement purifiées afin de ne plus contenir d'ADN génomique ou d'inhibiteur de la transcription reverse tel que l'EDTA ou le SDS (Dieffenbach et al. 1995).
- Les sources d'ARN enrichies en ARN polyA+ (Human Brain Poly A+ RNA, Clontech). Préparées à partir d'ARN total, ces sources sont enrichies en ARNm grâce à une étape de purification des ARN possédant une extrémité 3' polyA+ sur des colonnes d'oligo(dT). Ces sources présentent l'avantage d'augmenter la sensibilité de détection lors de l'analyse de messagers peu exprimés.
- Les préparations d'ADNc doubles brins (ds) produites à partir d'ARN poly A+ (Human Brain QUICK-clone cDNA, clontech). Dans ces préparations, l'ARN de départ est dans un premier temps rétro-transcrit en ADNc. Le brin d'ADNc monocaténaire produit sert à son tour de matrice à une ADN polymérase qui permet d'obtenir l'ADNc bicaténaire. À l'inverse des sources d'ARN qui nécessitent au préalable une première étape de rétrotranscritpion, ce type de préparation est directement utilisable pour l'amplification par PCR des ADN recherchés.

Dans le choix des sources d'acides nucléiques que nous souhaitions cribler, nous n'avons délibérément pas retenu les sources d'ADN génomique ni les banques d'ADNc clonés pour les raisons suivantes :

Préparées à partir de la totalité du génome, les sources d'ADN génomique contiennent par conséquent de l'ADN non codant ainsi que les gènes en présence de leurs introns. Cette source d'ADN n'a pas été choisie car, bien qu'elle soit la seule qui ne soit pas tributaire de l'expression des gènes et qu'elle contienne l'ensemble des cibles indépendamment de leurs lieux d'expression, elle inclue la présence de nombreux introns et l'utilisation de plusieurs paires d'oligonucléotides qui empêchent toute application d'un protocole généraliste. On pourra cependant noter que la faible proportion d'intron dans la séquence des gènes codant pour des RCPG, correspond à une des caractéristiques de cette famille (Gentles et al. 1999).

Les banques d'ADN complémentaires, quant à elles, sont constituées d'ADNc produits à partir d'ARN messagers puis clonés dans des plasmides qui peuvent alors être amplifiés. Par rapport à une préparation d'ADNc double brin, ces sources subissent des étapes supplémentaires de clonage et d'amplification qui peuvent contribuer à une perte d'ADN et rendre de ce fait les banques moins représentatives.

#### 1.2. Les procédures testées

Outre le choix de sources de départ les plus appropriées et de grande qualité, il est nécessaire de sélectionner les méthodes les plus adaptées afin d'augmenter au maximum la probabilité d'amplification des gènes recherchés. Il convient également d'optimiser chacun des paramètres expérimentaux importants tels que l'utilisation d'enzymes appropriées, le choix d'amorces optimales, la programmation des thermocyclers.

La figure 56 représente de façon schématique la méthodologie adoptée pour le criblage des gènes d'intérêt en fonction des sources d'acides nucléiques utilisées.

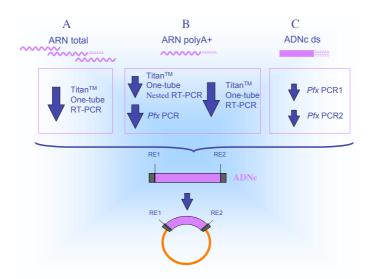


Figure 56 A, B, C : Criblage de trois différentes sources d'ADN et ARN.

Les amplifications haute-fidélité réalisées sur ces sources correspondent à une RT-PCR sur les sources d'ARN et des PCR sur les sources d'ADNc. Le fragment d'ADNc obtenu est cloné dans le vecteur TOPO avant d'être contrôlé par digestion (en utilisant les sites de restriction RE1 et RE2) et par séquençage. Ces clones sont ensuite stockés à –20°C.

Ainsi, à partir des sources d'ADN complémentaires, une première amplification par PCR (PCR1) est réalisée à l'aide d'un programme de PCR optimisé pour l'ensemble des gènes criblés (cf Figure 60, méthode A) en utilisant une enzyme de polymérisation de type Pfx (Invitrogen) possédant une activité de relecture et garantissant ainsi une amplification des inserts avec une haute fidélité. La séquence des amorces est dictée par celle des extrémités de la phase codante du gène à cloner, allongée en 5' de la séquence des sites de restrictions permettant les étapes ultérieures de sous clonage. En fonction des résultats obtenus, une éventuelle deuxième amplification (PCR2) est réalisée dans les mêmes conditions à partir des produits générés par la première (figure 56C).

Pour le criblage des sources d'ARN, deux méthodes ont été retenues, l'une de type RT-PCR, l'autre dite de RT-nested-PCR.

La procédure de RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) combine la synthèse d'ADNc à partir d'ARN avec une amplification par PCR. Il s'agit d'une technique très sensible qui permet le clonage d'ARN messager rare en évitant l'utilisation de banques d'ADNc. L'échantillon de départ est une source d'ARN qui peut correspondre à de l'ARN total ou enrichi en ARN polyA+. Les amorces utilisées sont les mêmes que celles décrites précédemment. La réaction de transcription inverse est assurée par la transcriptase inverse issue du virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus) qui possède, en plus de son activité polymérasique, une activité RNaseH lui permettant de dégrader les brins d'ARN des complexes ADN-ARN. Ces complexes pouvant gêner la liaison des amorces amplificatrices, l'activité de la Rnase H permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la réaction. A la suite de

cette réaction de transcription inverse, une seconde étape de PCR permet d'amplifier les ADN recherchés. Nous avons opté pour l'utilisation d'une technique de RT-PCR en une seule étape, c'est à dire avec l'ensemble des partenaires de la réaction présents dans le même tube, en appliquant un seul programme optimisé (figure 60, méthode C), afin de réaliser un gain de temps, d'éviter des contaminations en diminuant les manipulations et de faciliter le criblage.

La procédure de RT-nested-PCR est complémentaire à la précédente et permet d'améliorer la spécificité et la sensibilité de la réaction (Dieffenbach et al. 1995). Cette technique (Figure 57) comprend également une première étape de RT-PCR utilisant cette fois-ci une paire d'amorces extérieures à la phase ouverte de lecture du gène d'intérêt. De cette façon et, grâce à l'utilisation de logiciels spécifiques permettant d'optimiser le choix des paires d'oligonucléotides (optimisation des Tm, éviction des structures secondaires et des séquences complémentaires dans les paires d'oligos, etc), cette procédure permet de maximiser la probabilité d'amplification de la séquence d'intérêt, ou tout du moins de minimiser les taux d'échec qui seraient liés à la nature des amorces utilisées. Dans une deuxième étape de PCR, l'utilisation d'une seconde paire d'amorces spécifiques du gène permet l'obtention du produit d'amplification recherché. Par ailleurs, grâce à l'utilisation de deux paires d'amorces différentes, cette approche diminue la probabilité d'amplification d'inserts non spécifiques.

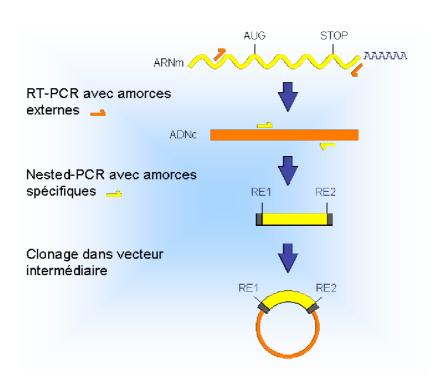


Figure 57 : Description schématique de la RT-Nested PCR. RE : Enzymes de Restriction

#### 1.3. Résultats obtenus

Au cours d'un premier criblage une RT-PCR (figure 60, méthode C) a été réalisée sur la source d'ARN totale (Figure 56A). Aucune cible n'a pu être obtenue à partir de cette source. Cette procédure, n'est par conséquent, pas adéquat pour le criblage des ADNc manquant. La difficulté d'amplification des ADN cibles peut s'expliquer par la faible proportion d'ARN messager dans cette source.

En ce qui concerne la source d'ADNc double brin aucun résultat positif n'a pu être observé après une première PCR (figure 60 méthode A). Cependant, lorsqu'une seconde PCR (figure 60 méthode B) a été réalisée à partir de la première, l'amplification a permis d'obtenir un résultat positif pour certains RCPG (figure 58A). Une seule amplification par PCR n'est donc pas suffisante pour l'amplification d'ADNc cible. Cette double PCR peut avoir pour inconvénient une augmentation de la probabilité d'introduction de mutations. Cependant, les conditions utilisées ont été suffisamment optimisées pour minimiser ce risque. Cette méthodologie nous a permis d'amplifier cinq ADNc sur les 19 testés.

La source d'ARN poly A+ a été criblée par RT-PCR (figure 60 méthode C, figure 56B, figure 58B). Cela nous a permis d'obtenir 10 ADNc sur les 19 testés.

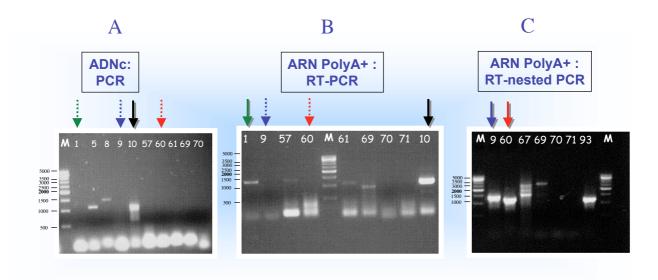


Figure 58 A, B, C : Exemples de résultats obtenus.

Le Récepteur 10 (flèche noire) a pu être obtenu à partir d'une source d' ADNc (A) et il l'a été également à partir de la source d'ARN poly A+ (B). Le récepteur n°1 (flèche verte) qui n'a pas été obtenu par PCR à partir de la source d'ADNc (A) a pu être obtenu par RT-PCR sur la source d'ARN poly A+ (B). Le récepteur n°9 (flèche bleue) de même que le récepteur n°60 (flèche rouge) n'ont pas pu être obtenus à partir de la source d'ADNc (A) ni à partir de la source d'ARN poly A+ par RT-PCR (B). Par contre la réalisation d'une RT-nested PCR sur la source d'ARN poly A+ a permis d'amplifier ces ADN(C).

Ce criblage ne nous a pas permis d'obtenir d'ADNc à partir de la source d'ARN totale. Il nous a cependant permi d'obtenir 5 ADNc à partir de la source d'ADNc double brins et 10 ADNc à partir de la source d'ARN poly A+. Par conséquent, la source d'ARN polyA+ semble la plus adéquate pour le criblage et la collecte des cibles de RCPG nécessaires à la réalisation du projet.

Un total de 15 ADNc a pu être obtenu à partir des sources d'ADNc doubles brins et d'ARN polyA+. Si l'on considère que 4 d'entre eux ont été amplifiés en double à partir de la source d'ADNc double brin et de la source d'ARN polyA+, cela signifie que 11 cibles ont été obtenues et qu'il reste à amplifier huit autres cibles.

Afin d'y remédier une méthodologie plus sensible et plus spécifique a été appliquée à partir de la source d'ARN polyA+, celle de la RT-nested-PCR (figure 60, méthode C et D). Par l'intermédiaire de cette méthode nous avons reussi à obtenir cinq nouvelles cibles (figure 58C).

Au cours de ce criblage nous avons donc réussi à amplifier 16 ADNc sur les 19 testés, parmi lesquels 15 ont pu être obtenus à partir de la seule source d'ARN polyA+ par des méthodes de RT-PCR ou de RT-nested PCR.

Par la suite, après clonage dans le vecteur intermédiaire TOPO et contrôle par séquençage, 11 candidats sur les 16 obtenus ce sont révélés correspondre aux séquences recherchées (tableau 10). Les 6 clones restants présentaient des mutations ponctuelles non silencieuses et n'ont pas été retenus pour la suite du projet. Cependant, nous n'avons pas approfondi l'étude suffisamment pour savoir si la présence de ces mutations pouvait s'expliquer par des phénomènes de polymorphisme de séquence ou si elles étaient liées aux techniques de PCR utilisées.

#### 2. Conclusion

Afin de contribuer efficacement au travail de collecte des ADN codant les RCPG sélectionnés pour le programme MePNet, le criblage de différentes sources d'ADN et d'ARN nous a permis de mettre au point une stratégie applicable à l'ensemble du projet. Grâce à cette étude, nous avons mis en évidence que parmi les différentes sources testées, les préparations d'ARN polyA+ se montraient les plus appropriées pour l'amplification des RCPG recherchés. À partir de cette source, l'amplification par l'intermédiaire d'une RT-PCR a en effet permis dans un premier temps, l'obtention de 52% des ADN criblés. Ce résultat a par la suite été amélioré grâce à la réalisation d'une RT-nested-PCR. La source d'ARN polyA+ a finalement permis à elle seule l'obtention de 79% des ADN criblés. La méthodologie qui a été mise au point (figure 59) a par la suite été étendue à l'ensemble du projet MePNet permettant de collecter 36 ADN sur les 107 de la liste MePNet.

			SOURCES:			
			ARN Total	ADNc	ARN poly A+	
RECEPTEUR	NOM	TAILLE	RT-PCR	PCR	Poly A+ RNA	NESTED RT-PCR
1	5H1A_HUMAN	1299			+	
5	5H1F_HUMAN	1100		+	+	
8	5H2B_HUMAN	1446		+	+	
9	5H2C_HUMAN	1377				+
10	5H5A_HUMAN	1074		+	+	
19	AA1R_HUMAN	981			+	
57	GASR_HUMAN	1344			+	
60	GPRO_HUMAN	1209				+
61	HH2R_HUMAN	1077			+	
67	MGR2_HUMAN	2619				+
69	MGR4_HUMAN	2739				+
70	ML1A_HUMAN	1053				
71	ML1B_HUMAN	1089				
77	NMBR_HUMAN	1173		+		
79	NY1R_HUMAN	1155		+	+	
89	P2YR_HUMAN	1122			+	
93	SSR1_HUMAN	1176				+
95	SSR3_HUMAN	1257			+	
100	TRFR_HUMAN	1197				
Nc 19			0	5	10 (dont 4 commun)	5

**Tableau 10 : Bilan du criblage** Parmi les 19 cibles criblées dans les trois différentes sources (ARN totale, ARN poly A+ et ADNc ds) 5 ont été obtenues à partir de la source d'ADNc ds, 15 ont été obtenues à partir de la source d'ARN Poly A+ (dont quatre étaient communes avec la source d'ADNc) dont 10 à partir d'une RT-PCR et 5 à partir d'un RT-nested PCR. En rouge sont indiqués les récepteurs ne présentant aucune mutation après séquençage.

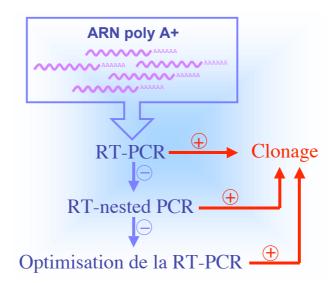


Figure 59 : Stratégies de clonage des ADNc MePNet manquant.

À partir de la source d'ARN poly A+ issus du tissu adéquat, l'ADNc manquant est criblé par RT-PCR. Si le résultat se révèle négatif une RT-nested PCR est réalisée sur cette même source. L'ADNc amplifié est ensuite cloné dans le vecteur TOPOblunt.

réalisée grâce au kit de ligation rapide d'ADN de chez Roche.

# III. Matériels et méthodes

#### 1. Matériels

Les différentes sources d'ARN et d'ADN préparées à partir de cerveau humain : ARN polyA+ (50 ng par réaction), ADNc QUICKclone (100 ng par réaction) et ARN total proviennent de la société Clontech.

La PCR a été réalisée en utilisant l'ADN Polymérase à haute fidélité Platinum *Pfx* commercialisée par Invitrogen. Pour la réalisation de PCR contrôle la Taq Polymerase de Fermentas a été utilisée. Pour la RT-PCR, le kit Titan One tube provient de chez Roche. L'extraction d'ADN des gels d'agarose est réalisée à l'aide du kit QIAquickgel de Qiagen. La purification des ADN plasmidiques est obtenue grâce au kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Les enzymes de restriction proviennent de la société Fermentas. La ligation est

#### 2. Methodes

#### 2.1. PCR et RT-PCR

Les amorces utilisées ont été élaborées grâce au logiciel Primer Premier (PremierBiosoft).

Deux PCR sont réalisées à partir de la source d'ADNc en utilisant la polymérase Platinum Pfx et  $0.2~\mu\text{M}$  de chaque oligonucléotide (Tableau 11). 100 ng d'ADNc pour la première PCR et  $10\mu\text{I}$  de la première PCR pour la seconde,  $200~\mu\text{M}$  de chaque dNTP, 1 mM de magnésium. La première PCR utilise le programme A et la seconde le programme B (figure 60).

La RT-PCR se déroule en deux phases et utilise  $0.2~\mu M$  de chacun des oligonucléotides (Tableau 11), 50~ng d'ARNpoly A+ ou Xng d'ARN totale, 0.2~mM de dNTPmix, 5U d'inhibiteur de Rnase, 5mM de DTT, du tampon d'RT-PCR 1x et  $1\mu l$  du mélange d'enzymes . Le mélange d'enzymes comprend la transcriptase inverse AMV pour la synthèse du brin d'ADNc et un mélange de polymérase comprenant l'ADN polymérase Taq et Tgo (ayant une activité correctrice) pour l'amplification par PCR du brin d'ADNc. La RT-PCR qui a été réalisée sur la source d'ARN totale et la source d'ARN poly A+ utilise le programme C (figure 60).

La RT-nested PCR correspond à une RT-PCR réalisée en utilisant deux jeux d'amorces, la première paire est située à l'extérieur (externe) du domaine à amplifier tandis

que la seconde paire d'amorce correspond aux amorces d'origine (interne) (Tableau 11). La RT-nested PCR utilise  $0.3~\mu M$  de chaque oligonucleotides. La RT- nested PCR se poursuit par une autre PCR en utilisant des amorces internes. Cette méthode permet de choisir des oligonucléotides pouvant améliorer l'étape d'hybridation et évite ainsi les hybridations non spécifiques (lors de la présence de séquences non homologue par exemple). Le programme de la RT-PCR reste cependant identique. Les amorces utilisées correspondent aux oligonucléotides externes.  $10~\mu l$  de cette RT-PCR est ensuite utilisée pour la réalisation d'une PCR en utilisant les amorces internes (les primers d'origine) et une polymérase à haute-fidélité de type Pfx. Le programme D est utilisé pour cette PCR (figure 60).

Après amplification de l'ADNc par PCR, RT-PCR ou RT nested-PCR le tout est déposé sur un gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium afin de vérifier l'amplification et la taille de l'ADNc.

Une purification sur gel d'agarose (QIAquickgel extraction kit (Qiagen)) est ensuite réalisée et les fragments sont par la suite insérés dans le vecteur TOPO blunt .

6 clones sont ensuite récupérés et leurs ADN plasmidiques sont purifiés. Des digestions sont ensuite réalisées sur les plasmides de ces clones en utilisant les enzymes spécifiques du sous clonage (*BamHI/SpeI*, *BpiI*, *Esp3I*) afin de retirer l'insert du vecteur TOPO. Si le profil est correct, on réalise une purification du plasmide par Qiaprep sur le bon clone et on le séquence afin de vérifier si sa séquence ne comporte pas de mutation.

#### 2.2. Stratégie de Clonage

Chaque RCPG cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO est vérifié par séquençage et est extrait du vecteur TOPO en utilisant les enzymes adéquates (*BamHII Spel*, *BsmBI* ou *BbsI*). Le RCPG est ensuite purifié à partir du gel d'agarose 1%. Le vecteur d'expression est ouvert en utilisant les sites *BamHI* et *Spel* avant d'être déphosphorylé. La ligation est ensuite réalisée avec un rapport de 1 :3 en utilisant les kits de ligation rapide de Roche. Le produit de la ligation est transformé dans des bactéries TOP10 d'Invitrogen. L'ADN est ensuite préparé par « Boiling prep » et contrôlé par PCR en utilisant la polymerase Taq et par digestion en utilisant les enzymes *BamHI* et *SpeI*. On réalise un stock glycérol des clones positifs et on les conserve à –80°C. La purification du plasmide est réalisée à partir d'une Midiprep et est conservé à –20°C.

# programmes de PCR

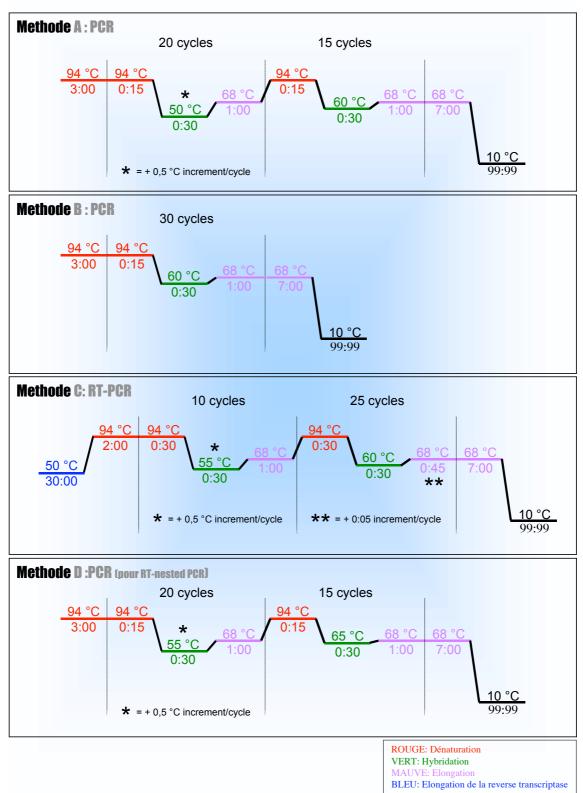


Figure 60 : Programme PCR et RT-PCR

NOTE : la température d'hybridation peut varier en fonction de primers utilisés. Le choix des températures d'hybridation des premiers cycles est volontairement faible dû à la présence d'une extrémité flottante contenant les sites de restriction, située dans la région 5' des oligonucléotides.

RECEPTEUR ENZYMES DE R GATCTICAGA TCCATIGGAACCCAATGGGAAGGCAGCTICTTTTTT
CGTCTCAGATCCATIGGGAATCACTGGTTGGCGCTTGGGCACTG
CGTCTCAGAATCCATIGGGAATCACTAGAAGACAAGACTTGGGCTGGTGGT
GAAGACAGGATCCATIGCAAGGGCAACGGCAGCGCTGCCTGACCAAC GAAGACAGGATCC ATGGATTTACCAGTGAACCTAACCTCCTTT GAAGACAGGATCC ATGGTGAACCTGAGGAATGCGGTGCATTCA S'Oligo sens3'
CGTCTCGGATCCATGGATGTGCTCAGGGCAAC CTCGGATCCATGGCTCTCTTACAGAGTGTCTGAACTT GTCTCGGATCCATGGATTTCTTAAATTCATCTGATCAAAAC CTCGGATCCATGTCAGAGAACGGCTCCTTCGCCAACTGC OLIGO PCR ET RT-PCR GAAGACAACTAGTCACACTGCTAATCCTTTCGCTAACCACACT **GAAGACAACTAGT**GTGTTGCCTAGAAAAGAAGTTCTTGAAGGC CGTCTCACTAGTGCCAGGGCCCAGTGTGCTGATGGTGGTGTTC GIT C ACTAGT TACATAACTAACTIGCTCTTCAGTITITGTC GTCTOACTAGTGAGAGCATCTGCCTGGTGCTGCACACCAAT GTCTCACTAGT GATTGCATGGTTGGTGTAAGTGACGTAAGT 5'Oligo antisens3'

GTCTCACTAGT CTGGCGGCAGAAGTTACACTTAATGATCTT
GTCTCACTAGT ACATCGACACACAAGCTTTTGGAATGC TCGITGICGICGGAGIC OLIGO nested RT-PCR Oligo nested antise

sources ADN et ARN Tableau 11 Les Oligonicleotides. Oligonucleotide sens et antisens utilisés pour l'amplification des 19 cibles sélectionnées pour le criblage des

# Chapitre 6 : Transformation intégrative de la levure *P.pastoris* et sélection des clones recombinants

# I. Introduction

Le point crucial lié à la manipulation génétique de nombreux organismes dépend de la capacité à introduire et à maintenir des séquences d'ADN d'intérêt. L'introduction de séquences dans la levure *Pichia pastoris* se réalise de la même manière que dans la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* et les vecteurs peuvent être maintenus par des éléments de réplication autonome ou être intégrés dans le génome de *P. pastoris* (Cregg et al. 1985). De manière identique à la levure *S. cerevisiae*, les évènements d'intégration chez *P. pastoris* ont d'abord lieu par recombinaison homologue entre les séquences présentes à la fois sur le vecteur d'expression et dans le génome de la levure (Cregg et al. 1989).

La souche *Pichia pastoris* SMD1163 utilisée pour le projet MePNet présente la caractéristique d'être déficiente pour deux types de protéases (la protéinase A et la protéinase B, deux protéases vacuolaires) ce qui permet d'avoir un environnement plus stable pour l'expression de protéines hétérologues. Cette souche présente également une mutation dans le gène *HIS4* codant l'histidinol déshydrogenase, ce qui autorise la sélection de transformants contenant un vecteur exprimant le même gène *HIS4*.

Pour permettre l'intégration du vecteur d'expression dans le génome de la levure, il est nécessaire de linéariser le plasmide contenant le gène à exprimer afin de stimuler le mécanisme de recombinaison et de permettre une intégration ciblée du plasmide dans le génome de la levure (Figure 62). Afin de mener à bien l'étude de l'expression des RCPG chez la levure *Pichia pastoris* dans le cadre du projet MePNet, il est nécessaire de disposer d'une technique de préparation de l'ADN qui permette une intégration ciblée et reproductible pour l'ensemble des ADN du projet.

L'enzyme généralement utilisée pour la linéarisation du vecteur pPIC9K est *Sacl* qui est localisée dans la séquence du promoteur AOX1 présent sur le vecteur pPIC9K. Plusieurs travaux ont montré que l'efficacité de transformation était dépendante du site de linéarisation utilisé et que la linéarisation du vecteur pPIC9K par l'enzyme *Sacl* donnait généralement de très bons rendements (Wu et al. 2004 ; Romanos et al. 1995; Scorer et al.1993). Cependant, la fréquence d'apparition du site *Sac*I dans les gènes d'intérêt de notre étude est plutôt élevée puisque 36 % des RCPG sélectionnés pour notre projet possèdent au moins un site de ce type dans leurs séquences codantes. Pour ces candidats, l'utilisation de cette enzyme n'est donc pas possible puisqu'elle aboutirait non pas à la linéarisation des vecteurs mais à leur fragmentation. De par la dimension du projet, cette étape de préparation des vecteurs d'expression représente ainsi un premier obstacle auquel il nous a fallu trouver une solution.

L'étape suivante consiste à sélectionner de manière effective et efficace les clones d'intérêt en prenant en compte plusieurs éléments majeurs. Tous sont liés au fait que l'intégration de plusieurs copies du gène d'intérêt dans le génome de *P. pastoris* peut

permettre une augmentation du niveau d'expression de ce gène. Lors d'une transformation intégrative telle que celle réalisée avec le vecteur pPIC9K, les évènements d'insertion multiple ont lieu spontanément chez cette levure avec une fréquence allant de 1 à 10% du nombre total des transformants (Sreekrishna et al. 1989; Higgins et Cregg. 1998) et par un mécanisme de recombinaison homologue qui conduit à l'intégration en tandem des copies du vecteur. Le vecteur pPIC9K utilisé permet d'identifier ces évènements puisqu'il contient un gène de résistance à la kanamycine qui confère à la levure une résistance à la généticine (G418). Le criblage des transformants sur des concentrations croissantes de généticine permet ainsi de sélectionner ceux présentant des intégrations multiples du vecteur (Scorer et al. 1994). Bien qu'une sélection directe sur généticine soit possible après électroporation (Scorer et al. 1994), cette méthode est loin d'être la plus adaptée puisqu'un certain temps est nécessaire à l'expression du facteur de résistance. Nous préférons par conséquent, sélectionner les transformants sur des critères d'auxotrophie (clones His+) avant de les tester sur généticine (G418) (Figure 61).

Pour cette étape également, la dimension du projet est telle qu'il nous a fallu tester différentes méthodes afin d'en identifier une qui non seulement autorise un débit de criblage élevé, mais qui surtout permette de sélectionner de manière fiable et efficace les meilleurs clones d'expression recherchés. Une étude pilote a ainsi du être menée à partir d'un panel de clones représentatifs dans le but de définir une méthode globale commune à l'ensemble des ADN du projet MePNet permettant de traiter à la fois la préparation des vecteurs avant transformation et la sélection des clones recombinants.

Dans la partie suivante (paragraphe « Résultats ») sont ainsi présentés les différents tests de linéarisation qui ont été réalisés sur les vecteurs, suivis par la comparaison de méthodes permettant la sélection des clones contenant de nombreuses copies du vecteur d'expression.

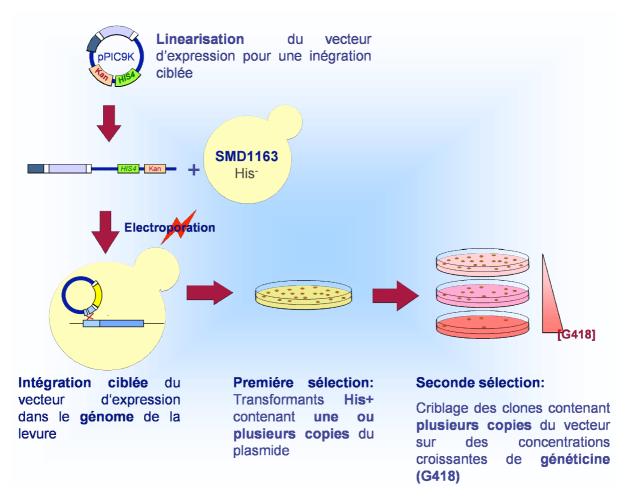


Figure 61 : Transformation de la levure P. pastoris et sélection des clones.

La figure schématise le protocole de transformation de la levure par électroporation ainsi que le criblage des transformants.

# II. Résultats

#### 1. Linéarisation

Afin de favoriser l'intégration ciblée d'un vecteur d'expression chez *Pichia pastoris*, il est nécessaire que ce vecteur soit linéarisé au niveau d'une séquence homologue à celle présente dans le génome de la levure où se fera l'intégration. Afin de cibler l'intégration le vecteur doit être coupé de telle manière qu'une séquence ayant au minimum 200 paires de bases (Cregg et al. 1998) d'ADN de *Pichia* soit présente à chacune des extrémités du vecteur.

De façon habituelle et efficace, c'est le site de l'enzyme Sacl présent sur le vecteur pPIC9K qui est généralement utilisé. Cependant, la présence de cette séquence dans 36% des gènes de la liste MePNet nous a amené à rechercher des sites de linéarisation qui soient moins fréquents sur les ADN des GPCR afin de pouvoir les utiliser pour la majorité d'entre eux. Cette analyse nous a permis de sélectionner deux sites de restriction : le site Sall est présent dans 6% des ADN de la liste, quant au site Pmel il est retrouvé dans seulement 2% de ces gènes. Dans le but de vérifier qu'une linéarisation autre que Sacl n'entraîne aucun effet néfaste sur la transformation et la qualité des transformants obtenus, nous avons réalisé une étude pilote sur un petit nombre de clones.

Cette étude consiste à comparer les résultats obtenus pour quatre RCPG différents, ainsi qu'un témoin négatif correspondant au vecteur seul sans insert, en utilisant deux à trois sites de linéarisation différents. Les RCPG sélectionnés appartiennent à la famille des récepteurs à sérotonine, les récepteurs 5HT1B, 5HT2B, 5HT5A et 5HT7. Les récepteurs 5HT5A et 5HT2A, contenant un site de restriction Sacl dans leurs phases codantes, n'ont pu être linéarisés qu'en utilisant les sites Sall et Pmel. Pour les deux autres récepteurs ainsi que pour le vecteur d'expression, les trois sites de linéarisation (Sall, Pmel et Sacl) ont été utilisés.

Tout comme le site *Sac*I, le site *Pme*I est localisé dans le promoteur du gène *AOX1* présent sur le vecteur pPIC9K. Ainsi, une linéarisation par cette enzyme permet une intégration ciblée du vecteur d'expression dans la région chromosomique du promoteur AOX1. Le site *SaI*I est, quant à lui, localisé dans gène *HIS4* porté par le plasmide, ce qui permet une intégration ciblée dans le gène homologue présent dans la levure (Figure 62).

Chapitre 6: Transformation intégrative de la levure et sélection des clones recombinants

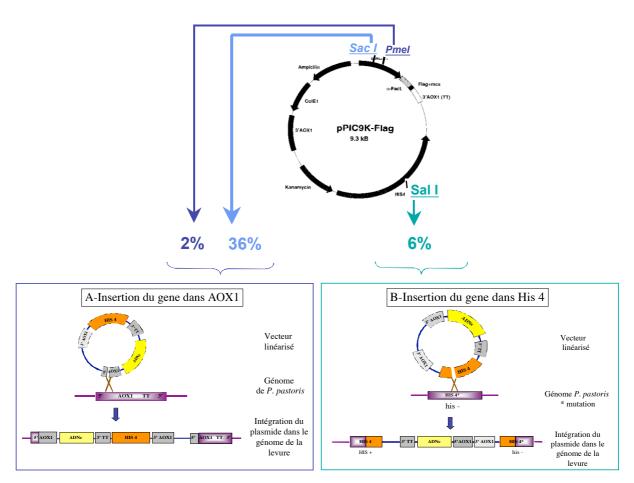


Figure 62: Vecteur d'expression utilisé dans le système P. pastoris.

Les trois sites de linéarisation testés son indiqués en couleurs. Le nombre d'ADN de la liste MePNet présentant le site de restriction dans sa séquence codante est indiqué pour chaque enzyme. La linéarisation par *Pmel* et *SacI* permet une intégration du vecteur dans le gène *AOX1*. La linéarisation par *SaII* permet une insertion du gène dans le locus *HIS4*.

Une fois linéarisés par ces différentes enzymes, les cinq vecteurs d'expression ont été introduits dans la levure *P. pastoris* par électroporation. Après une double sélection des clones sur un milieu minimum dépourvu d'histidine puis sur différentes concentrations en généticine, les clones obtenus sur les différentes concentrations de généticine ont été comptabilisés. Ces données n'ont pas révélé de variation significative entre les méthodes de linéarisation utilisant le site *Sacl* ou *Pmel* ni entre les différents récepteurs analysés (Figure 63). On observe sur la figure 63 et dans les conditions utilisées que des résultats légèrement meilleurs sont obtenus pour le site de linéarisation *Sal*I mais la différence n'est pas suffisamment importante pour être significative.

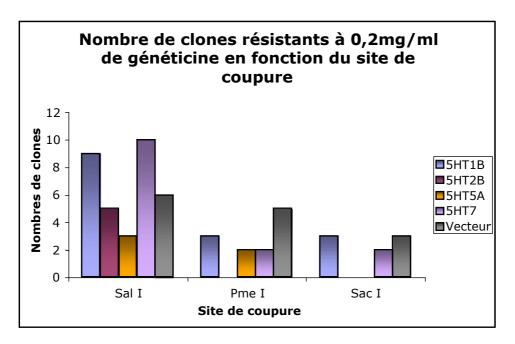


Figure 63 Comparaison du nombre de clones obtenus (à 0,2mg/ml de G418) en fonction du site de linéarisation.

Ce graphique représente un exemple des résultats obtenus. On n'observe pas de différence importantes du nombre de clones obtenus en fonction du site de linéarisation. Le vecteur seul sert de contrôle. Les récepteurs 5HT2B et 5HT5A, contenant le site *SacI* dans leurs séquences codantes, n'ont été linéarisés qu 'en utilisant les sites de restriction *SalI* et *PmeI*. Aucun clone n'a été obtenu à 0,2 mg/ml de généticine pour le récepteur 5HT2B lors d'une linéarisation par PmeI.

Nous avons ensuite voulu comparer l'impact de ces linéarisations sur les niveaux d'expression correspondants. Pour cela plusieurs clones représentatifs ont été mis en culture afin de procéder à l'induction de l'expression dans les conditions classiques décrites dans le manuel Multi-Copy *Pichia* expression kit édité par Invitrogen. Après lyse et préparation des fractions membranaires, les niveaux d'expression de ces clones ont été analysés par Western-blot (figure 64) en utilisant la streptavidine conjuguée à la peroxidase (qui interagit de manière spécifique avec les protéines biotinylées) comme moyen de détection. Un exemple des résultats de western-blot obtenus est présenté sur la figure 64.

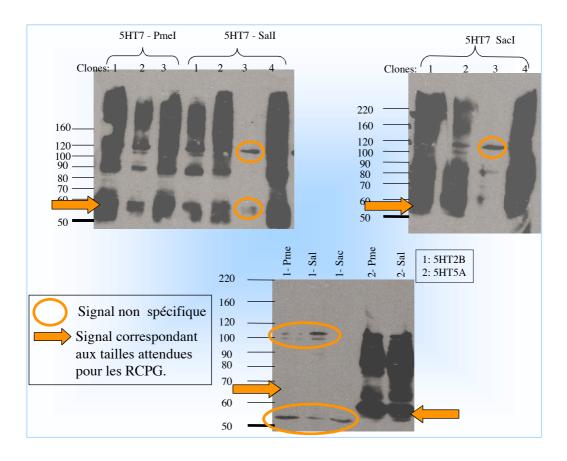


Figure 64 : Comparaison de l'expression en fonction du site de linéarisation. Trois western-blots illustrent les résultats obtenus. Ces western-blots ont été révélés à la streptavidine. Différents clones ( notés de 1 à 4) de trois récepteurs humains à sérotonine sont ici comparés : les récepteurs 5HT7 (taille attendue 60kDa) , 5HT2B (taille attendue 68kDa) et 5HT5A. (taille attendue 50kDa)

Pour l'ensemble des récepteurs testés, la comparaison des niveaux d'expression en fonction du site utilisé pour la linéarisation du vecteur n'indique pas de différence majeure.

On peut également noter que pour le récepteur 5HT2B aucune expression n'a pu être détectée quelle que soit la linéarisation testée. L'absence d'expression pour ce récepteur a été confirmée par des tests supplémentaires réalisés dans notre laboratoire ainsi que dans le laboratoire partenaire à Francfort. Ce récepteur fait par conséquent partie des rares RCPG qui ne s'expriment pas dans la levure *P. pastoris*.

En conclusion, la linéarisation utilisant le site *Pme*l semble être la plus appropriée pour les besoins du projet MePNet : d'une part, elle est utilisable pour la quasi-majorité des GPCR sélectionnés (98 %) et par ailleurs elle ne semble pas affecter le nombre de transformants obtenus après électroporation, ni les événements d'intégration multiple, ni le niveau d'expression des clones. Par conséquent, c'est cette enzyme qui a été sélectionnée pour la linéarisation de l'ensemble des vecteurs d'expression du projet, à l'exception de deux récepteurs, le récepteur humain à calcitonine CALR (*Sal*I) et le récepteur de levure à phéromone STE3 (*Sac*I).

# 2. Méthodes de criblage des transformants

Les événements d'intégration multiple peuvent influer et augmenter significativement la quantité de protéine hétérologue exprimée (Scorer et al. 1994; Romanos et al. 1998). Le vecteur pPIC9K contient le gène de résistance à la kanamycine (Kan<sup>R</sup>) d'*E.coli* qui confère à la levure *P. pastoris* une résistance à la généticine (G418) et qui permet de sélectionner aisément les clones ayant intégré plusieurs copies du vecteur. Selon la littérature, il apparaît que les différentes souches de *P. pastoris* disponibles possèdent une sensibilité variable pour la généticine. Ainsi la souche SMD1163 (*his4 pep4 prb1*) utilisée dans cette étude présente une plus forte sensibilité au G418 que les souches SMD1168, KM71 ou GS115 (Weiss et al. 1998). On peut également noter que le nombre de cellules étalées sur les boîtes supplémentées en G418 est critique car une densité cellulaire trop élevée favorise l'apparition de faux-positifs. Ainsi, dans les conditions standard et pour la souche SMD1163, l'insertion d'une seule copie du plasmide pPIC9K dans le génome de *P. pastoris* confère une résistance à la généticine à une concentration de l'ordre de 0,25 mg/ml.

Aussi bien pour les protéines excrétées que membranaires (Weiss et al. 1998) il a été démontré que le niveau d'expression ne corrèle pas toujours avec le plus grand nombre de copies intégrées (Romanos et al. 1995). En effet, le phénomène de surexpression peut entraîner une saturation des machineries régulant les mécanismes de translocation, de maturation et de trafic des protéines, pouvant affecter les niveaux d'expression et/ou le repliement correct des protéines exprimées.

Selon la littérature (Higgins et al. 1998), c'est statistiquement 1 à 10% des transformants de phénotype His+ qui peut contenir plus d'une copie intégrée. Par conséquent, c'est plusieurs milliers de transformants His+ qu'il faut cribler afin d'augmenter la probabilité de sélectionner les clones résistants à différentes concentrations de généticine et présentant un nombre variable de copies du vecteur étudié. Pour les besoins de notre étude, il est donc important de disposer d'une procédure fiable qui permette à la fois de cribler autant de clones recombinants tout en facilitant les étapes de manipulation en raison du grand nombre de récepteurs à étudier.

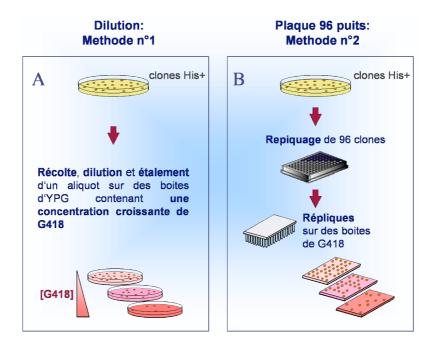
Deux méthodes différentes ont été comparées pour le criblage des clones résistants à la généticine. L'une d'elles est plus laborieuse (elle prend environ une semaine de plus) et permet le criblage d'un nombre limité de transformant mais est davantage conseillée pour diminuer le nombre de faux-positifs.

La première méthode, que nous appellerons « méthode de dilution » (figure 65), est techniquement plus facile à mettre en oeuvre, permet de cribler un grand nombre de clones, mais est cependant moins rigoureuse. Il s'agit d'une méthode où l'ensemble des colonies transformantes His+ sont regroupées puis diluées dans un volume donné de milieu, avant

Chapitre 6: Transformation intégrative de la levure et sélection des clones recombinants

d'être étalé sur des boîtes de milieu riche (YPG) contenant des concentrations croissantes de G418. Ainsi, l'ensemble des clones issus des différentes colonies sont criblés sur généticine.

La seconde, dite « méthode 96-puits » (figure 65), nécessite plus de manipulations, permet de cribler moins de clones mais présente l'avantage d'être nettement plus rigoureuse et fiable. Cette méthode consiste dans un premier temps à repiquer au cure-dent des clones transformants His+ dans des microplaques de type 96-puits contenant du milieu YPG et à les faire pousser jusqu'à ce que tous présentent la même densité cellulaire. Ces clones sont ensuite déposés à l'aide d'une pipette multi-canaux sur des boîtes de milieu YPG supplémentées en G418 pour tester leur seuil de résistance à la généticine. Cette seconde méthode permet de réduire l'isolation de faux-positifs en sélectionnant plus spécifiquement les clones. Les résultats indiquant le nombre de clones obtenus en fonction de la méthode utilisée ainsi que les concentrations de généticine auxquels ils peuvent résister, sont présentés sur la figure 66.



**Figure 65 : Sélection des transformants.**Deux méthodes permettent de sélectionner les clones résistants à la généticine (G418).

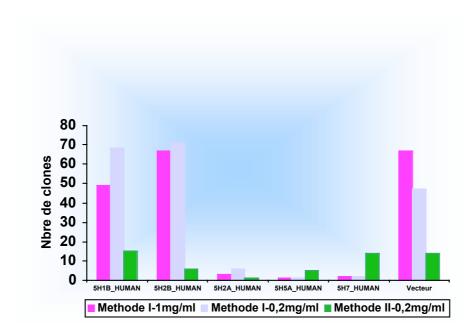


Figure 66 : Comparaison de la quantité de clones obtenus en fonction de la méthode de criblage utilisée. Pour cinq récepteurs de la sérotonine la methode utilisée ainsi que la concentration de généticine à laquelle ils résistent est indiquée. La methode I : méthode de dilution ; la methode II : methode « 96 puits ». Le vecteur correspondant à pPIC9K ne contient pas d'insert et sert de contrôle.

Chapitre 6: Transformation intégrative de la levure et sélection des clones recombinants

On peut clairement constater sur la figure 66 que, par rapport à la méthode 96-puits (méthode 2), la méthode de dilution (méthode 1) permet de sélectionner un plus grand nombre de clones résistants à une concentration donnée de généticine. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans ce cas, c'est l'ensemble des clones constituant une même colonie qui sont dilués avant d'être déposés sur milieu sélectif : plusieurs clones issus de la même colonie de départ peuvent être sélectionnés sur la même boîte et biaiser ainsi les résultats. L'étalement sur les boîtes de G418 de clones étant à différentes densités cellulaires peut également produire de faux positifs en entraînant un phénomène de coopération pour la résistance à la généticine.

À l'opposé, la méthode 96-puits garantie l'indépendance des clones résistants sélectionnés et est donc bien plus rigoureuse. En revanche, cette méthode n'a pas permis d'identifier des clones résistants à des concentrations aussi élevées en généticine tels que ceux sélectionnés grâce à la méthode de dilution. Cette variation doit être dû au faible nombre de transformants criblés en utilisant cette méthode.

À la lumière de ces résultats, il apparaît que la méthode de dilution, bien que moins rigoureuse, paraît la mieux adaptée aux contraintes du projet : elle permet de cribler rapidement l'ensemble des transformants His+ obtenus après électroporation, et de sélectionner un ensemble représentatif de clones résistants à une large gamme de concentration de généticine. C'est cette méthode que nous avons retenue pour l'ensemble du projet.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont ainsi permis de tester et valider une procédure globale permettant de gérer de manière efficace et fiable chacune des étapes allant de la préparation des ADN plasmidiques jusqu'à la sélection des clones *Pichia* recombinants et pour l'ensemble des RCPG du projet. Cependant, comme cela a été précisé précédemment, le nombre de copies intégrées le plus élevé n'est pas toujours synonyme de surexpression optimale et il convient donc d'analyser, pour chaque RCPG étudié, plusieurs clones d'expression, représentatifs du seuil de résistance à la généticine. Cette partie de l'étude est abordée dans le chapitre suivant consacré à l'expression proprement dite des RCPG.

# III. Matériels et Méthodes

#### 1. Matériels

Les enzymes utilisées pour la linéarisation Sall, Sacl et Pmel proviennent de la société Fermentas Life Science.

Les composants des milieux de culture proviennent de chez Difco (Beckton Dickinson) à l'exception de la peptone et de la L-histidine (Sigma) et de la généticine (Invitrogen).

Pour la révélation, une streptavidine couplée à la peroxidase (Pierce Perbio Science) est utilisée.

Pour le western-blot, la membrane utilisée pour le transfert est une membrane de PolyVinylldeneFluorid (PVDF, immobilonP, Millipore).

Les immunoblots sont révélés par chemiluminescence West Pico Super Signal enhanced de chez Pierce.

#### 2. Methodes

# 2.1 Digestion

L'isolation de l'ADN, l'analyse par les enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel d'agarose ainsi que les procédures de clonage ont été décrits dans le chapitre 5. Les constructions plasmidiques ont été vérifiées par séquençage.

Pour une transformation permettant une intégration ciblée les constructions plasmidiques ont été linéarisées par *Sacl*, *Sall* ou *Pmel*. La digestion est ensuite déposée sur un gel d'agarose afin d'être vérifiée. Le nombre de transformants peut être réduit si la digestion n'est pas complète. La digestion est ensuite extraite avec un mélange phénol : chloroforme : alcool isoamilique (25 :24 :1).

L'ADN est ensuite récupéré par précipitation alcoolique en utilisant 2 volumes d'éthanol et 10% d'acétate de sodium. La précipitation est réalisée à –20°C pendant 30 minutes. L'ADN est ensuite culotté par centrifugation à 13000g pendant 15 minutes et à 4°C. Les culots sont ensuite séchés et dissous dans de l'eau.

# 2.3. Préparation de levures électrocompétentes

Une préculture de la lignée SMD1163 est lancée sur la nuit dans un milieu d'YPG (1% d'extrait de levure, 2% de peptone et 2% de glucose). Cette préculture sert à inoculer une culture de 500 ml d'YPG en commençant à une OD600 de 0,1 jusqu'à atteindre une OD600 de 1,3-1,4 (OD600 =1 correspond à 5x 10<sup>7</sup> cellules). La culture subit ensuite 4 centrifugations de 5 minutes à 2000g et 4°C aux cours desquelles le culot est d'abord rincé dans 500ml puis 250 ml d'eau froide stérile avant d'être repris dans 20ml puis 1ml de sorbitol froid à 1M. Ces cellules électrocompétentes sont ensuite utilisées pour la transformation.

80  $\mu$ l de levures compétentes sont mélangées avec 5 à 20  $\mu$ g d'ADN linéarisé et sont transférées dans une cuve d'électroporation froide. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes dans la glace. En utilisant une cuvette de 0,2 cm on réalise une électroporation à 1500 Volt, 25  $\mu$ F et 200 ohms. 1ml de sorbitol froid à 1M est ensuite immédiatement ajouté. Le contenu de la cuvette est ensuite étalé sur des boîtes de milieu minimum (1,34% d'YNB, 4x10 $^5$ % de biotine, 2% de glucose et 1,5% d'agar).

#### 2.4. La méthode de dilution et la méthode « 96 puits »

Après transformation les clones recombinants His+ sont sélectionnés sur des boites de milieu minimum déficient en histidine (1,34% d'YNB, 0,00004% de biotine, 2% d'agar, 2% glucose).

La seconde étape de sélection permet de sélectionner les transformants contenant plusieurs copies du plasmide en les sélectionnant sur différentes concentrations de généticine.

La méthode de dilution consiste à récupérer l'ensemble des clones His+ en les diluant dans de l'eau stérile. Environ 1 x 10<sup>5</sup> cellules sont ensuite étalées sur des boîtes d'YPG-G418 agar ( 1% d'extrait de levure, 2% peptone, 2% glucose, 2% d'agar et 0,025 à 1 mg/ml G418). Une boîte ne contenant pas de généticine est utilisée pour comptabiliser le pourcentage de colonies résistantes à la généticine.

La méthode « 96 puits » consiste à inoculer chaque puits de deux microplaques contenant de l'YPG (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% de glucose) avec une seule colonie His+ (ce qui permet de cribler 180 recombinants His+). Les plaques sont incubées 2 jours à 30°C avant d'être utilisées pour inoculer de nouvelles plaques. Ceci est répété une nouvelle fois afin d'inoculer un troisième jeux de plaque. Ces cultures successives servent à obtenir une densité cellulaire identique pour tous les clones. Les cellules du troisième jeu de plaque sont ensuite déposées sur des boîtes d'YPG contenant différentes concentrations de généticine.

#### 2.5. Expression et induction

Pour l'expression des récepteurs, les cellules de levure His+ sont mises en culture dans un milieu BMGY (1% extrait de levure, 2% peptone, 1,34% d'YNB, 0,00004% de biotine, 1% (V/V) de glycérol, 0,1 M de tampon phosphate pH 6.0) jusqu'à atteindre une DO600 entre 2 et 8.

Pour l'étape d'induction, les cellules sont centrifugées (2000g, 5min à température ambiante) et elles sont re-suspendues à une DO de 1 dans un milieu BMMY (identique au milieu BMGY mais dans lequel le glycérol a été remplacé par 0,5% de méthanol et le tampon phosphate utilisé à un pH de 8).

#### 2.6. Préparation des extraits bruts et des membranes

Les levures induites pendant 18h sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans un tampon de cassage froid (50mM de tampon phosphate de sodium à pH 7.4, 2mM d'EDTA, 10% de glycérol et 1mM de PMSF ajouté extemporanément). Un volume égal de billes de verre est ajouté à la suspension et les cellules sont cassées par vortexage à 4°C pendant 30 secondes puis refroidies dans la glace pendant 30 secondes. Ce cycle est répété huit fois. 1mM de PMSF est rajouté au milieu du cycle.

L'ensemble est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les membranes est récupéré et correspond à l'extrait brut.

Pour la préparation de membranes, le surnageant est ultracentrifugé à 100 000g pendant 45 minutes, à 4°C. Les membranes sont ensuite reprises dans un tampon membrane (50mM Tris pH8, 120mM NaCl, 10% de glycérol) et homogéneisés à 4°C. La concentration des préparations membranaires est déterminée en utilisant le kit BCA de PIERCE. Les membranes sont ensuite rapidement congelées dans de l'azote liquide et conservées à –80°C.

#### 2.7. Immunodétection par Western-blot

20 μg d'extrait brut sont dilués dans un tampon de dépôt (62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 10% de glycérol, 2% de SDS, 2,5% de β-mercaptoéthanol, 0,01% de bleu de bromophénol) déposés sur un gel SDS de polyacrylamide 10% (Fling et Gregerson. 1986) et sont séparés dans un tampon de migration (Tris 25 mM à pH 6,8, glycine 192 mM, SDS 0,5 %). Le gel est ensuite transféré par électrophorèse sur une membrane d'Immobilon–P

Chapitre 6: Transformation intégrative de la levure et sélection des clones recombinants

poly(vinylidenefluoride) pendant une nuit à 30 Volt dans un tampon de transfert (2,5 mM Tris, 19 mM Glycine, 0,020% SDS et 20% d'éthanol).

Pour une révélation à la streptavine la membrane de PVDF est saturée 1h à température ambiante avec 3% de BSA dilué dans du PBST (140mM NaCl, 2,7mM Kcl, 10mM Na2HPO4, 1,8mM K2HPO4 pH7,4, et 0,05% de tween20).

La membrane subie ensuite trois lavages de 5 minutes avec du PBST suivi de deux lavages de 5 minutes avec du tampon streptavidine (composé d'un tampon PBS supplémenté avec 0,5M NaCl, 0,3% BSA, 0,1% Triton X100). La streptavidine est ensuite diluée au 4 :10000 dans du tampon de streptavidine et incubée 1h à température ambiante. Trois lavages de 5 minutes dans du PBST sont ensuite réalisés avant la révélation.

La streptavidine conjuguée à la peroxidase est ensuite visualisée par chemiluminescence en suivant le protocole du distributeur.

# Chapitre 7 : Expression des RCPG

# I. Introduction

À partir des clones recombinants sélectionnés sur généticine, la procédure habituellement suivie pour l'analyse de l'expression d'un RCPG se décompose en quatre phase majeures :

- Un nombre variable de clones (de 6 à 12) représentatifs des niveaux de résistance à la généticine sont cultivés en conditions « standard » d'expression ;
- Les culots cellulaires récoltés sont ensuite lysés et les fractions membranaires sont récupérées après ultracentrifugation pour être analysées ;
- Les niveaux d'expression sont évalués par la mise en oeuvre de techniques d'immunodétection et de fixation de ligand à l'équilibre permettant d'identifier le meilleur clone d'expression ;
- Dans une dernière phase une optimisation des conditions d'expression est souvent réalisée afin d'améliorer les niveaux d'expression.

Dans le cadre du programme MePNet, la dimension du projet est telle qu'il est nécessaire d'adapter cette procédure pour faire face aux contraintes rencontrées. En effet, pour la sélection des meilleurs clones d'expression, c'est pas moins de 600 à 1200 clones qu'il faudrait préparer et analyser pour l'ensemble des 100 RCPG étudiés, ce qui représente un travail plutôt fastidieux, compte tenu du faible débit des techniques utilisées. Par ailleurs, les méthodes d'immunodétection de type Western-blot habituellement utilisées ne sont pas les plus indiquées pour comparer les niveaux d'expression de plusieurs RCPG différents dont les profils de migration, caractéristiques de protéines très hydrophobes, sont plutôt diffus. De la même manière, les molécules radioactives mises en jeu dans les techniques de fixation de ligand à l'équilibre représentent un coût et des contraintes expérimentales très élevées.

Dans cette partie du projet, nous nous sommes donc attachés à développer une procédure fiable permettant de simplifier le plus possible l'étape de sélection des meilleurs clones d'expression pour la rendre compatible au débit imposé. Dans un deuxième temps, nous avons beaucoup travailler pour optimiser au mieux les niveaux d'expression des récepteurs étudiés. C'est autour de ces deux principaux thèmes que sont présentés dans ce chapitre les méthodes développées et les résultats obtenus.

# II. Sélection des clones d'expression

L'approche que nous avons envisagée pour simplifier cette étape est multiple : il nous faut déterminer un nombre minimal de clones à analyser, utiliser des formats de culture adaptés au débit recherché, mettre en oeuvre des techniques de lyse appropriées, simplifier la préparation des échantillons à analyser, et enfin mettre au point une technique adaptée pour la détection et la quantification des niveaux d'expression.

# 1. Culture et préparation des échantillons

#### 1.1. Format de culture

Différents travaux réalisés dans le laboratoire sur ce thème, ont montré que l'utilisation de 6 clones représentatifs des niveaux de résistance à la généticine était en général suffisant pour pouvoir repérer le meilleur clone d'expression d'un RCPG donné.

Par ailleurs, d'autres travaux se sont intéressés aux différents formats de culture utilisables pour cette étude. Les résultats obtenus après culture en plaque 96-puits profonds se sont montrés plutôt décevant, ceux résultants d'une culture en plaque 24-puits profonds se révélant plus intéressants dans certaines conditions favorisant une bonne aération. Une forte aération est en effet l'un des éléments importants pour le métabolisme de cette levure en présence de méthanol comme source de carbone et c'est ce qui explique les résultats obtenus lors ces expériences d'expression induite par le méthanol. Finalement, c'est une culture en tube de 50 ml de type Falcon (contenant 10ml de culture) qui a été retenue car constituant un bon compromis entre débit et fiabilité des résultats d'expression.

#### 1.2. Techniques de lyse

Une des caractéristiques majeures des levures en général et de *Pichia pastoris* en particulier correspond à la présence d'une paroi cellulaire épaisse qui entraîne une résistance à la plupart des méthodes classiques de lyse. Cette paroi est constituée d'un enchevêtrement de protéoglycanes qui constitue une barrière efficace pour la levure. Bien que des techniques utilisant des appareillages spécifiques et coûteux soient disponibles, peu sont compatibles avec un nombre élevé d'échantillons et de faibles volumes. Nous avons par conséquent optimisé et comparé deux méthodes de lyse cellulaire utilisables pour la levure *Pichia pastoris*, l'une mécanique utilisant des billes de verre, l'autre enzymatique utilisant la zymolyase.

La méthode de lyse mécanique faisant intervenir des microbilles de verre est la plus fréquemment utilisée pour les levures. Pour améliorer l'efficacité de lyse et de reproductibilité nous avons testé différentes conditions en faisant varier le rapport de volume des billes avec la suspension cellulaire, le temps de cassage et la quantité d'antiprotéase nécessaire. Nous avons ainsi déterminé qu'un rapport volumique échantillon:billes de 1:1 en présence de 1 mM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) pendant 15 minutes à 4°C sous forte agitation permettait d'obtenir des conditions de lyse efficaces et reproductibles. Par ailleurs, la compatibilité de cette technique avec des appareillages capables de vortexer 32 échantillons simultanément nous a permis d'adapter cette méthodologie à un débit relativement élevé. En outre, ce type de lyse peut également être réalisé sur de plus grands volumes grâce à l'utilisation d'appareillage de type Dyno-Mill (Bachofen, Bâle, Suisse).

La lyse enzymatique, quant à elle, est réalisée en utilisant la zymolyase. Cette enzyme est une ß-glucanase qui hydrolyse les polymères de glucose formant des ponts ß-1,3 avec la paroi cellulaire. Son action permet de déstabiliser la paroi cellulaire et d'obtenir des sphéroplastes qui peuvent alors être lysés par choc osmotique. Ainsi, lorsque les sphéroplastes sont mis en présence de SDS, les cellules éclatent, entraînant un éclaircissement de la suspension qui peut être suivit en mesurant l'absorbance à 800nm (Ovalle et al. 1999 ; Kitamura et al. 1971 ; Elorza et al. 1966) (% Sphéroplaste= 100-((DO800 au temp t / DO800 au temps O)x100)). Cette méthode de lyse présente de nombreux avantages puisqu'il est possible de mesurer à tout moment le pourcentage de sphéroplastes formés lors de l'incubation avec la zymolyase et donc de contrôler l'efficacité et la reproductibilité de la lyse. Elle peut être par ailleurs adaptée à un format haut débit de type plaque 96-puits.

Ces deux techniques ont été rigoureusement comparées, montrant des efficacités de lyse très similaires. Elles permettent toutes deux de produire des préparations compatibles avec les techniques d'immunodétection et les tests de fonctionnalité utilisés dans le projet. Cependant, l'utilisation de la zymolyase est beaucoup moins évidente pour des grandes préparations membranaires principalement pour des raisons de coût. À l'inverse, les billes de verre ont un coût négligeable et peuvent être ré-utilisés de très nombreuses fois. C'est donc cette méthode de lyse que nous avons retenue.

#### 1.3. Préparation des échantillons

Habituellement dans ce type d'étude, ce sont des échantillons enrichis en membranes qui sont préparés pour être analysées. Pratiquement, les lysats obtenus après cassage des levures sont centrifugés à basse vitesse (3000 g) afin d'éliminer les cellules non lysées ainsi que les gros débris cellulaires (et éventuellement les billes utilisées pour la lyse). L'extrait cellulaire brut obtenu est alors centrifugé à haute vitesse (ultracentrifugation 45 min à 100000 g) et le culot obtenu correspondant aux fractions membranaires totales est ensuite resuspendu et homogénéisé. Cette suspension enrichie en protéines membranaires correspond ainsi à un échantillon particulièrement bien adapté pour la détection de protéines exprimées telles que les RCPG. Cependant, l'ultracentrifugation est une méthode qui n'est absolument pas adaptée à la dimension haut débit puisque seulement 12 échantillons peuvent être centrifugés à la fois et doivent ensuite être manuellement homogénéisés à l'aide d'un potter.

Afin de pouvoir répondre aux contraintes du projet, nous avons donc conclu que les extraits cellulaires bruts correspondaient aux échantillons les plus adaptés pour la sélection des meilleurs clones d'expression, mais que pour cela il fallait développer une technique d'analyse appropriée.

#### 2. Mise au point d'une technique de détection adaptée

La technique habituellement utilisée pour la détection des RCPG consiste à réaliser un western-blot à partir de préparations membranaires. Les profils généralement obtenus comprenant plusieurs bandes avec des apparences diffuses sont typiques de cette famille de protéine membranaire et sont entre autres dus à la nature très hydrophobe des récepteurs. Bien que cette technique puisse permettre de rendre compte de l'intégrité des protéines ainsi que des problèmes éventuels de dégradation, elle ne permet pas de quantifier les signaux détectés ou de les comparer. En outre elle n'est techniquement pas adaptée pour des approches de criblage haut-débit.

Nous nous sommes donc tourné vers d'autres méthodes de détection immunologiques telles que les techniques de type ELISA ou Dot-blot. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de valider une approche globale fiable permettant la détection des différents RCPG produits à partir de différents formats d'échantillons et avec un débit élevé. Ces résultats sont regroupés dans un article scientifique présenté en annexe 1 qui doit être soumis pour publication. Le contenu de cet article est globalement résumé cidessous.

Dans un premier temps, les différents outils de détections disponibles dirigés contre les différentes étiquettes fusionnées aux RCPG ont été rigoureusement évalués afin d'utiliser ceux présentant les meilleures caractéristiques d'affinité et les plus faibles signaux non spécifiques. Les différents outils disponibles comprennent deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'étiquette FLAG, un anticorps monoclonal anti-histidine et de la streptavidine couplée à la peroxydase dirigée contre l'étiquette de biotinylation (figure 67A). Pour cette étude des techniques de biophysiques (Biacore) et d'immunodétection (ELISA et Dot-blot) ont été utilisées et nous ont permis de sélectionner l'anticorps M2 anti-FLAG.

Un vaste travail nous a ensuite conduit à comparer une stratégie d'adsorption des protéines à des approches de capture utilisant les étiquettes fusionnées aux récepteurs (Figure 67B), en testant pour cela différents supports solides tels que des plaques de polystyrène, des plaques contenant un mélange d'esters de cellulose (plaques Multiscreen, Millipore), des membranes de nitrocellulose ou de nylon (PVDF).

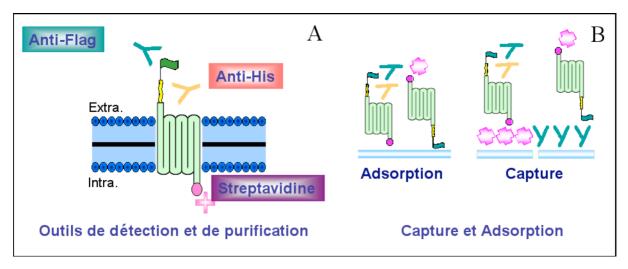


Figure 67 : Outils de détections (A) et de capture (B).

Les outils de détections sont présentés en A. Le schéma B présente les différentes possibilités de dépôt sur les suport : soit pas adsorption direct soit par capture en utilisant la streptavidine ou l'anticorps anti-Flag M2.

De façon résumée, les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que l'approche d'adsorption se révélait plus efficace que la capture. Par ailleurs, la sensibilité des résultats obtenus était proportionnelle à la capacité d'adsorption des différents supports testés.

Sur la base de ces observations, nous nous sommes concentrés sur l'élaboration d'une méthode d'adsorption de type Dot-blot qui soit fiable, reproductible et applicable à différents formats d'échantillon. Pour cela, nous avons comparé plusieurs types d'échantillons (extraits bruts cellulaires, fractions membranaires, récepteurs solubilisés en détergent), préparés dans différentes conditions (dénaturantes ou natives), déposés sur des

supports de type Nitrocellulose ou PVDF (capacités d'adsorption élevées) et révélés en optimisant les conditions de détection (concentration des anticorps primaires et secondaires notamment).

Ces études ont pu déboucher sur la détermination de la méthode de Dot-blot recherchée. Celle-ci utilise une membrane de nitrocellulose et des conditions adéquates permettant d'être appliquée à des extraits bruts, des préparations membranaires et des échantillons de récepteurs solubilisés. Par ailleurs, une gamme de concentration utilisant des préparations membranaires contenant le récepteur ß2 adrénergique exprimé dans la levure P.pastoris (fournis par le laboratoire d'Hartmut Michel à Francfort) peut servir de gamme standard. La détermination de l'intensité des signaux détectés par le logiciel d'analyse d'image Scion Image permet alors d'établir une courbe d'étalonnage et de corréler les niveaux d'expression des échantillons déposés avec ceux des membranes exprimant le récepteur ß2 adrénergique. Sachant que cet échantillon de référence contient 25 pmoles de récepteur actif par mg de membrane, la corrélation avec les échantillons peut également être extrapolée à des pmoles de récepteur par mg de membrane déposée. Ces données n'ont bien sûr qu'une valeur informative et servent surtout pour la comparaison relative de niveaux d'expression entre les clones et les récepteurs. La quantité de récepteurs capables de lier un ligand spécifique doit être par la suite déterminée de façon rigoureuse pour chaque récepteur par des tests de fixation de radioligand.

Dans le but justement de comparer les niveaux d'expression déterminés par cette méthode à des valeurs de liaison spécifique de ligand (« binding »), des préparations membranaires correspondant à un panel de onze récepteurs ont été analysées. La figure 68 présente les résultats obtenus en indiquant le nombre de sites de liaison mesuré (exprimé en pmol/mg) face au signal de détection obtenu pour chaque RCPG.

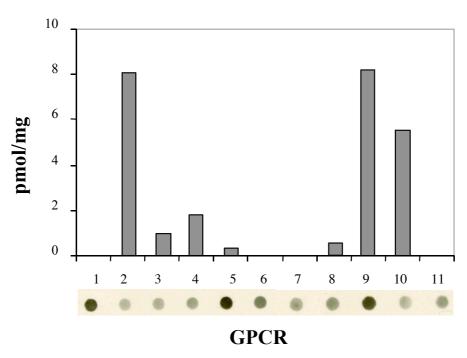


Figure 68: Tests de « binding ».

Binding réalisé sur les 11 récepteurs en utilisant une concentration en radioligand correspondant à environ 10 fois le Kd théorique. Les radioligands et ligand froid utilisés sont pour les récepteurs n°1(5HT1A): 3H-MPPF,et 5HT; n°2(5HT1B-HUMAN):3H-GR125743, GR127935; n°3(5HT1D-HUMAN): 3H-GR125743, Yohimbine; n°4(A2AB-HUMAN): 3H-Rauwolscine, Yohimbine; n°5(ACM1-MOUSE):3H-QNB, Atropine; n°6 (BRB2-HUMAN):3H-Bradykinin,Bradykinin; n°7 (GASR-HUMAN): 3H-L365260,L364718; n°8 (HH2R-HUMAN): 3H-Tiotidine, Cimetidine; n°9 (NK2R-HUMAN)3H-SR48968, SR48968; n°10 (NY1R-HUMAN): 3H-

NPY, BIBP3222; n°11 (V1BR-HUMAN): 3H-AVP, vasopressine

On observe aucune corrélation entre les niveaux d'expression et la quantitée de récepteur capable de lier un ligand. En effet, comme nous le verrons plus en détail plus loin dans ce chapitre, pour une quantité donnée de récepteurs exprimés, seule une certaine proportion est sous forme active et varie en fonction de chaque récepteur analysé.

Pour en revenir à la méthode de détection de type Dot-blot mise au point, les résultats sont parfaitement reproductibles et permettent de déterminer une valeur chiffrée des taux d'expression. Cette méthode présente non seulement l'intérêt de pouvoir établir un classement comparatif des différents récepteurs exprimés, mais elle a surtout l'avantage de s'appliquer à des échantillons bruts (préparation plus rapide) et dans un format compatible avec le haut débit et donc de correspondre à la méthode recherchée pour l'identification rapide des meilleurs clones d'expression.

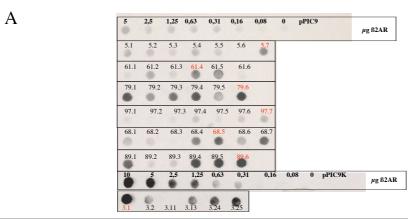
Numeros MepNet			FAMILLE	CLASSE
1	5HT1A_HUMAN	récepteur 5-hydroxytryptamine 1A	SEROTONINE	Α
3	5HT1D_HUMAN	récepteur 5-hydroxytryptamine 1D	SEROTONINE	Α
5	5HT1F_HUMAN	récepteur 5-hydroxytryptamine 1F	SEROTONINE	Α
57	CCKB_HUMAN	récepteur à Cholecyctokinine type B	CHOLECYSTOKININE	Α
60	GPRO_HUMAN	Probable RCPG (SLC1; GPR24)	HORMONE DE MELANO-CONCENTRATION	Α
61	HH2R_HUMAN	récepteur à Histamine H2	HISTAMINE	Α
68	MGR3_HUMAN	récepteur Metabotropique du glutamate 3	GLUTAMATE METBOTROPIQUE	С
69	MGR4_HUMAN	récepteur Metabotropique du glutamate 4	GLUTAMATE METBOTROPIQUE	С
79	NY1R_HUMAN	récepteur à Neuropeptide Y1	NEUROPEPTIDE	Α
89	P2YR_HUMAN	récepteur Purinergique P2Y1	PURINERGIQUE	Α
93	SSR1_HUMAN	récepteur à Somatostatine 1	SOMATOSTATINE	Α
97	STE3_YEAST	récepteur à phéromone de facteur A	PHEROMONE	D
103	V1BR_HUMAN	récepteur à vasopressine 1B	VASOPRESSINE	Α

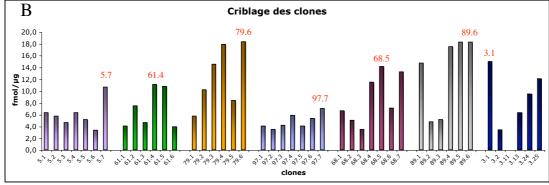
Tableau 12: Liste des treize récepteurs.

# 3. Validation de la procédure de sélection des meilleurs clones d'expression pour un panel de 13 récepteurs

Pour une sélection de treize récepteurs représentatifs de l'étude MePNet (Tableau 12), 6 à 7 clones différents, sélectionnés sur différentes concentrations en généticine ont été mis en culture dans des conditions classiques.

Ces conditions consistent à mettre en culture les cellules à 30°C sous agitation dans un milieu contenant du glycérol comme source de carbone (BMGY : « Buffered complex Glycerol Medium » pH6) jusqu'à ce qu'elle atteignent une densité optique à 600nm située entre 2 et 6 (afin d'être en phase exponentielle de croissance). Les cellules sont ensuite culottées puis resuspendues à une DO600 égale à 1 dans un milieu contenant du méthanol comme seule source de carbone (BMMY : « Buffered complexe Methanol Medium » pH8) afin de procéder à l'induction de l'expression. Au bout de 18 heures de culture, les cellules sont récoltées puis lysées par la technique de lyse mécanique décrite précédemment. Après dosage protéique à l'aide du test BCA (Pierce), 20µg d'extraits bruts ont été déposés sur membrane de nitrocellulose et révélés par dot-blot. La figure 69A illustre une partie des résultats que nous avons obtenus. La quantification du dot-blot (figure 69B) nous a permis de sélectionner pour chacun des treize récepteurs le clone présentant le meilleur niveau d'expression.





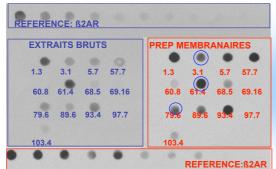
**Figure 69 : Criblage des clones de sept récepteurs par Dot-Blot.** Le Dot-Blot est présenté en A. La quantification est présentée dans le graphique B. Les clones, présentant les meilleurs niveaux d'expression, sont indiqués en rouge.

En comparant les niveaux d'expression de ces différents clones avec la concentration en généticine à laquelle ils résistent (tableau 13), on constate que certains clones présentent une importante résistance à la généticine mais n'expriment pas ou que très faiblement le récepteur en question, ou en tout cas ne correspondent pas aux meilleurs clones d'expression pour un récepteur donné. Ces résultats illustrent pleinement l'observation selon laquelle, il n'y a pas de corrélation directe entre le degré de résistance à la généticine, principalement lié au dosage génique, et les niveaux d'expression comme cela l'a déjà été décrit (Grunewald et al. 2004). En revanche, ils soulignent l'importance de cette étape de criblage pour la sélection des clones d'expression et l'adéquation de la procédure développée.

Clones R3	3.1	3.2	3.11	3.13	3.24	3.25
Concentration en G418	0,1	0,1	0,25	0,25	0,5	0,5
Clones R79	79.1	79.2	79.3	79.4	79.5	79.6
Concentration en G418	0,1	0,1	0,25	0,25	0,5	0,5
Clones R61	61.1	61.2	61.3	61.4	61.5	61.6
Concentration en G418	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tableau 13 : Les concentrations de généticine auxquelles les clones sont résistants. Les clones ayant les meilleurs niveaux d'expression sont indiqués en rouge.

Dans une étape suivante, nous avons comparé les niveaux d'expression des 13 récepteurs entre eux par la technique Dot-blot réalisée à partir des meilleurs clones d'expression sélectionnés pour chacun d'eux (figure 70). Dans cette expérience, nous avons voulu confronter les résultats obtenus à partir d'extraits bruts à ceux de préparations membranaires. Comme nous le prévoyions, les signaux détectés pour les préparations d'extraits bruts sont plus faibles que pour les préparations membranaires. En effet, ces dernières présentent une concentration plus importante en récepteurs puisqu'elles sont enrichies en membranes. Malgré tout, on peut observer une bonne corrélation des niveaux d'expression entre ces deux types de préparations protéiques ce qui confirme les résultats obtenus dans les expériences de mise au point du test Dot-blot (voir annexe 1).



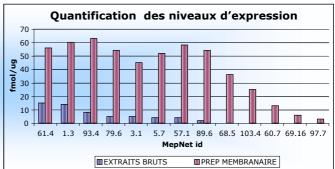


Figure 70 : Comparaison des extraits bruts et des préparations membranaires par Dot-Blot. Deux gammes différentes de concentration de récepteur  $\beta 2$  adrénergique ont été utilisées comme gamme étalon (voir code couleur) pour chaque type de préparation protéique. Les clones encerclés ont été sélectionnés pour les étapes ultérieures de solubilisation et de purification. La quantification du Dot a été réalisée en utilisant le logiciel Scion Image

# III. Analyses qualitatives et optimisation des niveaux d'expression

Alors que les tests d'immunodétection renseignent sur les quantités de récepteurs produits, il est indispensable pour les études structurales de déterminer si ces protéines sont correctement repliées dans les membranes, avec une conformation proche de leur structure native. Pour cela, la seule approche fiable dans un tel système d'expression consiste à en mesurer la fonctionnalité par leur capacité à fixer un ligand spécifique. Les résultats ainsi obtenus basés sur des techniques de fixation de ligand à l'équilibre (technique dite de « Binding »), permettent non seulement d'avoir accès aux constantes d'affinités du récepteur pour différents ligands spécifiques, mais permettent aussi de déterminer le nombre total de récepteurs actifs présents dans les échantillons testés.

Dans cette partie du chapitre c'est principalement à partir de ces données que nous avons évalué et optimisé les niveaux d'expression de différents récepteurs.

# 1. Expression dans les conditions standard d'induction

Dans son principe, la technique de fixation de ligand à l'équilibre consiste à incuber un échantillon protéique contenant le récepteur à analyser en présence d'un ligand spécifique radiomarqué. Les complexes radioligand/récepteur sont ensuite analysés par comptage radioactif. Une expérience similaire réalisée en parallèle en présence d'un excès de ligand non marqué permet de déterminer la quantité de radioactivité qui aura été liée de façon non spécifique : par soustraction de cette valeur à celle obtenue précédemment, il est possible de calculer la quantité de radioactivité liée de façon spécifique au récepteur présent dans l'échantillon. Lorsqu'on reproduit ce type d'expérience en augmentant la concentration de radioligand mise en jeu, on obtient une courbe de saturation nous permetant de déterminer le nombre total de site de liaison présent dans un échantillon donné ( $B_{max} = \infty$  maximal Binding ») ainsi que l'affinité du récepteur pour le ligand utilisé ( $K_D$ ).

Notre travail a consisté dans un premier temps à mettre au point les différentes conditions de « binding » pour chacun des récepteurs étudiés. Après un travail conséquent de recherches bibliographiques, il a fallu tenir compte de nombreux paramètres afin de sélectionner au mieux les ligands radioactifs et de réduire les coûts liés à l'utilisation de ces molécules. Nos choix se sont préférentiellement portés sur l'utilisation de ligands antagonistes plutôt qu'agonistes. En effet, pour un grand nombre des récepteurs que nous étudions, l'affinité décrite pour des molécules agonistes est fortement dépendante du couplage avec une protéine G spécifique. Ceci signifie que pour certains récepteurs exprimés dans des membranes de levure, l'absence de fixation spécifique de ces ligands pourrait ne refléter qu'une absence de couplage avec une protéine G et non un problème de repliement correct du récepteur dans la membrane. À l'inverse, la fixation d'antagoniste n'étant pas dépendante d'un tel couplage, les valeurs mesurées reflètent directement une conformation correcte du récepteur.

Les radioligands utilisés et les conditions déterminées pour la série des 13 récepteurs que nous avons analysé sont présentés dans le tableau 14.

En ce qui concerne quatre récepteurs parmi cette liste, aucun test de « binding » n'a pu être réalisé pour des raisons liées à une absence d'autorisation pour l'achat de certaines molécules (récepteurs MGR3 et MGR4) ou à la non-disponibilité commerciale de certains radioligands (récepteurs P2YR et STE3).

Les clones correspondant à chacun de ces récepteurs ont alors été placés en condition d'expression standard (cf. plus haut paragraphe II.3), et des préparations membranaires correspondantes ont été analysées par des méthodes de binding. Dans ces conditions, de faibles valeurs de « binding » spécifique ont été observées pour l'ensemble

des récepteurs exprimés (Tableau 14). Ainsi, pour les récepteurs numéros 1, 5, 57 et 103 aucune capacité à fixer un radioligand n'a pu être détectée dans les conditions testées et pour les récepteurs numéros 60, 93 et le récepteur hMOR des valeurs inférieures à 2,5 pmol/mg ont pu être détectées.

Globalement, même si ces résultats sont cohérents avec ceux décrits pour d'autres récepteurs exprimés dans des systèmes levure (Sarramegna et al. 2003), ils restent en de ça des quantités de récepteurs actifs qui permettraient d'envisager des études structurales. Des optimisations sont donc nécessaires pour améliorer ces niveaux d'expression.

N° MePNet	NOM	RADIOLIGAND	LIGAND	TAMPON	BINDING (en pmol/mg)
1	5HT1A_HUMAN	3H-MPPF (antago)	pMPPI (antago) pMPPF (antago) 5HT (ago)	50mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4	0
3	5HT1D_HUMAN	3H-GR125743 (antago)	Haloperidol (antago) Yohimbine (antago) 5HT (ago) Rauwolsine (antago) GR127935 (antago)	50mM Tris,10µM Pargyline,0,1% acide Acsorbique, 4mM CaCl2 pH7.4	1
5	5HT1F_HUMAN	3H-5HT (agoniste)	5HT (agoniste)	50mM Tris, 10µM pragyline, 4mM CaCl2, 0,1% ac. Ascobique, pH7.7	0
57	CCKB_HUMAN (GASR_HUMAN)	3H-L365260 (antago)	YM022 (antago)	50mM Tris, 10mM MgCl2, 1mM EDTA, 0,1% BSA pH 7.4	0
60	GPRO_HUMAN (SLC1)	125I-S36057 (antago)	MCH (ago)	25mM HEPES , 1mM CaCl2, 5mM MgCl2, 0,5% BSA, pH 7,4	1,2
61	HH2R_HUMAN	3H-Tiotidine (antago) 125I-APT (antago)	Cimetidine (antago) Tiotidine (antago)	50mM Na2HPO4, KH2PO4,pH7.4	0,4
68	MGR3_HUMAN				
69	MGR4_HUMAN				
79	NY1R_HUMAN	3H-NPY (ago)	GR23118 (antago) NPY (ago) PYY (ago) BIBP3222 (antago)	50mM Tris, 5mM KCI, 10mM NaCI, 2,5mM CaCl2, 5mM MgCl2, 0,5% BSA	5,7
89	P2YR_HUMAN				
93	SSR1_HUMAN	125I-Somatostatin14	Somatostatin14	10mM Hepes, 120mM NaCl, 0,5% BSA, pH 7,4	0,18
97	STE3_YEAST				
103	V1BR_HUMAN	3H-AVP	L-Arg8-Vasopressine	50mM Tris, 10mM MgCl2, 0,1% BSA	0
hMOR	MOR_HUMAN	3H-Diprenorphine	Naloxone	50mM Tris pH7.4	2,4

Tableau 14 : Conditions de liaison de ligand et résultats préliminaires.

Les radioligands, ligands froids et tampons utilisés pour chacun de ces récepteurs lors des études de « binding » sont présentés dans ce tableau. En vert sont indiqués les récepteurs pour lesquels aucun « binding » n'a été réalisé. En rouge sont indiqués les récepteurs présentant une fonctionnalité faible ou nulle. En noir sont indiqués les récepteurs qui ont été sélectionnés pour les prochaines étapes. Le récepteur hMOR (étudié dans le laboratoire) a été ajouté à cette liste de 13 récepteurs MePNet. Les valeures de « Binding » correspondent à un test à un seul point , dans des conditions d'induction classiques et en utilisant une concentration en radioligand 10 fois supérieure au Kd.

# 2. Analyse comparative de quelques récepteurs exprimés chez *Pichia pastoris* et dans le système SFV

Au sein du projet MePNet, l'étude de la fonctionnalité des récepteurs exprimés dans les cellules de mammifères infectées par le virus SFV (Semliki Forest Virus) est réalisée à Strasbourg. Ces études fonctionnelles m'ont donné l'occasion, au cours de mon travail de thèse, de réaliser une comparaison des niveaux d'expression et de la fonctionnalité d'un petit nombre de récepteurs produits par les deux systèmes d'expression.

Les échantillons qui ont été analysés correspondent d'une part à des clones de levure cultivés en condition standard d'expression, et d'autre part des lignées de type BHK (« baby hamster kidney ») infectées par des virus SFV recombinants procurées par le laboratoire BioXtal (K. Lundstrom, Lausanne) associé au programme MePNet. Pour ces deux types d'échantillons, les analyses ont été réalisées sur des préparations membranaires.

Dans un premier temps, les niveaux d'expression ont été analysés par des méthodes de Dot-blot et/ou de Western-blot (figure 71). Les résultats obtenus indiquent que les niveaux d'expression sont globalement plus importants chez la levure *P. pastoris* que chez les cellules de type BHK.

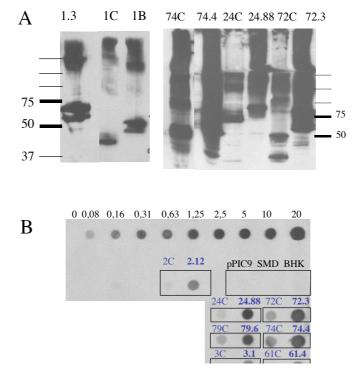


Figure 71 : Comparaison par immunodétections de différents récepteurs exprimés dans *Pichia* (1.3, 2.12, 3.1, 24.88, 61.4, 72.3, 74.4, 79.6) et dans des cellules BHK (1B,1C,2C,3C,24C,61C,72C,74C,79C). 20 $\mu$ g de membranes ont été utilisées pour le western-blot (A) révélé avec un anticorps anti FLAG et 1 $\mu$ g de membranes ont été déposées sur le dot-blot (B).

Des tests de fixation de ligand à l'équilibre ont été réalisés comparativement sur des récepteurs exprimés dans ces deux systèmes. Ces expériences nous ont permis d'observer des différences variables en fonction des récepteurs étudiés. Ainsi, dans certains cas tels que pour le récepteur à sérotonine 1D (récepteur 3) les résultats obtenus étaient plus faibles pour les cellules BHK (0,45 pmol/mg) que pour les cellules de levures (1pmol/mg) (figure 72B). Dans d'autres cas, tel que pour le récepteur à histamine H2, aucune différence importante n'a pu être observée (figure 72A). Dans le cas du récepteur à sérotonine 1A, on a obtenu des valeurs de l'ordre de 12 pmol/mg pour des cellules BHK (dans des conditions non saturantes) alors qu'aucune fonctionnalité n'a été détectée pour le récepteur exprimé dans la levure *P.pastoris*.

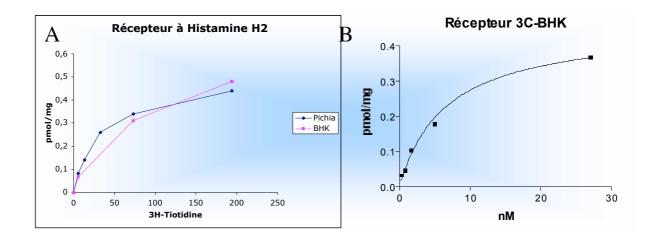


Figure 72 : Courbes de saturation.

A. comparaison du récepteur à Histamine H2 exprimé dans Pichia Pastoris et dans des cellules BHK. B. Courbe de saturation réalisée sur le récepteur à sérotonine 1D exprimé dans des cellules BHK. (Voir figure 77A pour les résultats de saturation concernant le récepteur à serotonine 1D exprimé dans *Pichia*)

Par conséquent, il est difficile de tirer des conclusions sur la valeur d'un système d'expression par rapport à l'autre tant il apparaît que dans les conditions testées, l'efficacité des deux systèmes varie surtout en fonction des récepteurs analysés. Comme cela est présenté dans les paragraphes suivants, les optimisations réalisées pour l'expression des RCPG dans la levure *P. pastoris* ont permis d'apporter une nette amélioration à ces résultats. Il en a été de même pour le système d'expression SFV et une étude globale réunissant les résultats d'immunodétection et les tests de liaisons réalisés sur les RCPG exprimés grâce à ce système dans le cadre du projet MePNet est présentée en Annexe 2.

#### 3. Optimisation globale des conditions d'expression

Les résultats obtenus lors d'une induction dans des conditions classiques se situent aux alentours du pmol de récepteur actif par mg de protéines. Ces valeurs n'étant pas en adéquation avec des études de cristallographie, nous avons tenté de les améliorer en optimisant les conditions d'induction. En effet, il a déjà été démontré que d'importantes variations de la production de récepteurs actifs pouvaient être observées en changeant la température d'induction, en ajustant le pH (Sarramegna et al. 2002, Li et al. 2001), en ajoutant des ligands spécifiques ou d'autres additifs (Sizmann et al. 1996 ; Weiss et al. 1998, Grunewald et al. 2004). Nous avons donc réalisé une étude globale dans laquelle de nombreux paramètres ont été testés tels que la composition des milieux d'expression, la température de culture, le temps d'induction, la concentration cellulaire au moment de l'induction et l'ajout d'additifs variés.

#### 3.1. Le temps d'induction

Une des optimisations les plus évidentes à réaliser consiste à déterminer le temps d'induction le plus approprié pour l'ensemble des récepteurs. Cette analyse de l'expression en fonction du temps d'induction a été réalisée pour trois récepteurs à sérotonine différents, les récepteurs 5H2A, 5H5A et 5H7. Des préparations d'extraits bruts ont été analysées par Western-blot afin de comparer l'expression au cours du temps (figure 73).

Les résultats obtenus indiquent que l'expression débute à partir de 2H d'induction qu'elle devient significative dès 4H d'induction et qu'elle atteint un maximum entre 18H et 24H.

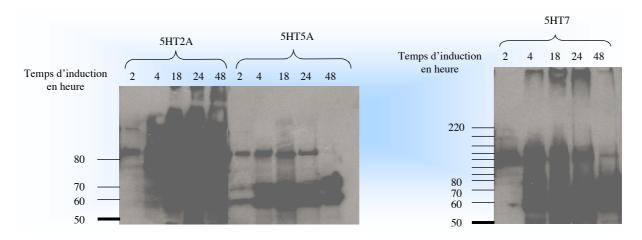


Figure 73 : Comparaison de l'expression à différents temps d'induction pour trois différents récepteurs.

Des extraits protéiques bruts ont été déposés sur un western-blot qui a été révélé par streptavidine-HRP.

Afin de déterminer plus précisément le temps d'induction optimal, un dot blot (figure 74B) a été réalisé sur les 13 récepteurs précédemment étudiés afin de comparer les niveaux d'expression obtenus à 18H et 24H d'induction. Les résultats indiquent clairement que les meilleurs niveaux d'expression sont obtenus après 18H d'induction (page 160, figure 74A), à l'exception des récepteurs n° 5 (GPRO\_HUMAN) et 13 (V1BR\_HUMAN) pour lesquels on n'observe pratiquement aucune différence entre 18H et 24H d'induction. Par conséquent, une induction de 18H a été appliquée pour l'ensemble des récepteurs exprimés dans *P.pastoris* au sein du projet MepNet.

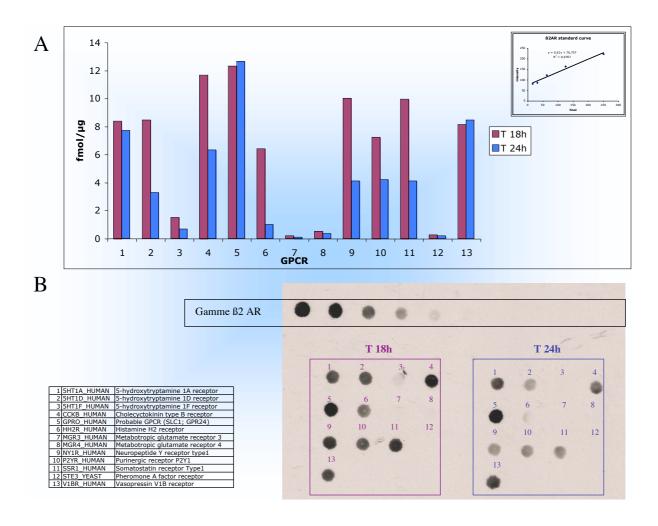


Figure 74 : Comparaison des inductions de 18h et de 24h.

Les niveaux d'expression obtenus après des inductions de 18h et 24h sont comparés par dot-blot pour 13 récepteurs. Le dot-blot est réalisé à partir de préparation d'extraits bruts (A) et révélé par un anticorps M2. Le logiciel Scion Image ainsi que la gamme de concentration de membranes \( \mathbb{G} \)2 adrénergique ont été utilisés pour la quantification des intensités (B).

#### 3.2. La concentration cellulaire lors de l'induction

Habituellement l'induction se réalise à une concentration cellulaire de l'ordre de  $5.10^7$  cellules /ml ( $DO_{600nm} = 1$ ), à partir d'une préculture en phase exponentielle de croissance. Afin d'augmenter les rendements obtenus en utilisant le même volume de culture, une induction utilisant une concentration cellulaire 10 fois plus élevée a été analysée et comparée à l'induction classique (en utilisant un panel de treize récepteurs).

Les résultats obtenus à la suite d'une induction à une  $DO_{600}$  de 1 ou de 10, ont été comparés sur dot-blot (figure 75B) afin de permettre une quantification (figure 75A) des niveaux d'expression obtenus. On constate ainsi pour les 13 récepteurs testés qu'une induction à une DO de 10 permet de doubler les niveaux d'expression pour quatre d'entres eux (les récepteurs n° 1, 3, 68 et 69). Pour trois des récepteurs testés, l'induction à DO de 10 n'améliore que légèrement les niveaux d'expression (récepteurs n°61, 79 et 93). Cependant pour cinq des récepteurs testés (récepteurs n°57, 60, 69, 97 et 103) le niveau d'expression est plus important lorsque l'induction se réalise à DO de 1. Par conséquent, l'effet dû à une induction à DO de 10 n'est pas identique pour l'ensemble des récepteurs testés et reste dépendant du récepteur étudié.

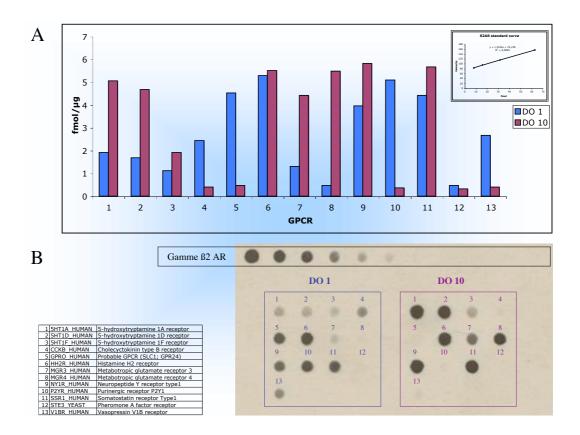


Figure 75 : Comparaison des niveaux d'expression de 13 récepteurs obtenus après une induction à DO1 et DO10.

Les 13 récepteurs ont été induits à une DO1 et de 10. L'expression a ensuite été analysée par Dot-Blot. Le Dot-blot a été révélé par un anticorps anti-M2(B). Une gamme de membrane de récepteur ß2 adrénergique a servi de standard. La quantification de ce Dot à été réalisée grâce au logiciel Scion Image (A).

À la suite de cette étude, une analyse globale de l'effet d'une induction à DO de 10 a été réalisée sur l'ensemble des récepteurs du projet. Les résultats obtenus étaient comparables à ceux qui sont présentés ici et varient pour chacun des récepteurs testés. Des études complémentaires portant sur la comparaison de la fonctionnalité des récepteurs obtenus (par des tests de « binding ») ont indiqué que l'activité des récepteurs était généralement moins bonne lors d'une induction à DO de 10.

L'induction à une DO de 1 a par conséquent été conservée comme approche générale.

#### 3.3. Les autres paramètres testés

Plusieurs autres paramètres ont été testés afin d'améliorer la quantité de récepteurs actifs exprimés. Parmi ceux-ci, on peut citer l'utilisation de différents types de milieux, l'emploi de différentes concentrations de méthanol additionnées ou non de glycérol, la

modulation du pH des milieux de culture. Si ces ajustements n'ont pas montré d'effets particulièrement significatifs sur les niveaux d'expression des RCPG étudiés, en revanche d'autres tels que la modification de la température d'induction, l'addition de ligand spécifique au milieu d'expression ou d'autres additifs tels que le DMSO (Dimethyl sulfoxide) ou encore l'histidine se sont par contre révélés beaucoup plus intéressants. Pour ces quatre paramètres en effet, une étude systématique sur un panel de 20 RPCG (tableau 15) a permis de proposer une méthode de criblage permettant d'optimiser de façon efficace les niveaux d'expression de tels récepteurs. Ces résultats sont regroupés dans un manuscrit (Annexe 3) qui doit rapidement être soumis pour publication.

MePNet ID	Uniprot	Name
2	5H1B_HUMAN	5-Hydroxytryptamine 1B Receptor
3	5H1D_HUMAN	5-Hydroxytryptamine 1D Receptor
10	5H5A_HUMAN	5-Hydroxytryptamine 5A Receptor
15	A1AB_HUMAN	Alpha-1B adrenergic Receptor
16	A2AB_HUMAN	Alpha-2B adrenergic Receptor
20	AA2A_HUMAN	Adenosine A2A Receptor
23	ACM1_HUMAN	Muscarinic Acetylcholine M1 Receptor
24	ACM1_MOUSE	Muscarinic Acetylcholine M1 Receptor
25	ACM2_HUMAN	Muscarinic Acetylcholine M2 Receptor
26	ACM2_PIG	Muscarinic Acetylcholine M2 Receptor
43	D2DR_HUMAN	Dopaminergic D2 Receptor
44	D2DR_MOUSE	Dopaminergic D2 Receptor
61	HH2R_HUMAN	Histaminergic H2 Receptor
72	NK1R_HUMAN	Substance-P Receptor
74	NK2R_HUMAN	Substance-K Receptor
75	NK2R_RAT	Substance-K Receptor
76	NK3R_HUMAN	Neuromedin-K Receptor
79	NY1R_HUMAN	Neuropeptide Y Receptor type 1
85	OPRK_HUMAN	Kappa-type Opioid Receptor
86	OPRK_MOUSE	Kappa-type Opioid Receptor

Tableau 15 Tableau des 20 RCPG.

Les couleurs regroupent les RCPG par famille.

Parmi les différents paramètres testés, l'effet de l'ajout de ligand a déjà été décrit comme permettant d'améliorer les quantités de récepteurs fonctionnels exprimés en jouant très probablement un rôle d'agent stabilisant, à la manière de molécules chaperonnes (Weiss et al 1998, Grunewald et al 2004). En revanche, l'effet du DMSO et de l'Histidine sont présentés à notre connaissance pour la première fois comme des paramètres influant sur la production de récepteurs fonctionnels dans la levure *P. pastoris*.

L'effet précis du DMSO dans le processus d'expression de protéines membranaires n'est actuellement pas connu. Cependant, cette molécule présente de nombreuses particularités intéressantes comprenant notamment le pouvoir de traverser les membranes lipidiques (Kolb, K. H. et al., 1967) sans causer aucun dommage. Cette particularité semble être dûe à sa nature polaire, sa capacité à accepter les ponts hydrogènes et à sa structure petite et compacte. Ces différentes propriétés lui permettent également de s'associer à différents constituants cellulaires tels que des protéines, des acides nucléiques...

(<u>www.dmso.org</u>). On peut supposer que lors de l'ajout simultané de ligand et de DMSO dans le milieu de culture, ce dernier facilite (grâce à son pouvoir de transport) l'entrée du ligand dans la cellule.

L'effet lié à l'ajout d'histidine dans le milieu d'induction, bien que moindre, n'a également jamais été décrit. Cet effet peut être associé à un rôle de complément nutritif pour la souche SMD1163 utilisée qui est déficience en histidine. Par ailleurs, l'utilisation d'une étiquette 10 histidines fusionnée aux récepteurs également remarquer peut augmenter les besoins de la levure en histidine lors de l'expression, et l'ajout d'histidine dans le milieu peut s'avérer favorable.

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous ont permis de constater un effet important de la température et du DMSO. Cet effet récepteur dépendant permet d'atteindre des facteurs d'amélioration variant entre 2 et 5 par rapport aux conditions classiques d'induction. Une d'amélioration plus faible a été obtenue lors de l'ajout de ligand ou d'histidine, avec un facteur compris entre 1,5 et 2.

Pour certains des récepteurs étudiés, le cumul de l'ensemble des paramètres ayant un effet positif a permis d'observer un effet coopératif et d'améliorer encore davantage les niveaux d'expression de récepteurs fonctionnels. Confrontés à des résultats d'expériences de Dot-blot, ces données ont confirmé l'hypothèse selon laquelle les optimisations réalisées ont pour effet non pas d'augmenter la quantité totale des récepteurs exprimés, mais plutôt d'améliorer le rapport récepteurs fonctionnels / récepteurs totaux.

Cependant, les résultats obtenus pour l'ensemble de ces paramètres peuvent être encore améliorés en affinant plus précisément les paramètres testés. En effet, on a pu observer que l'utilisation d'une concentration de 5% de DMSO était plus favorable pour le récepteur dopaminergique D2 (figure76A) qu'une concentration de 2,5% telle que nous l'avions utilisée en première approche. De manière identique, l'utilisation d'une température de 15 °C nous a permis d'améliorer davantage les résultats obtenus avec le récepteur à opioïde de type kappa (figure 76B). L'effet récepteur-dépendant est encore plus important pour l'ajout de ligand puisqu'on a pu observer une modulation des niveaux d'expression variant en fonction de la nature et de la concentration du ligand utilisé.

Par conséquent ce premier criblage permet de sélectionner les cibles les plus intéressantes sur lesquelles une étude plus approfondie peut permettre d'améliorer encore davantage les résultats.

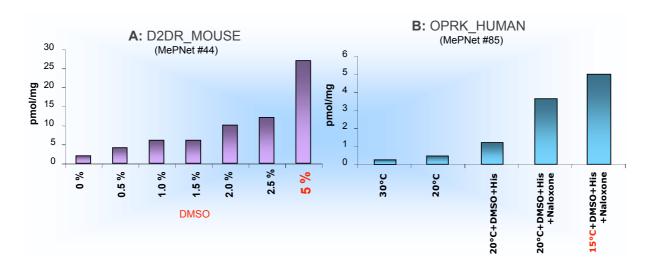


Figure 76 : Effet du DMSO et de la température sur deux récepteurs.

- A. Effet de différentes concentrations de DMSO sur le récepteur dopaminergique.
- B. Effet de différentes températures d'induction sur le récepteur à opioide kappa.

En suivant ce type d'approche, on a ainsi pu nettement améliorer les résultats obtenus pour les récepteurs à sérotonine 1D (#3), à histamine H2 (#61) et à neuropeptide Y1 (#79) en réalisant une étude plus approfondie des conditions d'expression.

#### 4. Optimisations spécifiques pour trois RCPG

Ce paragraphe concerne plus précisément l'étude de trois différents récepteurs qui se sont révélés être des cibles suffisamment intéressantes pour une analyse plus approfondie. Il s'agit des récepteurs à sérotonine 1D, à neuropeptide Y1 et à histamine H2.

Afin de déterminer la quantité totale de récepteurs fonctionnels dans des conditions standard d'induction, des courbes de saturation ont été réalisées (figure 77). On obtient respectivement des valeurs de Bmax de 1,2 pmol/mg, 0,7 pmol/mg et 5,6 pmol/mg pour les récepteurs n° 3, 61 et 79. L'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands respectifs (K<sub>D</sub>) a été estimée à 8,8 nM pour le n°3, 38nM pour le n°61 et 3nM pour le n°79. Ces valeurs d'affinités sont proches de celles décrites dans la littérature (Domenech et al. 1997, Parker et al. 1998), à l'exception de celle du récepteur n°61 (Histamine H2) qui est près de 3x plus faible (Leurs et al 1994). Cette particularité peut s'expliquer par le fait que la composition lipidique des membranes de levure est différente de celles des cellules de mammifères (absence de cholesterol par exemple), ce qui peut avoir une répercussion sur la conformation des protéines membranaires exprimées et modifier notamment l'affinité d'un récepteur pour son ligand.

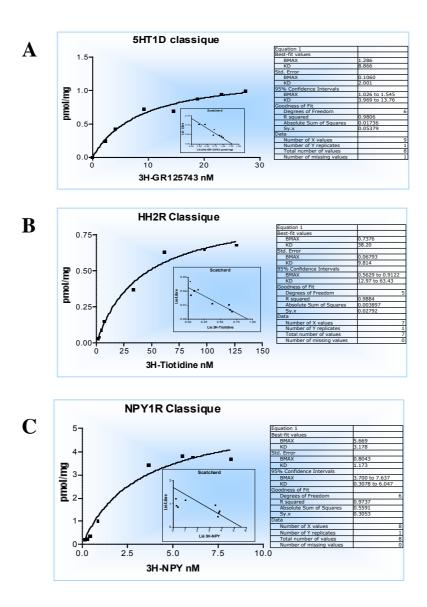


Figure 77 Courbes de saturation réalisées dans des conditions d'induction classique.

A. Récepteur à sérotonine 1D. B. Récepteur à histamine H2. C. Récepteur à neuropeptide Y1.

Les valeurs de  $B_{\text{max}}$  observées sont plutôt basses et c'est pourquoi, afin de tenter d'améliorer ces résultats, nous avons criblé différentes conditions d'induction en faisant varier divers paramètres. Pour cela, nous avons d'abord testé ces conditions d'induction par des mesures de binding en un seul point (une seule concentration de radioligand testée, proche du  $K_D$ ) avant de réaliser des courbes de saturation en utilisant celles des conditions d'inductions les plus optimisées.

#### 4.1. Le récepteur à sérotonine 1D (5H1D\_HUMAN)

Nous avons débuté notre étude concernant l'optimisation des conditions d'expression du récepteur à serotonine1D par la comparaison de la fonctionnalité de trois différents clones qui présentaient d'intéressants niveaux d'expression sur dot-blot (voir dot-blot figure 69, les clones 3.1, 3.24 et 3.25). Notons que le clone 3.1 présentait le plus important niveau d'expression.

Les différents paramètres testés comprennent l'augmentation de la densité cellulaire lors de l'induction et l'ajout de DMSO dans le milieu d'induction. Les résultats présentés sur la figure 78 indiquent que dans les conditions classiques d'induction le clone 3.25 présente les meilleurs résultats. Une induction à DO600 de 10 n'améliore que très légèrement les valeurs des clones 3.1 et 3.24 alors qu'elle a un effet négatif pour le clone 3.25. De plus, l'ajout de DMSO dans le milieu d'induction ne présente un effet positif que pour le clone 3.1.

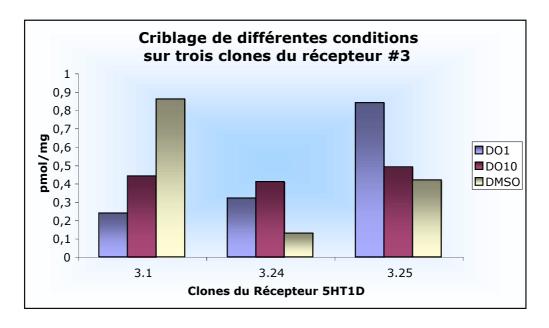


Figure 78 : Comparaison de différents clones et différentes conditions.

L'expérience est réalisée à 9nM. Les différentes conditions testées correspondent à des conditions standard avec une induction à DO600=1 ou une induction à DO600=10, ainsi qu'à une condition d'induction comprenant l'ajout de 2,5% de DMSO dans le milieu d'induction

Dans une seconde étape, nous avons observé l'effet de la diminution de la température d'induction (figure 79). Les résultats obtenus pour ce récepteur indiquent de meilleures valeurs lors d'une induction à 30°C.

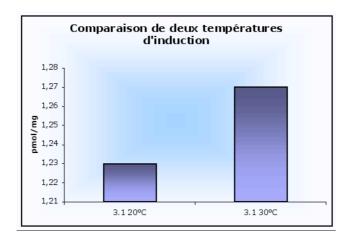


Figure 79 : Comparaison de deux températures d'induction. Induction à 20 et 30°C.

L'ajout de ligand dans le milieu d'induction joue souvent un rôle stabilisateur en se fixant sur le site de liaison du récepteur et en favorisant certainement ainsi une conformation active, le clivage de la séquence signal et le transport cellulaire (Grunewald et al. 2004). Nous avons par conséquent sélectionné une condition d'induction comprenant l'ajout de DMSO et d'histidine, puis nous avons observé l'effet de l'ajout de différents ligands dans le milieu d'induction (figure 80).

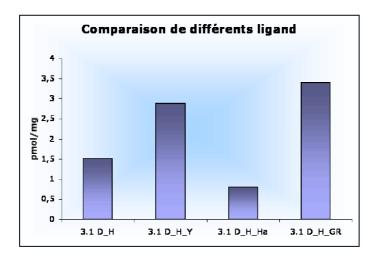


Figure 80 : Comparaison de l'ajout de différents ligands dans le milieu d'induction.

D: 2,5% DMSO; H: 0,04% Histidine; Y: 315 $\mu$ M Yohimbine; Ha:60 $\mu$ M Haloperidol; GR: 18nM GR127935. Concentration de3 H-GR125743: 15nM (environ 2 fois le Kd)

Dans cet exemple, l'ajout du ligand GR127935 apporte le meilleur résultat. Cependant afin de vérifier si l'effet du ligand est dépendant de la concentration utilisée nous avons comparé l'effet du GR127935 à différentes concentrations (figure 81).

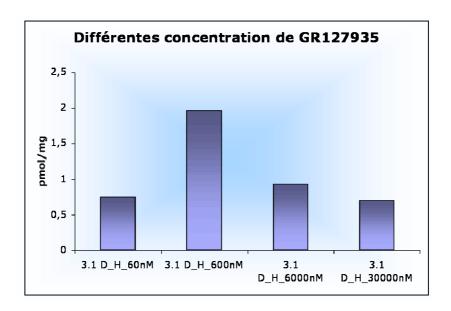


Figure 81 : Comparaison de l'effet dû à l'ajout de différentes concentrations de ligand.

À partir d'une condition comprenant 2,5% de DMSO et 0,04% d'Histidine différentes concentrations de GR127935 sont ajoutées dans le milieu d'induction. La concentration de radioligand utilisée est de 6nM.

La comparaison de différentes concentrations de ligand (GR127935) indique un resultat ayant l'allure d'une courbe gaussienne. On constate par conséquent que la concentration ayant un effet optimal est située à une concentration de 600nM de GR125743. Au-dessus ou au-dessous de cette concentration l'effet diminue. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation. La première suppose qu'au-dessous d'une concentration de ligand, il n'y a pas suffisamment de ligand pour agir sur l'ensemble des récepteurs à stabiliser et qu'au dessus d'une certaine concentration la molécule peut avoir un effet néfaste pour la cellule.

La seconde hypothèse suggère que le ligand lié au récepteur va, au-delà d'une certaine concentration, masquer les sites de liaison du récepteur. Il va ainsi, lors de la réalisation de tests de « binding », entrer en compétition avec le radioligand en empêchant sa fixation.

La condition optimale d'induction déterminée pour le récepteur à sérotonine 1D correspond à une induction à 30°C en présence de DMSO, d'histidine et de 600nM de GR127935. Afin de vérifier si cette condition améliore la quantité totale de récepteur capable de lier un ligand nous avons réalisé une courbe de saturation en utilisant ces nouvelles conditions (figure 82).

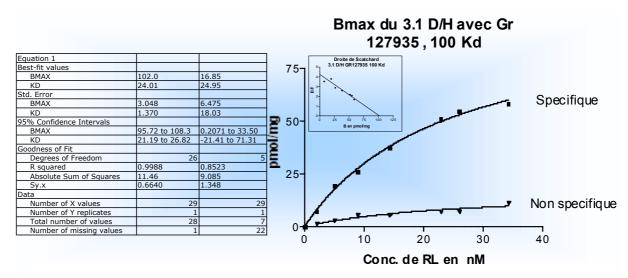


Figure 82 : Courbe de saturation sur les conditions optimisées du récepteur à serotonine 1D.

La courbe de saturation et la droite de scatchard ont été réalisés en utilisant les conditions d'induction suivantes : 30°C/DMSO/Histidine/GR127935 600nM

Le Bmax obtenu est d'environ 100 pmol/mg ce qui signifie que les optimisations réalisées ont permis d'améliorer de 60 à 100 fois les valeurs de départ. On notera cependant que l'affinité du récepteur pour son ligand a nettement diminué par rapport aux conditions classiques.

#### 4.2. Le récepteur à Histamine H2 (HH2R\_HUMAN)

Les trois clones donnant les meilleurs niveaux d'expression sur dot-blot (figure 69) comparés par des tests de binding (figure 83) montrent que la quantité de récepteurs fonctionnels produits par ces trois clones corrèle avec leurs niveaux d'expression et que par conséquent le clone 61.4 semble le plus intéressant. Une induction à 20°C au lieu de 30°C n'améliore pas les valeurs de « binding ». Cependant l'ajout de DMSO ou de DMSO additionné d'histidine a dans les deux cas un effet positif.

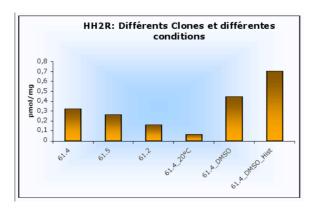


Figure 83 : Comparaison de différents clones et différentes conditions. Les trois clones ont été exprimés dans des conditions standard puis l'effet de la température, du DMSO et de l'histidine a été comparé sur le clone 61.4. La concentration de radioligand utilisée est de 17 nM.

Différentes concentrations de cimétidine et d'halopéridol ont été comparées (figure 84). Dans cette expérience, l'halopéridol permet d'obtenir la plus importante amélioration, notamment à une concentration de 15µM. Au-delà de cette concentration, les résultats sont moins intéressants. On peut cependant remarquer constater que la concentration optimale de cimétidine n'a sans doute pas été atteinte au cours de cette expérience.

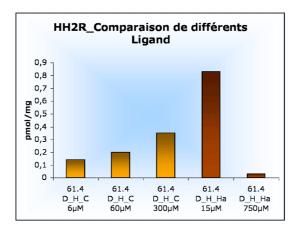


Figure 84 : Comparaison de différents ligands. Le clone 61.4 est induit en présence de DMSO (D) d'Histidine (H) et de Cimetidine (C) ou d'Haloperidol (Ha).

La comparaison de différentes concentrations d'halopéridol (figure 85), réalisée par la suite, indique que la concentration la plus optimale en ligand est de 1,5µM.

La réalisation d'une courbe de saturation en utilisant la tiotidine tritiée et des conditions d'induction optimales comprenant du DMSO, de l'histidine, et de l'halopéridol à

1,5µM n'a pas donné de résultat tout à fait satisfaisant (figure 86). En effet, la saturation n'a pas été atteinte, mais cela nous permet tout de même de quantifier un Bmax supérieur à 50 pmol/mg.

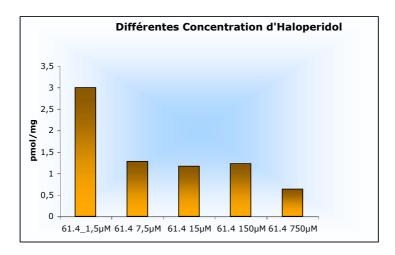


Figure 85 : Comparaison de l'effet de différentes concentrations d'halopéridol.

Le binding a été réalisé à une concentration en radioligand de 10nM

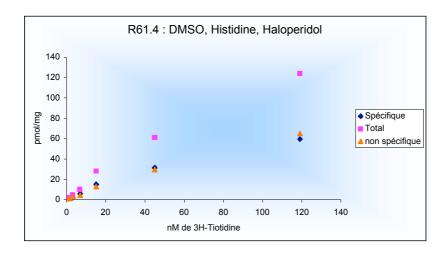


Figure 86 : Expérience de fixation de 3H Tiotidine à l'équilibre.

Pour atteindre la saturation il faudrait utiliser des quantités de radioligand supérieures à 120nM. Ces concentrations étant trop importantes, une autre alternative a été envisagée, utilisant un ligand iodé sur des membranes obtenues à partir de cultures réalisées dans des conditions optimisées. Le radioligand utilisé, le 1251-iodoaminopotentidine (1251-APT), a un  $K_D$  théorique inférieur à 1nM (Leurs R. et al.,1994) ce qui correspond à une affinité supérieure à celle de la tiotidine ( $K_D$  théorique de 13nM).

Les résultats de la courbe de saturation réalisée en utilisant le ligand iodé APT (figure 87) présentent effectivement une affinité plus forte que celle obtenue avec le radioligand tritié (0,5nM), mais indiquent en revanche une valeur de Bmax n'excédant pas 3,4 pmol/mg.

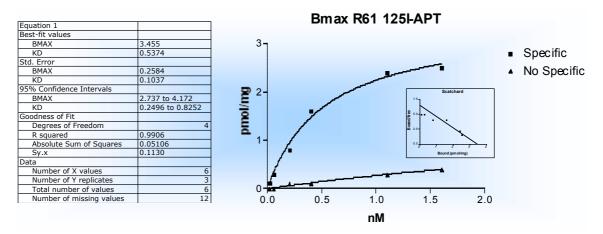


Figure 87 : Courbe de saturation de 125I-APT. Courbe de saturation représentant la liaison spécifique et non spécifique et la droite de scatchard .

L'obtention de ces deux types de résultats liés à l'utilisation de différents radioligands nous a conduit à formuler l'hypothèse de la présence de deux sites de liaison, l'un de basse affinité présentant un Bmax élevé observé lors de l'utilisation de la tiotidine tritiée et l'autre de forte affinité présentant un Bmax faible observé lors de l'utilisation de l'APT iodé.

La tiotidine a déjà été décrite comme pouvant avoir différents sites de liaison (Batzri et Harmon. 1986; Rising et Norris. 1985; Monczor et al. 2003) ont montré que la tiotidine pouvait se fixer sur deux sites de différentes affinités. Afin de confirmer dans cette étude la présence de deux sites de liaison il serait nécessaire de réaliser des expériences complémentaires et d'obtenir, par exemple, une droite de sctachard en utilisant la tiotidine tritiée afin d'observer la présence de ces différents sites de liaison.

#### 4.3. Le récepteur à neuropeptiude Y1 (NY1R\_HUMAN)

Les premiers résultats obtenus lors du criblage de différentes conditions pour le récepteur à neuropeptide Y1 sont présentés sur la figure 88. Ils indiquent, dans un premier temps qu'une induction à une température de 20 °C donne de meilleurs résultats qu'une induction classique à 30°C.

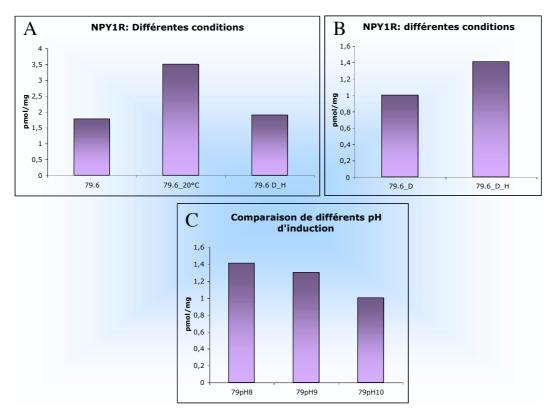


Figure 88 : Effet de la température, du DMSO, de l'Histidine et du pH sur le récepteur NPY1. L'effet de la température est présenté sur le graphique A, l'effet du DMSO et de l'histidine sur le graphique A et B, tandis que l'effet du pH du milieu d'induction est présenté sur le graph C.

L'ajout dans le mileu d'induction de DMSO et d'histidine n'améliore que très peu les conditions basales. Cependant en analysant séparement l'effet du DMSO et de l'Histidine on a pu observer un effet cumulatif de ces deux additifs (figure 88B).

La levure étant capable de pousser dans une large gamme de pH (Sarramegna et al. 2002), nous avons tenté de faire varier ce paramètre afin d'en étudier l'effet sur le récepteur à neuropeptide Y1. Les résultats obtenus en testant trois différents pH confirment que le pH8 utilisé dans nos conditions standard correspond aux conditions optimales pour ce récepteur (figure 88C). Les conditions alors sélectionnées comprennent une température d'induction de 20°C, du DMSO et de l'histidine.

Par la suite en utilisant ces conditions d'induction, nous avons testé l'effet de l'ajout de différents ligands. Les résultats sont présentés sur la figure 89. L'ajout de différentes concentrations de l'antagoniste GR23118 (1229U91 ouGW1229) n'améliore pas les résultats par rapport aux conditions optimisées jusqu'alors décrites. Un très léger effet positif est cependant observé lors de l'ajout de 10 nM de NPY (Figure 89B) ou de 2 nM de l'antagoniste non-peptidique BIBP3226 (Figure 89C). Un criblage plus fin de ces concentrations n'a pas permis d'améliorer ces résultats.

On constate à nouveau que les résultats obtenus lors du criblage de différentes concentrations de ligand présentent l'allure d'une courbe gaussienne.

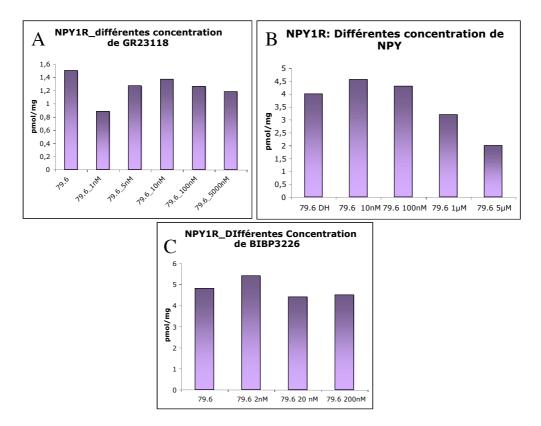


Figure 89 : Effet de différents ligands sur le récepteur NPY1. L'effet de différentes concentrations des antagonistes GR23118 (A) et BIBP3226 (C) a été analysé ainsi que l'effet du ligand endogène NPY(B).

Des courbes de saturation ont été réalisées sur le récepteur NPY1 dans les conditions optimisées suivantes : 20°C, DMSO, Histidine (figure 90). Les résultats obtenus varient en fonction des échantillons testés entre 20 et 60 pmol/mg. Ces résultats correspondent à une optimisation améliorant de quatre à douze fois les résultats obtenus dans les conditions standard.

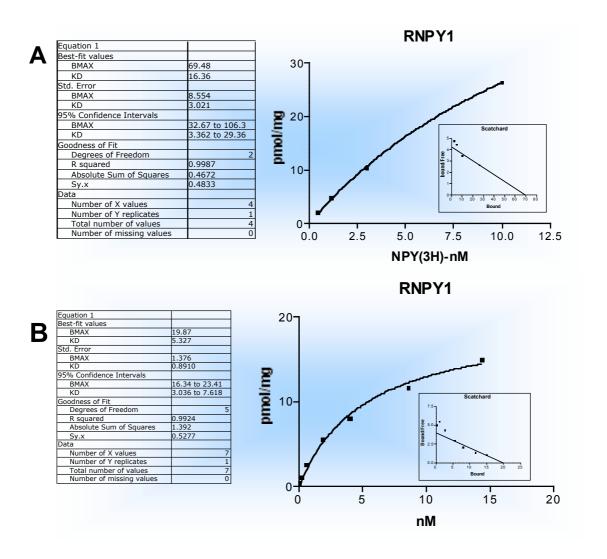


Figure 90 : Courbe de saturation du récepteur NPY1. Présentation de deux courbes de saturation utilisant le radioligand 3H-NPY et le ligand froid GR23118.

#### **III. Conclusion**

Les études réalisées sur les différentes étapes comprenant l'optimisation des protocoles de détection de l'expression, de lyse cellulaire et d'induction nous ont permis de déterminer les conditions les plus favorable à l'expression des RCPG et les méthodologies correspondant au cadre haut débit du programme MepNet.

Nous avons ainsi développé et validé une procédure globale adaptée au projet permettant d'accélérer de façon fiable la sélection des meilleurs clones d'expression, de l'étape de culture des clones à la préparation et à l'analyse des échantillons (Annexe 1). Une classification des récepteurs étudiés a pu ensuite être réalisée en fonction de leurs niveaux d'expression.

Afin de déterminer la quantité de récepteur correctement replié nous avons réalisé des tests de fixation de ligand à l'équilibre. Ces tests ont tout d'abord été réalisés en parralléle sur des récepteurs exprimés dans deux systèmes d'expression différents : *P. pastoris* et des cellules de mammifères infectées par le virus de la forêt de semliki (Annexe 2). Les résultats observés dans des conditions standard varient en fonction des cibles mais paraissent de manière générale plus intéressants dans le système de la levure.

Afin d'obtenir des quantités plus importantes de récepteurs actifs nous avons analysé l'effet de différents paramètres sur l'expression de récepteur fonctionnel (annexe 3). Quatres paramètres critiques ont été étudiés (température d'induction, ajout de ligand, DMSO et Histidine). L'utilisation d'une méthode généraliste de criblage utilisant ces quatres paramètres nous permet d'améliorer les résultats observés pour l'ensemble des cibles testées (20 RCPG). Cependant un criblage plus approfondi de ces paramètres permet d'obtenir pour trois cibles sélectionnées (#3, #61, #79) des optimisations bien plus intéressantes.

Les résultats réunis dans cette partie de l'étude nous ont permis d'améliorer de façon très significative la quantité de récepteur actifs pour un certain nombre de clones et disposer du matériel nécessaire pour pouvoir entamer des études de solubilisation et de purification.

# IV. Matériels et méthodes

# 1. Conditions d'expression et d'induction

Pour l'expression des récepteurs, les cellules de levure His+ sont mises en culture dans un milieu BMGY (1% extrait de levure, 2% peptone, 1,34% d'YNB, 0,00004% de biotine, 1% (V/V) de glycérol, 0,1 M de tampon phosphate pH 6.0) jusqu'à atteindre une DO600 entre 2 et 8.

Pour l'étape d'induction, les cellules sont centrifugées (2000g, 5min à température ambiante) et elle sont resuspendues à une DO de 1 dans un milieu BMMY (identique au milieu BMGY mais dans lequel le glycérol a été remplacé par 0,5% de méthanol et le tampon phosphate utilisé a un pH de 8). Lors des optimisations le milieu d'induction peut être supplémenté avec 2,5% de DMSO, 0,04% d'Histidine et différentes concentrations de ligand.

### 2. Lyse mécanique (billes) et enzymatique (zymolyase)

Pour la lyse mécanique les levures induites pendant 18h sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans un tampon de cassage froid (50mM de tampon phosphate de sodium à pH 7.4, 2mM d'EDTA, 10% de glycerol et 1mM de PMSF ajouté extemporanément). Un volume égal de billes de verre est ajouté à la suspension et les cellules sont cassées par vortexage à 4°C pendant 30 secondes puis refroidies dans la glace pendant 30 secondes. Ce cycle est répété huit fois. 1mM de PMSF est rajouté au milieu du cycle.

L'ensemble est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les membranes est récupéré et correspond à l'extrait brut.

Pour la préparation de membranes, le surnageant est ultracentrigugé à 100 000g pendant 45 minutes, à 4°C. Les membranes sont ensuite reprises dans un tampon membrane (50mM Tris pH8, 120mM NaCl, 10% de glycerol, 1mM PMSF) et pottérisées à 4°C. La concentration des préparations membranaires est déterminée en utilisant le kit BCA de PIERCE.

Les membranes et les extraits bruts sont ensuite rapidement congelés dans de l'azote liquide et conservés au -80°C.

La lyse enzymatique par zymolyase s'inspire du protocole décrit en 1996 par Talmont et al. (Talmon F. et al., 1996).

Après induction les cellules sont centrifugées (10 minutes à 3000g) et sont rincées avec de l'eau puis avec un tampon SED (1M de sorbitol, 25 mM d'EDTA, 50mM de DTT).

Les cellules sont resuspendues à une concentration de 100 de DO600 par ml (ou 10<sup>9</sup> cellules /ml) dans un tampon SCE (Sorbitol 1M, 10mM de tampon citrate pH 5.8, 1mM d'EDTA) contenant 30 µg/ml de zymolyase. La digestion est réalisée à 30°C pendant 30minutes. Les sphéroplastes sont alors récupérés après une centrifugation de 1000g pendant 20 minutes et sont lavés avec 1M de sorbitol.

Les cellules sont ensuites resuspendues dans un tampon de lyse (50mM tampon phosphate de sodium à pH 7.4, 1mM d'EDTA, 5% de glycerol et 1mM de PMSF)avant d'être lysées par potterisation à 4°C. Une centrifugation de 10 minutes à 10000g permet d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est alors centrifugé à 100000g pendant 35 minutes afin de récupérer les membranes. Le culot membranaire est traité de la même manière que dans le cas du cassage mécanique utilisant les billes de verre.

#### 3. Analyse par immunoblot

20 μg d'extrait brut sont dilués dans un tampon de dépôt (62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 10% de glycerol, 2% de SDS, 2,5% de β-mercaptoethanol, 0,01% de bleu de bromophenol) déposés sur un gel SDS de polyacrylamide 10% (Fling et Gregerson 1986) et sont séparés dans un tampon de migration (Tris 25 mM à pH 6,8, glycine 192 mM, SDS 0,5 %). Le gel est transferé par électrophorèse sur une membrane d'Immobilon–P poly(vinylidenefluoride) pendant une nuit à 30 Volt dans un tampon de transfert (2,5 mM Tris, 19 mM Glycine, 0,020% SDS et 20% d'ethanol).

Le test de dot-blot est réalisé dans un format de 96 puits en utilisant un appareillage de microfiltration Bio-dot. 20µg d'extrait brut ou 1µg de préparation membranaire sont solubilisés dans un tampon de dépôt et adsorbés sur une membrane de nitrocellulose.

Une gamme de concentration de préparation membranaire de récepteur ß2 adrénergique exprimé dans la levure *P.pastoris* est déposée et utilisée comme standard. Dans le cas d'un dot-blot d'extrait protéique 20µg d'extrait brut de levure SMD1163 sont ajoutés à la gamme utilisée comme standard.

Pour l'immunodétection la membrane de nitrocellulose ou la membrane de PVDF est saturée 1h à température ambiante avec 3% de BSA dilué dans du PBST (140mM NaCl, 2,7mM Kcl, 10mM Na2HPO4, 1,8mM K2HPO4 pH7,4, et 0,05% de tween20). Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps anti-FLAG M2 dilué a une concentration finale de 0,6mg/ml dans un tampon de PBST supplémenté avec 3% de BSA. Puis, le complexe protéine anticorps est révélé avec un anticorps secondaire de mouton antianticorps de souris et couplé à la peroxidase IgG dilué à une concentration de 1:10000 dans

du PBST supplémenté avec 3% de BSA. L'incubation des anticorps a lieu pendant 1h à température ambiante et est suivie de trois lavages de 5 minutes dans du PBST.

Pour une révélation à la streptavine, après avoir saturé la membrane on réalise trois lavages de 5 minutes avec du PBSTsuivi de deux lavages de 5 minutes avec du tampon streptavidine (composé d'un tampon PBS supplémenté avec 0,5M NaCl, 0,3% BSA, 0,1% Triton X100). La streptavidine est ensuite diluée au 4 :10000 dans du tampon de streptavidine et incubée 1h à température ambiante. Trois lavages de 5 minutes dans du PBST sont ensuite réalisés avant la révélation.

Les anticorps ou la streptavidine conjugués à la peroxidase sont visualisés par chemiluminescence (Supersignal ,Pierce) selon le protocole du distributeur.

#### 4. Test de fixation de radioligand à l'équilibre (« Binding »)

Les expériences sont réalisées en utilisant les différents radioligands, ligands froids et tampons présentés dans le tableau 14. Les membranes sont diluées dans 250µl de tampon de « binding » en présence du radioligand pour la détermination de la liaison totale et en présence d'un excès de ligand froid pour la détermination de la liaison non spécifique. Les échantillons réalisés en triple sont ensuite incubés à 25°C pendant 1h. Les ligands libres et liés sont séparés par l'intermédiaire d'une filtration rapide utilisant le Brandel ou le TopCount. La filtration est réalisée sur des filtres whatman GF/B ou Perkin-Elmer GF/B 96-unifilter (préincubés dans 0,3% de polyethylenimine). Après trois lavages utilisant du Tris-HCL pH7.4, la radioactivité retenue est mesurée en utilisant un liquide de scintillation. Les tests en un seul point sont réalisés à des concentrations non saturantes en radioligand. Les courbes de saturation utilisent différentes concentrations de radioligand et sont analysées par GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA) afin de déterminer les valeurs de Bmax et de Kd.

# Dot-blot as a versatile and high-throughput immunodetection test to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*

Gabrielle ZEDER-LUTZ<sup>1</sup>, Nadia CHEROUATI<sup>1</sup>, Christophe REINHART<sup>2</sup>, Franc PATTUS<sup>1</sup> and Renaud WAGNER<sup>1</sup>\*

1UMR7100 ESBS/CNRS, Dept Recepteurs et Proteines Membranaires, blvd S. Brant, BP10413, 67412 Illkirch Cedex, France

2 Max Planck Institute for Biophysics, Max-Planck-Institute of Biophysic, Marie-curie-Str. 13-15, D-60439 Franfurt am Main, Germany

# **ABSTRACT**

One of the major objectives of the Membrane Protein Network programme (MePNet, www.mepnet.org) is to express a hundred of G protein-coupled receptors (GPCRs) in the yeast *Pichia pastoris*. In order to select for the best behaving clones at each step of the receptor preparation, from expression procedures down to solubilisation attempts, an antibody-based protein assay was developed. This assay allowed to quantify the expression of FLAG-tagged GPCRs present in various sample types, from crude *Pichia pastoris* extracts to native membrane preparations and solubilized fractions. It combined the advantages of ELISA specificity, sensitivity of enhanced chemiluminescence detection and high-throughput screening of arrayed protein extracts, and could be used to detect as low as 0.001% FLAG-tagged recombinant receptor present in a crude extract preparation. Using the previously described human \( \textit{B2}\)-adrenergic receptor expressed in \( \textit{Pichia pastoris}\) (Weiss HM et al., 1998) as a standard, the method was applied to sort recombinant GPCR clones, to rank expressed receptors and to screen for detergent receptor solubilization efficiency.

<sup>\*</sup>Corresponding author

#### INTRODUCTION

Research in the field of membrane protein has undergone exponential growth during the last decade. Actually, membrane proteins are involved in essential biological mechanism in a cell life such as communication, selective transport and energy transformation, and it is estimated that one third of the genes of a given organism encodes integral membrane proteins (Schatz G et al., 1996). Among the different families of membrane proteins, the G protein-coupled receptors (GPCRs) comprise the largest one. This family presents a great pharmacological importance since about 50% of all today marketed drugs mediate their effects via interaction with GPCRs (Klabunde T and Hessler G, 2002). While detailed structural information would help to understand the function and molecular dynamics of these receptors,, high resolution three-dimentional (3D) structural data are still missing due to the membranous and hydrophobic nature of these proteins, their inherant flexibility and their very low abundance. Actually, the only three-dimentional GPCR structure available so far is the one of bovine rhodopsin (Palczweski K et al., 2000) for which large amounts of pure material could be obtained thanks to its exceptional natural overexpression in the retina. For all the other GPCRs, heterologous expression of the receptor genes in an efficient expression system remains a prerequisite to obtain the sufficient yields of pure and homogenous proteins needed for structural biology studies (Schertler G et al., 1992; Grisshammer R and Tate CG, 1995). The largest dedication to structural biology of GPCRs in Europe is conducted since october 2001 through the privately funded MePNet consortium (Membrane Protein Network). The goal of this programme is to express 100 GPCRs in three different expression systems (Escherichia coli, Pichia pastoris and mammalian cell lines infected with recombinant semliki forest virus-SFV) with the aim to select for the best behaving targets at each step of the study, from expression procedures down to solubilisation, purification, and cristallisation attempts (Lundstrom K, 2004). Because of the large dimension of this GPCR study, the goal is also to raise up helpful statistical data with the challenge to develop and apply the needed methodologies that have to appropriately respond to the project's constraints.

Among the three systems selected in this programme, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has proven to be a common powerful system for the expression of heterologous genes (for a review, see Macauley-Patrick S, 2005). Actually, over several remarkable qualities, this organism combines the advantages of a unicellular organism allowing easy

genetic manipulation and rapid cell culturing, with the ability to achieve the majority of the protein maturation processes as a eukaryotic host. Moreover, related to its particular methylotrophic metabolism, this host exhibits a highly regulated promoter, namely the alcoholoxidase1 promoter (pAOX1), that allows to generate a strong and inducible expression of recombinant genes in presence of methanol as a carbone source. Among all the protein that have already been successfully expressed in *P. pastoris*, the production of several GPCRs have been reported such as the 5HT5A serotonin receptor (Weiss HM et al., 1995), the B2adrenergic receptor (Weiss HM et al., 1998), the μ-opioid receptor (Sarramegna V et al., 2002, 2005), the CB2 cannabinoid receptor (Feng W et al., 2002), the D2S dopamine receptor (de Jong LA et al., 2004; Grunewald S et al., 2004), the endothelin A (Cid G et al., 2000) and endothelin B receptors (Schiller H et al., 2000). In all these studies, as well as for the present MePNet project, the genes of interest have been cloned under the control of the pAOX1 promoter and introduced into the yeast genome via integrative transformation. Then, since multiple integration events can occur, a selection step was required to screen for the clones exhibiting the best overexpression patterns which are varying according to the gene dosage (Grunewald S., 2004). One of the challenges addressed by the dimension of the MePNet project is to set up an appropriate method that would allow not only to achieve this clonesorting step for 100 hundred GPCRs, but also to classify these receptors according to their quantified expression level, and as much as possible in a helpfull high-throughput manner. One way of choice to assess the production levels of heterologously expressed proteins is to apply immnunoblot analysis techniques using primary antibodies either directed against the recombinant proteins or against fused epitope tags. While Western-blot analyses allow the determination of the apparent molecular weight of the expressed protein and reveal information about aggregation and proteolysis events, this method is far from permitting highthroughput screening and is not fully adapted for GPCR expression quantification. Therefore, in this study we worked out to develop a dedicated and versatile high-throughput immunodetection methodology that could allow to rapidly and easily quantify expression levels of numerous GPCRs present in various sample types, from crude extracts to native membrane preparations or solubilized fractions.

# **MATERIALS AND METHODS**

#### Materials

DMSO was purchased from Acros Organics. Scintillation cocktail Ultima Gold MW was purchased from PerkinElmer. L-Histidine was from Sigma. The medium components were from Difco (Beckton, Dickinson and Company) except peptone (Sigma). G418 was from Invitrogen. BCA reagents was from Pierce. Glass filters GF/B were from Whatman. Glass beads, acid washed (425-600 micron) were from Sigma.

Monoclonal anti-histidine, anti-Flag M1 and M2 antibodies, as well as Streptavidine (+/-HRP) and pNPP (p-Nitrophenyl phosphate), were purchased from Sigma. Sheep anti-mouse IgGs-HRP antibodies were purchased from Amersham Pharmacia biotech and Sheep anti-mouse IgGs-alkalin phosphatase antibodies from Jackson Immunoresearch.

Biacore 2000 instrument, CM5 sensor chip, and the amine-coupling kit containing N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), ethanolamine hydrochloride-NaOH pH 8.5) were purchased from Biacore AB.

# Pichia pastoris expression plasmids

The ten GPCRs utilized in this study (Table 1) were produced using an optimized expression vector generated within the MePNet programme, namely the pPIC9K-MePNet vector (Figure 1A). The human β2-adrenergic receptor used as a reference in the present study was expressed in the Pichia pastoris system using the pPIC9K-Flag-β2AR-Bio construct (Figure 1B) previously described (Weiss HM et al., 1998).

# Yeast clone selection and culturing methods

The protease-deficient *P. pastoris* strain SMD1163 (his4, pep4, pbr) (Invitrogen) was used for transformation and subsequent protein production. Prior to transformation, the plasmids were linearized with using the PmeI restriction enzyme. Competent cells were prepared as

described in The Multi-Copy *Pichia* Expression Manual (Invitrogen) and electroporation was performed at 1500 V, 25 mF and 600 W using a Gene Pulser (Bio-Rad).

Recombinant His+ clones were selected on MD plates (1.34 % Yeast nitrogen base without amino acids, 2 % dextrose, 0.00004 % biotin, 1.5 % agar). As a subsequent step to select for multycopy transformants, His+ clones were pooled, diluted in sterile water, and about 1x105 cells were spread on G418-containing YPD plates (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, 2 % agar and 0.05-0.5 mg/ml G418). Several clones showing representative resistance behaviour to various G418 concentrations were tested for recombinant protein production.

For receptor production, cells were pre-cultured in baffled flasks in a BMGY medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 1.34 % yeast nitrogen base without amino acid, 0.00004 % biotin, 1 % glycerol, 0.1 M phosphate buffer pH6) at 30 °C to an OD600 of 2-6. As a standard condition, induction was achieved in a BMMY medium (same as BMGY with 0.5 % methanol instead of glycerol) at 30 °C, inoculating the flasks at an OD600 of 1. After 18 hours of induction, cells were pelleted at 3000 g for 5 min and directly used for sample preparation otherwise flash-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

# Cell lysis and membrane preparation

Cells were harvested by centrifugation and resuspended in ice-cold breaking buffer (50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 % glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) with an equal volume of glass beads. Cells were broken applying eight rounds of vigorous vortexing for 30 sec followed by 30 sec incubation on ice, with an addition of 1 mM PMSF after the fourth round. Glass beads, intact cells and cell debris were separated from the membrane suspension by a low speed centrifugation step (3000 g, 4 °C, 5 min). The resulting « crude extract » supernatant was either used as such is for analysis or submitted to ultracentrifugation (100000 g, 45 min, 4 °C) to recover the membrane fraction. This membrane pellet was resuspended in a membrane buffer (50 mM Tris pH 8, 120 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM PMSF) using a dounce homogeneizer and was then used as a « membrane preparation » sample. In both case, crude extract and membrane preparation samples were quantified with the BCA method (Pierce) in presence of 0.1% SDS using BSA as a standard. These protein preparations were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

# Receptor solubilization

Membrane preparations were incubated with a solubilisation buffer (10 % glycerol, 20 mM Hepes pH7, 100 mM NaCl and 1 mM PMSF) supplemented with a panel of 15 mild detergents (Table 2) for 2h00 at 4°C at a final concentration of 5mg/ml. An ultracentrifugation was carried out at 100 000 g, 45 min at 4 °C in order to collect and analyse the solubilised proteins present in the supernatant.

# Immunoblot Analysis

For Western-blot analyses, either 10 or 20  $\mu$ g of protein preparations were diluted in the loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glycerol, 2 % SDS, 2.5 % ß-mercaptoethanol, 0.01 % Bromophenol blue). Proteins were resolved on a 10 % SDS polyacrylamide gel (Fling and Gregerson 1986) and electrophoretically transfered onto an Immobilon-P polyvinylidenefluoride (PVDF) membrane for 1 h at 100 V in a transfer buffer (2.5 mM Tris, 19 mM Glycine, 0.02 % SDS, 20 % ethanol).

Dot-blot assays were performed in a 96-well plate format using a Bio-dot Microfiltration apparatus (Biorad). Typically, 20  $\mu$ g of crude extract or 1 $\mu$ g of membrane preparation or 1  $\mu$ g of solubilized receptors were suspended in 100  $\mu$ l of loading buffer and absorbed onto a nitrocellulose membrane (Millipore) by gravity flow.

Dot-blots and Western-blots were then treated similary for receptor detection: the nitrocellulose or PVDF membranes were blocked for 1 h at room temperature in a PBST buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1.8 mM K2HPO4, pH 7.4 and 0.05 % Tween20) containing 5 % of BSA. Then, for M2 revelation, the membranes were probed with the M2 anti-Flag antibodies (0,5  $\mu$ g/ml in PBST) and the protein–antibody complexes were revealed by sheep anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgGs antibodies (dilution of 1:10000 in PBST). The same protocol was used with two other anti-tag primary antibodies (M1 anti-Flag antibody (2  $\mu$ g/ml in PBST and anti His (ascite fluid dilution 1/2000).

In vivo C-terminal biotinylation (bio-tag) of the recombinant receptors also allowed their detection with streptavidin coupled to peroxydase (1/2500 in PBST). All the incubation steps were achieved for 1h at room temperature, each followed by three 5 min washes in PBST. The bound HRP-conjugated proteins were revealed by enhanced chemiluminescence (West Pico Super Signal Enhanced, Pierce) according to the manufacturer protocol.

Solubilized receptors (1 to  $5\mu g$  of solubilized membrane proteins) were mixed with 1 % SDS prior to be spotted. M2 anti-FLAG immunodetection was performed as described above.

### **Direct ELISA**

Plates were coated overnight at 4 °C with GPCR-expressing membrane preparations diluted in a PBS buffer in a final volume of 100  $\mu$ l/well. Plates were saturated with (1 %) BSA-containing PBST buffer for 1 h prior to incubation with of M2 anti-Flag antibody (0.5  $\mu$ g/ml in PBST). Protein-antibody complexes were revealed with an alkaline phosphatase-conjugated anti-Fcg mouse antibody (1:2500 dilution in PBST-5 % BSA) and adding PNPP (1 mg/ml in 50 mM Tris pH9.6 1 mM MgCl2) as the substrate. The same protocol was used with two other anti-tag primary antibodies, the M1 anti-Flag (3.5  $\mu$ g/ml in PBST) and anti-His (ascite fluid dilution 1/2000) antibodies.

# Sandwich ELISA

The 96 well plate were first coated overnight at 4°C with streptavidin or mAb M2 (2.5 to  $12\mu g$  in PBS). The plates were then saturated with BSA (1%). Samples containing  $\beta 2$  adrenergic receptors (membrane preparation or solubilised receptors) were coated onto the plate at a concentration ranging from 7 to 70  $\mu g/ml$  (in PBS). Plates were revealed as describe above.

# SPR (Surface Plasmon Resonance) experiment

The receptor/antibodies interactions were analysed using a BIACORE instrument, a surface plasmon resonance (SPR) detection based system. Briefly, one binding partneris immobilized on a sensor surface (sensorchip) and binding of analyte molecules to immobilized ligand is

seen as a change in signal (response in resonance units - RU) and recorded as a function of time. One RU corresponds to the binding of 1pg/mm<sup>2</sup> of analyte.

All biosensor assays were performed at 25°C using HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA with 0.005% Surfactant P20) as running buffer at a flow rate of 5  $\mu$ l/min.

Immobilisation of streptavidin was performed by first activating the carboxylated dextran surface with 35  $\mu$ l of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS. Then 35  $\mu$ l of a solution of streptavidin (50  $\mu$ g/ml in 10 mM acetate buffer, pH 4.5) was injected onto the activated surface, giving a signal of approximately 2500 RU. Ethanolamine hydrochloride, pH 8.5 (35  $\mu$ l) was injected to saturate the free activated sites of the matrix. Solubilized, partially purified 5HT1B receptor (diluted in HBS-EP) was allowed to interact with streptavidin until a response of approximately 1050 RU was obtained. This receptor surface constituted the reaction surface. A control surface contained streptavidin alone and was used to evaluate non specific binding of antibody analytes to the streptavidin coated sensor surface and was used as a reference.

Anti–tag antibodies (M1 and M2 120 nM and His-1 ascite 1000x diluted) were injected on the immobilised receptor at a flow rate of 30  $\mu$ l/min for 10 min, followed by a dissociation phase for 5 min. The sensor chip surface was regenerated after each experiment by a pulse injection (1 min) of 50 mM HCl to remove bound antibodies.

### RESULTS AND DISCUSSION

# Expression of recombinant GPCRs and samples to be analysed

The *Pichia pastoris* expression vector (Figure 1A) was especially designed for the MePNet project as a result of the most recent developments made for GPCR expression. In this vector, the receptor genes were N-terminally fused to the  $\alpha$ -mating type factor secretion signal from Saccharomyces cerevisiae. Due to the addition of a Kex2 protease site, this sequence signal could then be removed in the Golgi apparatus of the yeast host during the expression phase, leading to a processed receptor. C-terminally, the GPCR genes were fused to the biotinylation domain from *Propionibacterium shermanii* transcarboxylase (Bio-tag) (Cronan JE, 1990): together with the  $\alpha$ -factor secretion signal, these sequences were reported to highly improve the expression levels of recombinant GPCRs in *P. pastoris* (Weiss HM et al., 1998; Schiller H et al., 2001; Grunewald S et al., 2004). Moreover, the different N- and C-terminally fused Flag-tag, 10-His and Bio-tag sequences were choosen as well-characterized fusion sequences allowing for the standardization of protocols for the receptor detection and purification steps. Finaly, since the final goal of this programme was to obtain the structure of native GPCRs. two TEV protease cleavage sites were inserted between these different fusions and the receptor genes, allowing to eliminate the N- and C-terminus additional sequences prior to the cristallisation attempts.

The different plasmids were introduced into the SMD1163 *Pichia pastoris* strain via integrative transformation and, for each studied GPCR, 6 to 12 recombinant clones were selected on their G418 resistance behaviour. Depending on the copy number of the plasmid integrated in the yeast genome, and consequently depending on the GPCR gene dosage, these clones had then to be sorted according to their effective receptor expression levels. At this stage, crude extract were choosen as the best samples to fit with the screening constraint and because the preparation was fast and simple to perform. However, as crude extracts consist of a complex mixture of cellular componants, the expressed GPCRs correspond to only a small fraction of these samples and a highly sensitive detection test was needed.

In a following step, these best expressing clones were planned to be compared in order to establish a relative ranking of the expression levels of all the studied GPCRs and to identify the most well-expressed receptors. The best suited samples for this kind of evaluation were membrane protein preparations.

Starting from these top candidates, a further step was then to screen for the best conditions that allowed an efficient solubilization of receptors. The samples obtained were consisting of solubilized membrane proteins in buffers containing various type and concentration of surfactants, salts and stabilizing agents.

Thus, in order to properly analyse these different types of samples, one first important challenge was to set up a versatile, standardized and high-throughput method that would allow the specific detection of expressed tagged proteins.

# Detection of tagged GPCR: tools and approaches

In order to select for the best suited procedure, several detection tools, various approaches and different solid phase supports were tested using different types of samples, from crude extracts to membrane preparations or solubilized receptors.

### Evaluation of tagged GPCR binding activity the different detection tools

Since the Flag-tag, 10-His and Bio-tag sequences could be used for detection, we compared the reactivity of several commercial antibodies and molecules using Biacore, ELISA and Dot-blot techniques in order to select for the best suitable tool for GPCR detection. Therefore, a HRP-coupled streptavidine solution (Streptavidin-HRP, Pierce), an anti-poly-histidine antibody (Sigma HIS-1) and two monoclonal anti-flag antibodies (anti-flag M1 and M2, Sigma) were evaluated (Figure 2). The M2 could recognize the kex2-processed and unprocessed forms of the expressed receptor while the M1 antibody recognizes only the processed form.

The figure 2A shows the sensorgrams obtained for each of the 3 anti-tag antibodies interacting with solubilized 5HT1B receptor (1050RU) immobilized via its C-terminal biotinylated extremity on a streptavidin-coated chip. While M1 and M2 anti-Flag antibodies were injected at the same concentration (120nM), the M2 antibody gave a twice higher signal compared to M1 antibody. The anti-histidine His-1 antibody (ascite 1000x diluted) gave a signal similar to M1.

In order to evaluate the detection tools using a Dot-blot method (Figure 2B), 20  $\mu$ g of a membrane preparation expressing the 5HT1B serotonin receptor were spotted on a nitrocellulose membrane. As a negative control, 20  $\mu$ g of a membrane preparation of a yeast strain transformed with the empty expression vector (without any GPCR gene) were also

spotted. In this case also, the signal obtained with the M2 antibody in presence of the two receptors was significantly better than with the M1 and HIS-1 antibodies. In order to increase the specific signal that could be obtained, the three anti-tag antibodies were mixed. However, the result did not show any significant improved signal compared to M2 alone. Alternatively, the HRP-coupled Streptavidin (1/2500) appeared to be highly reactive but with a low signal-to-noise ratio.

Using a direct ELISA method (Figure 2C), 5µg of membrane preparations of the 5HT5A and 5HT1B serotonin receptors were adsorbed on a polystyrene plate and revealed with the same detection tools. This method clearly confirmed the results obtained with the dot-blot and Biacore approaches and since the M2 anti-Flag antibody always presented the best reactivity with the higher signal-to-noise ratio, this antibody was selected as the best detection tool to be used with our samples.

From these different results, it also clearly appeared that the signal detected with the M1 antibody was always significantly lower than what was obtained with the M2 antibody. However, because of the methods employed, we were not able to conclude whether this was only due to the efficiency of GPCR Kex2-processing (M1 antibody revealed only processed forms) or if it was also related to a difference of antibody reactivity.

#### Evaluation of two approaches: capture vs adsorption

In order to optimize the GPCR detection test, either direct or sandwich ELISA using two different solid supports were compared. The direct ELISA method consisted in adsorbing a membrane preparation containing the expressed GPCR which was revealed in a second step by using the M2 anti-Flag antibody. For the sandwich ELISA approaches, either Streptavidin or M2 anti-Flag antibody were first coated on the selected support before the membrane protein samples were applied and revealed using the complementary anti-tag partner (M2 anti-Flag antibody or streptavidin-HRP, respectively). The rational was that sandwich assay format should have the advantage to screen for GPCR integrity, as both N and C-terminal tags have to be recognized in the same test, while an adsorption assay format had the benefit to be less time-consuming. The selected supports were polystyrene or mixed cellulose-ester filter plates bearing an adsorption capacity of 1.5  $\mu$ g/cm and 10  $\mu$ g/cm , respectively.

ELISA detected signals were rather low (OD <0.6, data not shown) and from the comparison of both sandwich ELISA format, it was observed that using streptavidin to capture the GPCRs

via their biotinylated domain led to a lower signal than when immobilizing the receptors via the M2 antibody / Flag-tag interaction (data not shown). However, since the detection tools were not similar in the two approaches, we could not really conclude whether this difference was due to a capture or detection sensitivity, nor even to both of them.

Also, whatever the ELISA approach, the mixed cellulose-ester support appeared to be more sensitive than the polystyrene support, in good agreement with their respective adsorption properties.

Starting from these different observations, we estimated that adsorption was a more adapted approach for the detection procedure we were looking for, provided that a better sensivity could be reached in order to be compatible with rough samples such as crude extracts. Therefore, we choose the more classical Dot-blot approach and tested nitrocellulose (NC) and polyvinyldifluoride (PVDF) membranes for their larger adsorption capacities (75-85  $\mu g/cm^2$  and 100-300  $\mu g/cm^2$ , respectively).

# Optimization of a Dot-blot method

While dot-blot approaches have been developed for various applications including for high-throughput screening purposes (Galperin MM et al, 2004; Eshaghi S et al, 2005), no such method have been described so far for GPCR detection in various samples of yeast membranes. We therefore explored the suitability of this technique for our needs.

#### Detection sensitivity: comparison of samples and supports

In a first experiment we tested the sensitivity of a nitrocellulose support with a concentration range of b2-adrenergic receptor in various samples detected with a M2 anti-Flag antibody (Figure 3A). In order to improve the detection efficiency, the membrane preparations were solubilized in either Laemmli buffer or SDS solutions. An additional condition was also tested where the membrane preparation in Laemmli buffer were mixed with 20 µg of yeast extract (strain SMD1163) to mimic the proteinic environment present in the crude extract samples that we planned to analyse. In all cases, the method appeared to be highly sensitive and as expected, when membranes were spotted alone, the signal was much higher than in the case of the mixture (Figure 3). Signal intensity of the spots was evaluated using the Scion Image software. Fig 3B shows a standard curve obtained by plotting intensity vs. adsorbed B2AR quantities. The flag-tagged protein can be detected at roughly 0.01% purity with a high

signal (a maximal intensity of 200 units is observed for 2.5  $\mu g$  of membrane proteins where B2AR represents about 0.1% of total proteins and is adsorbed diluted in 20  $\mu g$  yeast extract). The detection threshold in these conditions is about 100 ng of total membrane protein which could correspond to 100 pg of flag-tagged GPCR. The detection of a concentration range of B2AR / yeast extract mixture spotted on NC and PVDF were then compared and the signals obtained were quantified . While the PVDF support also allowed to generate a standard curve with this type of sample, nitrocellulose was found to correspond to the most sensitive Flag-tag detection (data not shown). Concentrations of M2 anti-Flag mAb (0.5  $\mu g/ml$ ) and sheep anti-mouse IgGs-HRP antibodies (1/10000) were adjusted to maximize signal-to-noise ratio for the detection of flagged-protein in yeast extract .

#### Dot-blot detection of solubilized receptors

One of the MePNet programme issues was to screen for the best adapted conditions for the solubilization of active receptors. This requires a unique combination of detergents and buffer conditions that is generally challenging to define and most often achieved in screening a large array of solubilization conditions (salt, detergents, pH, stabilizing additives, etc...). In order to evaluate the relevance of each of these conditions in terms of total solubilized receptor, an immunoassay was designed, based on the dot-blot approach previously set-up.

It is known that some detergents can have a competing effect on immunoassays by weakening reactant adsorption or having even blocking effect (Steinitz, 2000). This was confirmed by a preliminary assay where a soluble control protein was spotted in presence of each of the detergents selected for the MePNet project (data not shown). We then tested this blocking with a solubilized receptor (5HT1B). When similar solubilization conditions were applied (1% detergent, in presence of 100mM NaCl, pH7.4), an equivalent amount of receptor 5HT1B was solubilized with Dodecylmaltopyranoside (DDM), lauryldimethylamine oxide (LDAO) and octylglucopyranoside (OG) as it was observed in Western-blot experiments (data not shown).

Decreasing amounts of membrane proteins containing the 5HT1B receptor  $(10-0.1~\mu g)$  were spotted on a nitrocellulose support after solubilizations with each different detergents. Final detergent concentrations of samples (ranging from 1% to 0.01%) were adjusted before spotting (Figure 4). This experiment clearly confirmed the competing effect of the detergents tested, especially with low concentration of spotted proteins and more particularly for samples supplemented with LDAO. However, when 1  $\mu g$  membrane proteins were spotted in presence

of 1% SDS, the same signals could be detected whatever the detergent type and dilution. Under this condition, the detergent competition effect for adsorption could be eliminated and these results were confirmed with other detergents selected from the solubilization screening (data not shown).

# Validation of the Dot-blot approach for the MePNet project

#### Sorting of recombinant Pichia clones

In order to select for the recombinant clones bearing the best expression level for each GPCR, 6 representative clones showing various geneticin resistance behaviour were grown under induction condition. The corresponding crude extract samples were spotted on a nitrocellulose membrane and revealed according to the optimized dot-blot procedure. A \( \beta 2AR \) concentration range was used in order to generate a standard curve and a crude extract preparation from a strain expressing the empty pPIC9K vector was used as a negative control. Figure 5 is presenting the results obtained for two GPCRs, namely the H2-histamine and the Y1-neuropeptide receptors, illustrating the variability that could be measured between different clones expressing the same GPCR and confirming the appropriateness of this method.

#### Ranking of Pichia pastoris expressed GPCRs

The previous sorting procedure was systematically applied to select for the best expressing clones for each GPCR. Eleven of these clones were then used to establish an expression ranking of the corresponding eleven different GPCRs (Table1). In this experiment, either crude extracts or membrane preparation samples were spotted, revealed and quantified (Figure 6). As expected from the difference in the sample complexity, the immunodetected signals measured with membrane preparation were significantly higher than those quantified from crude extracts. However, the ranking of GPCR expression levels was nearly identical with both types of sample, and this good correlation was confirming the accuracy of this detection procedure. As a matter of comparison, Figure 6C is featuring the Western-blot profiles that were obtained with the same samples. This experiment illustrated the typical smearing pattern that can be obtained with GPCRs migrated on a SDS-PAGE: apart from background signals, one can observes several bands corresponding to differently processed forms of certain GPCRs, as well as bands of higher molecular weight representing

oligomerisation or aggregation events. As a result, , it is quite impossible to establish a reliable ranking of GPCRs as a function of their expression level from this immunodetection method, starting both with crude extracts or membrane preparations.

#### Screening for solubilization conditions

In order to screen for solubilization conditions, 15 detergents were used to solubilize a membrane preparation containing the 5HT-1D serotonin receptor. After two hours of incubation at 4 °C, an ultracentrifugation allowed to separate the solubilized proteins present in the supernatant from the membrane fraction. An equal amount of solubilized proteins from each sample was then analysed using the Dot-blot method optimized for detecting solubilized GPCRs in presence of detergents. The screening for the 5HT-1D receptor shows that NG and DG detergents allows the larger amount of receptor to be solubilized (Figure 7). By indicating in which samples are the larger amounts of detected receptor, this high-throughput method will help to identify the best solubilizing condition.

# CONCLUSION

Through this work, a global procedure has been developed in order to detect GPCR expression in various samples, from *Pichia pastoris* crude extracts to solubilized receptors. While the adsorption of crude extracts on nitrocellulose membranes allows easy testing of numerous samples, this method was also validated for the evalution of relative expression levels of GPCRs. Furthermore, this test provides a rapid detection of the Flag-tagged receptors so that purification process can be accelerated to minimize proteolysis. Therefore, this procedure is also suitable for other various applications such as optimization of GPCR expression conditions as well as for the monitoring of receptor solubilisation and purification procedures. Although this approach represents a helpful and versatile method allowing to evaluate the global protein yields raised up all along the production procedure, it only generates quantitative data with no clue about the way GPCRs are folded within the analysed samples. Therefore, in order to deliver an accurate view on the expression system efficiency, complementary analytical methods providing information on the receptor functionality are needed

# **REFERENCES**

- 1-Cid GM, Nugent PG, Davenport AP, Kuc RE, Wallace BA. Expression and characterization of the human endothelin-A-receptor in Pichia pastoris: influence of N-terminal epitope tags. J Cardiovasc Pharmacol. 2000 36(5 Suppl 1):S55-7.
- 2-Cronan JE Jr. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. J Biol Chem. 1990 265(18):10327-33.
- 3-Eshaghi S, Hedren M, Nasser MI, Hammarberg T, Thornell A, Nordlund P. An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. Protein Sci. 2005 14(3):676-83.
- 4-Feng W, Cai J, Pierce WM Jr, Song ZH. Expression of CB2 cannabinoid receptor in Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2002 26(3):496-505.
- 5-Galperin MM, Traicoff JL, Ramesh A, Freebern WJ, Haggerty CM, Hartmann DP, Emmert-Buck MR, Gardner K, Knezevic V. Multimembrane dot-blotting: a cost-effective tool for proteome analysis. Biotechniques. 2004 36(6):1046-51.
- 6-Grisshammer R, Tate CG. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. Q Rev Biophys. 1995 28(3):315-422.
- 7-Grunewald S, Haase W, Molsberger E, Michel H, Reilander H. Production of the human D2S receptor in the methylotrophic yeast P. pastoris. Receptors Channels. 2004 10(1):37-50.
- 8-de Jong LA, Grunewald S, Franke JP, Uges DR, Bischoff R. Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2004 33(2):176-84.
- 9-Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. Chembiochem. 2002 3(10):928-44.
- 10-Lundstrom K. Structural genomics on membrane proteins: the MePNet approach. Curr Opin Drug Discov Devel. 2004 7(3):342-6.
- 11-Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast. 2005 22(4):249-70.
- 12-Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science. 2000 289(5480):739-45.

13-Sarramegna V, Demange P, Milon A, Talmont F. Optimizing functional versus total expression of the human mu-opioid receptor in Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2002 24(2):212-20.

14-Sarramegna V, Muller I, Mousseau G, Froment C, Monsarrat B, Milon A, Talmont F.Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2005 Aug 8

15-Schiller H, Haase W, Molsberger E, Janssen P, Michel H, Reilander H. The human ET(B) endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris shows high-affinity binding and induction of stacked membranes. Receptors Channels. 2000 7(2):93-107.

16-Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H. Expression of functional mouse 5HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. FEBS Lett. 1995 377(3): 451-6

17-Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochem J. 1998 330:1137-47.

# **FIGURES**

	FAMILY	Receptor name		
1	Serotonin receptor	5H1A_HUMAN	5 hydroxytryptamine 1A receptor	
2		5H1B_HUMAN	5 hydroxytryptamine 1B recepto	
3	receptor	5H1D_HUMAN	5 hydroxytryptamine 1D receptor	
4	Adrenergic receptor	A2AB_HUMAN	alpha 2B adrenergic receptor	
5	Muscarinic receptor	ACM1_MOUSE	Muscarinic acetylcholine receptor M1	
6	Bradykinin receptor	BRB2_HUMAN	B2 bradykinin receptor	
7	Cholecystokinin receptor	GASR_HUMAN	Cholecystokinin type B receptor (CCKB)	
8	Histamine receptor	HH2R_HUMAN	Histamine H2 receptor	
9	Neurokinin receptor	NK2R_HUMAN	Neurokinin 2 receptor	
10	Neuropeptide receptor	NY1R_HUMAN	Neuropeptide Y receptor type 1	
11	Vasopressin receptor	V1BR_HUMAN	Vasopressin V1B receptor	

Table 1. List of the GPCRs studied in this paper .

	Detergent	Classification	Concentration for solubilisation in %	CmC mM
1	DDM	n-dodecyl-ß-D-maltopyranoside	1%	0,17
2	NG	Nonyl ß-D-glucoside	1%	6,5
3	OG	n-octyl β-D-maltopyranoside	1%	19
4	UM	n-undecyl β-D-maltopyranoside	2%	0,59
5	DM	n-decyl β-D-maltopyranoside	1%	1,6
6	DG	n-decyl ß-D-glucopyranoside	1%	2 to 3
7	D/C	Digitonin/cholate	1,25%/0,25%	?/9 to15
8	L-sucrose	Laurylsucrose	1%	0,3
9	FOS12	Fos-choline12	1%	1,5
10	FOS14	Fos-choline14	1%	0,12
11	FOS16	Fos-choline16	0,1%	0,013
12	LDAO	Lauryldemethylamine oxyde	1%	2
13	Cymal6	Cyclohexyl-hexyl-ß-D-maltoside	1%	0,56
14	ZW3-12	n-Dodecylsulfobetaine	1%	2 to 4
15	CHAPS	olamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propane s	1%	6 to 10
	SDS	Sodium dodecyl sulfate	1%	8
	0	0	0%	0

Table 2. List of the detergents selected for the MePNet program.

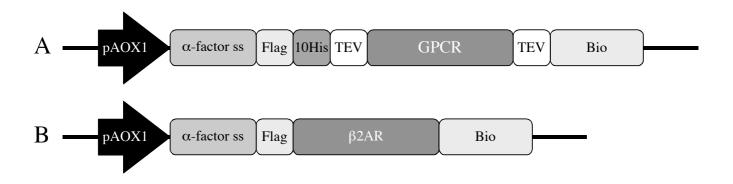
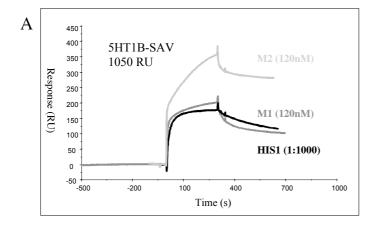
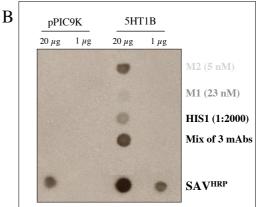


FIG. 1: Schematic representation of the pPIC9K-based Pichia pastoris expression vectors employed for this study. (A) vector used as a standard for the production of the human ß2 adrenergic receptor (Weiss H. et al., 1998). (B) vector designed for the production of the various GPCRs studied in the MePNet programme. pAOX1: Alcohol Oxidase 1 gene promoter; a-factor ss: coding region for the signal sequence of S. cerevisae mating type factor a; Flag: coding sequence for the FLAG-tag; 10His: coding sequence for a His-tag consisting of 10 histidine codons; TEV: Tev protease cleavage site; Bio: coding region for the biotinylation domain of the transcarboxylase from Propionibacterium shermanii.





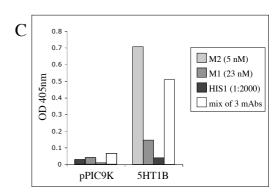
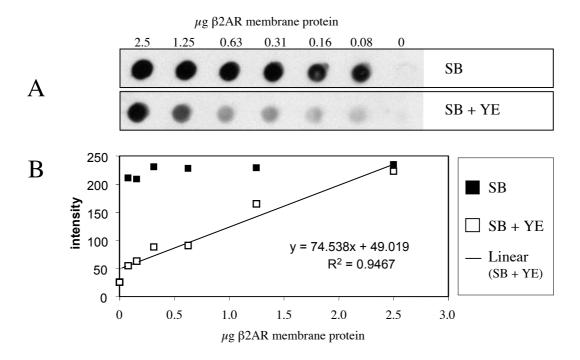
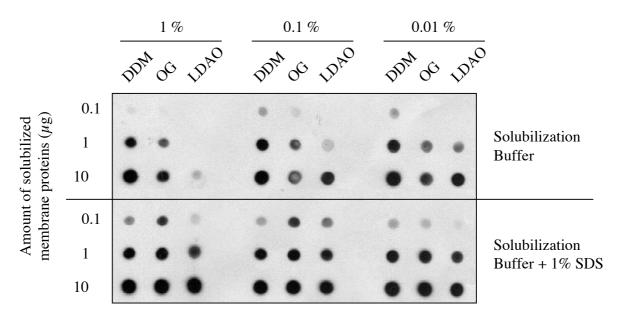


FIG. 2: Reactivity evaluation of different detection tools with a MePNet-tagged 5HT1B receptor. (A) SPR-based measurements: The solubilised 5HT1B receptor was captured on a streptavidine-coated sensor chip and detected using M2 (120nM), M1 (120nM) or HIS1 (1000x) antibodies. (B) Dotblot evaluation: two concentrations (20 and 1  $\mu$ g) of a membrane preparation were spotted on a nitrocellulose membrane and revealed using M1, M2, HIS1 antibodies, a mix solution of the three mAbs, or HRP-coupled Streptavidine. A membrane preparation of a strain expressing an empty pPIC9K vector was spotted as a negative control. (C) ELISA evaluation: 5  $\mu$ g of a membrane preparation were adsorbed on a polystyren plate in parallel with membranes from a negative control (pPIC9K). Detection was achieved using M1, M2 or HIS 1 antibodies or a mix of the 3 mAbs.



**FIG. 3: Dot-blot detection of a flag-tagged ß2AR membrane preparation. (A)** Two concentration ranges of &BEMS2AR membranes (0.008 to 2.5 &BEMS2AR were spotted on a nitrocellulose membrane, suspended either in a Laemmli Sample Buffer (SB) or in a Laemmli Sample Buffer supplemented with 20 &BEMS2AR membrane preparation from the SMD1163 yeast strain (SB + YE), and revealed using the M2 anti-flag antibody. **(B)** Dot signal intensities were quantified using the Scion Image software and plotted versus the corresponding amount of &BEMS2AR membranes.

#### Type and concentration of detergents



**FIG. 4: Dot-blot detection of solubilized receptors.** A 5HT1B-containing membrane preparation was solubilized in presence of 1 % of one of the three detergents dodecylmaltopyranoside (DDM), octylglucopyranoside (OG) and lauryldimethylamine oxide (LDAO) in a solubilization buffer. Decreasing amounts of solubilized proteins (10 to 0.1  $\mu$ g) were spotted, in absence or presence of 1% SDS, after adjusting the final detergent concentration from 1 to 0.01%, and revealed using a M2 anti-Flag antibody (0.5  $\mu$ g/ml).

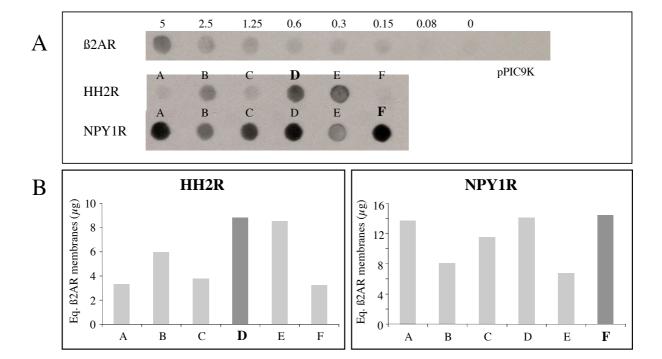
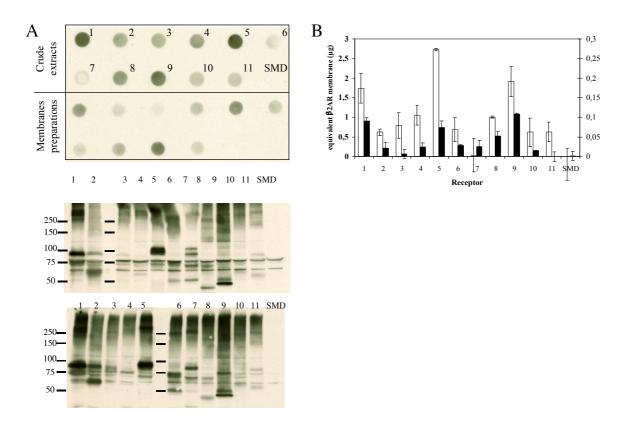
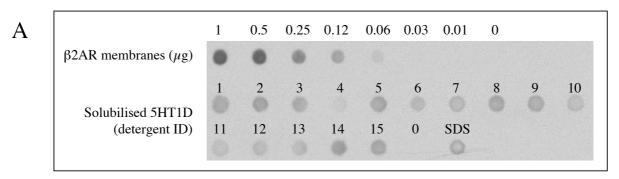


FIG. 5: Dot-blot screening for recombinant clones expressing the Histamine H2 (HH2R) and Neuropeptide Y1 receptors (NPY1R). (A) Crude extract samples of six different clones (A to F) for each HH2R and NPY1R receptors were spotted on a NC membrane and revealed with a M2 anti-flag antibody (0.5  $\mu$ g/ml). A concentration range of membranes expressing the  $\Omega$ 2AR was used as a standard and a crude extract of a strain expressing an empty pPIC9K vector was used as a negative control. (B) Graphic bar representations of the immunodetected signals analysed with the Scion Image software and quantified according to the  $\Omega$ 2AR standard curve.



**FIG. 6: Validation of the Dot-blot test**. Comparison of signals obtained in Dot and Western-blots with *Pichia pastoris* extracts and membrane preparations for 11 receptors from the MePNet programme list. Flag-tagged receptors were detected with the M2 anti-FLAG antibody (0.5μg/ml). The strain SMD1163 (SMD) was used as a negative control.

(A) Crude extracts (20 µg/spot) and membrane preparation (0.25 µg/spot) samples were spotted on a nitrocellulose membrane. The corresponding intensities were quantitated using a  $\beta 2$  adrenergic receptor membrane preparation as a standard according to the material and methods (B). Open histogramms is the evaluated quantities for crude extracts and black histogramms correspond to membranes. (C) The same crude extract and membrane preparation samples (20 µg/lane) were analyzed by Western-blotting.



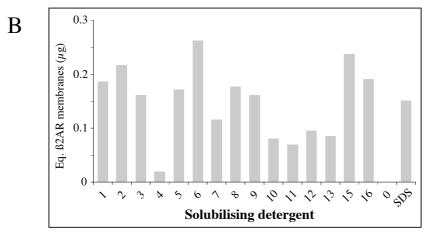


FIG. 7: Screening for detergents allowing the solubilisation of the 5HT1D receptor. (A) Solubilised fractions obtained with the 15 detergents selected for the MePNet were spotted (5  $\mu$ g) on a nitrocellulose membrane and revealed using the M2 anti-FLAG antibody (0.5 $\mu$ g/ml). (B) Graphic bar representations of the immunodetected signals analysed with the Scion Image software and quantified according to the ß2AR standard curve.

# A generic approach to improve the expression levels of functional recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*

Nadia CHEROUATI<sup>2\*</sup>, Cécile PRUAL<sup>1\*</sup>, Nicolas ANDRÉ<sup>1\*</sup>, Tania STEFFAN<sup>2</sup>, Gabrielle ZEDER\_LUTZ<sup>2</sup>, Thierry MAGNIN<sup>2</sup>, Franc PATTUS<sup>2</sup>, Hartmut MICHEL<sup>1</sup>, Renaud WAGNER<sup>2</sup> and Christoph REINHART<sup>1</sup>#

# Corresponding author

# **ABSTRACT**

Using a representative panel of twenty G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) heterologously expressed in the yeast *Pichia pastoris*, a set of four different expression parameters were analysed with ligand-binding experiments for their impact on the production yields of active receptors. These expression condition adjustements were including a change in temperature or the addition of receptor specific ligands, dimétylsulfoxide (DMSO) or histidine in the medium during expression. These factors were first evaluated separately, showing for some of them dramatic effects on expression levels, but always in a receptor-dependent manner. In consecutive expression experiments combining several of these parameters, the optimization effect were shown to be cooperative in many cases and always leading to a significative improvement of total number of active sites compared to what was obtained in standard expression conditions. This systematic approach could then be used as generic procedure to rapidly and efficiently screen for rough optimization of one given GPCR expressed in *Pichia pastoris*.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Max-Planck-Institute of Biophysics, Marie-Curie-Str. 13-15, D-60439 Frankfurt am Main Germany

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> UMR7100 ESBS-CNRS, Dpt Récepteurs et Protéines Membranaires, Blvd S. Brant, BP10413, 67412 Illkirch, France

<sup>\*</sup> These authors contributed equally

# INTRODUCTION

The G-Protein Coupled Receptor (GPCR) superfamily occupy a pivotal place in cell life as these integral membrane proteins are involved in most of the external signal transduction reactions (Bockaert and Pin 1999). For the same reason, this family represents one of the largest class of therapeutic targets: today, about 50 % of the marketed drugs are directed against well-characterized GPCRs (Klabunde and Hessler 2002) which are believed to correspond to only one half of the total existing GPCRs encoded by the human genome (Howard et al. 2001). Among all the scientific efforts devoted to this protein family, structural studies represent a way of choice not only to improve our understanding of their mechanism of action but also to feed the powerful structure-based drug design approaches to elaborate new efficient drugs (Kuhn et al. 2002).

However, in the field of membrane protein structural biology, several fundamental experimental barriers are encountered all along the process starting from protein expression to crystallisation attempts, explaining why there is so few examples of such 3D structures available in databases: out of the 30,000 structures that are reported in the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb), only 93 are of membrane proteins (http://www.mpibpfrankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html) and among these, a single one is a member of the GPCR family, namely the bovine rhodopsine (Palczewski et al. 2000). This protein was successfully purified from natural sources, stabilized and cristallized, demonstrating that obtaining a 3D structure of a GPCR is feasible provided that enough, pure and stable material is available. However, since rhodopsine is a singular exception of a naturally highly-expressed GPCR, heterologous expression systems are inevitably required for most of the other receptors. Despite the remarkable advances that have been realized in this field (Tate 2001), expression and purification success rates are still rare and are mainly depending on the studied GPCR and on the heterologous expression system used. These aspects are particularly well illustrated through all the recent publications reporting on GPCR heterologous expression (Sarramegna et al 2003, Reinhart and Krettler 2005, Akermoun 2005, Drew et al 2003, Massotte 2003, Lundstrom 2003): depending on the receptor sequence and its organism origin, the type of expression system, the promoter and fusion sequences, the gene dosage, the expression conditions, etc..., the production levels of active receptors have been observed to vary dramatically, more than hundred fold for several of them.

In this context, it is very hard to predict which condition in which system will be the best suited for producing a given GPCR at quantitative and qualitative levels compatible with structural biology studies. The Membrane Protein Network (MePNet) is one of the rare structural genomic programmes focusing on membrane proteins (Lundstrom 2005) that are willing to change this situation. Starting from 100 GPCRs expressed in three representative systems, the MePNet programme is not only aiming at selecting for the most attractive targets, but is also intending to gather as much data as possible in order to identify and understand the critical parameters that are influencing the success rates of such studies.

In this programme, the *Pichia pastoris* expression system has been selected not only as a system of choice for the production of heterologous proteins (Macauley-Patrick et al 2005), but above all because of the substantial data and experience that have been accumulated with GPCR expression (Reinhart and Krettler 2005). Making profit of this experience, we generated the large collection of *Pichia pastoris* clones expressing the 100 GPCRs candidates selected for the MePNet programme. Our main focus was to optimize each step of the expression procedure since the first critical issue for this kind of study is to get the most effective overexpression allowing to gather the largest amounts of active receptors. Therefore, since we could rely on optimized expression vector, fusion sequences and yeast host strain developped in previous studies (Weiss et al 1998, Schiller et al 2000, Grunewald et al 2004), we more intensively worked out on improving the experimental conditions applied during expression culturing. While a good consensus can be found in the litterature on the standard buffered media to be used as a start, some important variation have been observed on the active receptors produced when shifting temperature and adjusting pH (Sarramegna et al 2002), when adding GPCR specific ligands or other additives (Sizmann et al 1996, Weiss et al 1998, Grunewald et al 2004), or when varying the cell densities (unpublished data) during the induction step. However, as already mentioned, all these important data are very often sparse and receptor-dependent and no "universal" protocol can be applied.

This paper report on a pilot study that have been conducted on 20 selected GPCRs for which four major parameters known to affect expression levels of functional receptors have been evaluated. The influence of these parameters (temperature lowering and addition of specific ligand, DMSO and Histidine to the media) on GPCR expression was assessed using ligand binding assays and compared to the values obtained using standard expression conditions. The goal of this systematic and methodical comparison was not only to get an accurate view on the effect of each of these parameters on a representative panel of GPCRs, but also to deliver a generic approach allowing to improve the expression levels of functional receptors.

# MATERIALS AND METHODS

### **Materials**

For molecular biology experiments, the restriction, modification and ligation enzymes were from Fermentas Life Science. Recombinant plasmids were propagated using either XL-1 Blue (Stratagene) or TOP10 (Invitrogen) *E. coli* strains.

The protease-deficient *Pichia pastoris* strain SMD1163 (*his4*, *pep4*, *pbr*) (Invitrogen) was used for transformation and subsequent protein production. The medium components were from Difco (Beckton, Dickinson and Company) except for peptone (Sigma). For yeast clone selection, G418 was from Calbiochem or from Invitrogen. L-Histidine was from Fluka or Sigma and DMSO was purchased from Roth or Acros Organics.

For cell lysis and membrane preparation, glass beads (0.5 mm) were either from Euler Prozesstechnik (Frankfurt, Germany) or from Sigma and BCA reagents were from Pierce. All other chemical components were obtained from Sigma.

For GPCR immunodetection monoclonal anti-Flag M2 antibodies was purchased from Sigma and Sheep anti-mouse IgGs-HRP antibodies were purchased from Amersham Pharmacia biotech.

For binding assays, [³H]-GR125743, [³H]-SR142801 and [³H]-NPY were purchased from Amersham. [³H]-Diprenorphine, [³H]-LSD, [³H]-Spiperone, [³H]-SR48968, [³H]-Prazozine, [³H]-Rauwolscine, [³H]-QNB, [³H]-Tiotidine and [³H]-SR140333 were from PerkinElmer. GR159897, [³H]-ZM241385, GR127935, Yohimbine, Prazozine, Cimetidine, SB222200 and GR231118 were from Tocris. Scintillation cocktail were purchased from Roth (cocktail Rotiszint) or PerkinElmer (cocktail Ultima Gold MW). The 96-filter plates were the from Millipore (MultiScreen HTS FB plates) or from PerkinElmer (96 unifilter GF/B). Glass filters GF/F or GF/B were from Whatman.

# Construction of the expression plasmids

Twenty GPCR-encoding cDNAs were selected for this study (see Table 1). All of them were obtained from the MePNet consortium, a programme dedicated to GPCR production using various expression systems (www.mepnet.org). For this global project, a common plasmid collection has been set up where more than 100 GPCR genes were cloned as ORFs without stop codon into a pCR4<sup>®</sup>Blunt-TOPO<sup>®</sup> vector before being sequence-verified. Depending on the clone, a type IIS restriction endonuclease digestion (*Esp*3I or *Bpi*I) is generating an orientated insert which can be ligated with a *Bam*HI / *Spe*I opened expression vector. For the present study, the 20 selected cDNAs were subcloned into the plasmid pPIC9KFlagMCSTEVBio.

This plasmid was designed for this study and was derived from the pPIC9KFlagDGb<sub>2</sub>ARBio vector that has been published previously (Weiss et al., 1998). For generating this new construct, a *BamHI/Eco*RI fragment of the pPIC9KFlagDGb<sub>2</sub>ARBio plasmid was removed and replaced by annealed oligonucleotides TEVfor (5'-GATCCCGC-GGCCGGACCGGCCCACGTGGAATTCGAAAACCTGTACTTTCAAGGTC-3') and TEVrev (5'-AATTGACCTTGAAAGTACAGGTTTTCGAATTCCACGTGGGCCGGTCC-GGCCGCGG-3'). Subsequently a second TEV site was introduced by replacing the newly created *BamHI/Eco*RI fragment by the annealed oligonucleotides TEVIIfor (5'-GATCGAGAAAACCTGTACTTTCAAGGTGGATCCGCTACTAGTG-3') and TEVIIrev (5'-AATTCACTAGTAGCGGATCCACCTTG AAAGTACAGGTTTTCTC-3').

# Yeast culturing methods

The 20 different integrative expression vectors were introduce into the protease-deficient P. pastoris strain SMD1163 (his4, pep4, pbr1). Prior to transformation, these plasmids were linearized using the restriction enzyme PmeI. Competent cells for electroporation were prepared as described in The Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen). Electroporation was performed at 1500 V, 25  $\mu$ F and 600  $\Omega$  using a Gene Pulser (Bio-Rad).

The clone selection was performed as previously described (Scorer et al.1994; Weiss et al., 1998). In brief, recombinant His+ clones were selected on MD agar plates (1.34% Yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose, 0.00004% biotin, 1.5% agar). In a second step aiming at selecting for multicopy transformants, His+ clones were grown on YPD agar

plates containing various concentration of G418 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar and 0.05-0.5 mg/ml G418). Representative clones exhibiting resistance to various G418 concentrations were tested for recombinant protein production.

For receptor production, cells were pre-cultured in BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base without amino acid, 0.00004% biotin, 1% glycerol, 0.1 M phosphate buffer pH6) at 30 °C at 250 rpm to an  $OD_{600}$  of 2-6. As a standard condition, induction was achieved in BMMY medium (same as BMGY with 0.5% methanol instead of glycerol) at 30 °C starting at an  $OD_{600}$  of 1. Depending on the different induction conditions evaluated in this study, several parameters were then separately or jointly modified. After 18h induction, cells were pelleted at 3000 g for 5 min and subsequently used for membrane preparation.

### Membrane preparation

All work was carried out at 0-4 °C. Cells were washed once with ice-cold breaking buffer (50 mM sodium-phosphate buffer pH7.4, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) and resuspended to 30%-wet weight. After 0.5mm glass beads were added to the cell suspension, yeasts were broken by vigorous vortexing at 4 °C for 10 min. Breaking efficiency was checked with a light microscope and was usually around 80%. Intact cells and cell debris were separated from the membrane suspension by a low speed centrifugation (3000 g, 5 min, 4 °C). Membranes were then pelleted using an ultracentrifuge (100,000 g, 45 min, 4 °C), resuspended in a membrane buffer (50 mM Tris pH8.0, 120 mM NaCl, 20% glycerol, 1 mM PMSF) using a dounce homogenizer. Membrane proteins were quantified following the BCA method (Pierce), using BSA as a standard. Membranes were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

#### Radioligand binding assays

For each tested receptor, specific ligand binding assays were realized following the protocols detailed in Table 1. At a fixed temperature, membrane proteins were incubated in triplicates with specific radioligands until equilibrium was reached. For non-specific binding determination, similar incubations were performed in parallel in the presence of an excess of unlabelled specific ligand. Bound and free ligands were separated by rapid filtration

(Whatman GF/B filter or GF/F filter, or Perkin-Elmer GF/B 96-unifilter) soaked in 0.3% polyethylenimine. After the filters were washed 3 times, the retained radioactivity were measured by liquid-scintillation counting. Single point binding assays were performed at one non-saturating radioligand concentration. Saturation curves were analysed by non linear regression using Kaleidagraph or GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA) allowing to generate  $B_{max}$  and  $K_d$  values.

#### Dot-blot immunodetection

Dot-blot assays was performed in 96-well plate format. 1µg of membrane preparation of each receptor and a ranging concentration from 1 to 0,004 µg of β2 adrenergic membrane preparation were resuspended in 100µl of loading buffer (62,5 mM Tris-HCl pH6,8 , 10% glycerol, 2% SDS, 2,5% β-mercaptoethanol, 0,01% Bromophenol blue) and adsorbed onto a nitrocellulose membrane (Millipore). For immunodetection the nitrocellulose membrane was bloked for 1h at room temperature in a PBST buffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na2HPO4, 1,8mM K2HPO4, pH 7.4 and 0,05% Tween20) containing 5% BSA. Then, the membrane were probed with M2 anti-Flag antibodies(0,5µg/ml in PBST) and the protein-antibody complexes were revealed by sheep anti-mouse horseradish peroxidase conjugated IgGs antibodies (dilution 1 :10000 in PBST). Antibody incubations were for 1h at room temperature, each followed by three washes in PBST. The HRP-conjugated antibody was revealed by enhanced chemiluminescence (West Pico Super Signal Enhanced, Pierce)according to the manufacturer protocol.

## **RESULTS**

# Selection of a GPCR representative panel

Twenty GPCRs were selected from the 101 receptors studied within the MePNet programme (Table 1). Among the different criteria used, the most important one was the availability of reliable molecules and protocols for ligand binding measurements. Actually, the goal of the present study was to obtained an accurate overview on both quantitative (total overexpressed receptors) and qualitative (active receptors) impacts of several parameters on GPCR expression levels and appropriate binding protocols were thus needed (optimized protocols detailed and referenced in Table 1). These twenty receptors were also choosen to be representative of the expression levels that could be obtained in preliminary immunodetection experiments. As far as possible, they were also selected to represent different GPCR subfamilies and subtypes, and in few cases to allow the comparison of GPCR from different organism's origin.

The receptors were cloned into an expression vector deriving from a previous plasmid optimized for such studies (Weiss et al. 1998). The resulting vectors were bearing the GPCR genes decorated with several 5' and 3' fusion sequences (figure 1): some of them were choosen for detection purposes (10 His and flag tags), other for improving the expression levels (a-factor signal sequence) or both (biotinylation-tag) (Grunewald et al. 2004; Weiss et al. 1998). Finally, TEV protease sites were inserted at each side of the GPCR gene in order to get rid of the fusion sequences after purification of the resulting expressed protein and prior to the cristallization attempts.

The different vectors were used to transform the protease deficient *Pichia pastoris* SMD1163 (*his4*, *pep4*, *pbr1*) strain which has proven to be particularly well-suited for membrane protein expression (Reinhart and Krettler). For each construct, the corresponding recombinant clones were first selected on G418 plates following classical phenotype screening methods (Scorer et al. 1994), and consecutively by assessing their GPCR expression properties using immunodetection methods (data not shown). For each GPCR, the best expressing clone was then retained for the subsequent analyses.

### *GPCR* expression in standard induction conditions

As a first step, specific ligand binding activities had to be precisely determined for each receptor expressed using a « standard » induction procedure. This standard condition was based on recommended protocols for heterologous expression in *Pichia pastoris* (Weiss et al. 1998). It consisted in inoculating a BMMY buffered medium containing 0.5% methanol with about 5.10<sup>7</sup> cells/ml from a freshly grown culture and incubate the suspension at 30 °C for 18 hours. These induction cultures were performed in triplicate for each GPCR and the corresponding cell pellets were used to prepare the total membrane fractions. After the membrane protein concentration were determined, these samples were then used in ligand binding experiments to generate saturation curves allowing to calculate the Bmax and Kd parameters.

These data, which are corresponding to the largest evaluation realized so far concerning active GPCR expressed in Pichia pastoris, are presented in Table 2. The Bmax values (corresponding to the total number of binding sites) were ranging from 0.12 pmol of detected human a-1B adrenergic receptor per mg of membrane proteins to more than 70 pmol/mg for the rat NK2 receptor. According to some rapid conversion and calculation, it has been assumed that for GPCRs of an average molecular weight of 45 kDa expressed in Pichia pastoris, a Bmax of 20 pmol/mg should correspond to about 1 mg of active receptor per liter of culture (Sarramegna et al. 2003). We therefore used the Bmax values to rank the different GPCRs according to their expression levels, leading to a low (< 2 pmol/mg), medium (2 to 20 pmol/mg) and high (> 20 pmol/mg) classification of functional receptors. According to this classification, 45% of the GPCRs were expressed at low levels, 40% were medium and 15% were highly expressed. Since we considered that only highly expressed receptors could be used for structural studies, only three targets were of interest for the MePNet project (NK2R HUMAN, AA2A HUMAN and NK2R RAT). As a consequence, expression levels of the 85 % other GPCRs had to be significantly improved to be compatible with the planned studies.

Evaluation of the impact of several experimental factors on expression levels

Screening through the litterature, various parameters have been described that affect the expression levels of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Most of them are related to the promoter and fusion sequences that are employed, but several others rely on the culturing conditions that are used for expression induction (Macaulay Patrick et al. 2005, Reinhart and Krettler). Since the vector we used was already the result of sequence optimization (Weiss et al 1998, Schiller et al 2000, Grunewald et al 2004), we focused on the impact of four different parameters involved in cell culturing during expression. These adjustments were (i) temperature lowering from 30 to 20 °C, (ii) supplementing the medium with a specific ligand at a concentration close to 100 equivalent Kd or with other additives such as (iii) 2.5 % dimethylsulfoxide (DMSO) or (iv) 0.04 mg/ml histidine. While lowering temperature (Sarramegna et al. 2002) or adding specific ligands (Grunewald et al. 2004 and references therein) were already described to have a positive effect on overexpression for several GPCRs, supplementing the media with DMSO or histidine were in many cases observed in our experiments to be beneficial for the expression levels.

In practical, each clone was pre-cultured as usual then splitted into five different flasks corresponding to each of the four selected expression conditions in parallel with a standard induction culturing as a control. After 18 hours of culture, the cells were harvested, lysed with glass beads and the corresponding membrane fractions were prepared. These samples were then submitted to a single-point binding assay and the resulting specific binding values were compared to the standard ones.

The corresponding improvement factors represented as horizontal bars in Table 2 brought a global overview on the various effects of the tested parameters on expression levels: while lowering culturing temperature from 30 to 20 °C showed a positive impact for half of the tested receptors but a negative one on the second half, adding DMSO or specific ligand appeared to be beneficial for the large majority of the expressed GPCRs. However, one can notice that the scales indicating the improvement factors were significantly different from one expression condition to another since the specific binding was improved up to 5-6 fold in several cases with lowering temperature or adding DMSO, while no more than 2 fold improvements could be observed when adding specific ligands (with one single exception) or histidine. On the opposite, negative effects were also observed, mostly when lowering the temperature but also in few cases when adding DMSO, specific ligands or histidine.

# Combination of parameters positively acting on expression levels

As a next step, yeast cells were grown using an expression condition combining the parameters that were observed to generate positive effects on functional receptor production. The goal was to have a precise evaluation of such a generic optimization method, but also to assess eventual additive or cooperative effects of the tested parameters.

These experiments were conducted in triplicate in parallel with a standard condition culturing and the resulting cells were prepared and treated in binding experiments to generate saturation curves. The accurate Bmax and Kd values obtained from these data are presented in the last two columns of Table 2. For all the studied GPCRs, the Bmax values were always higher than the ones obtained in standard conditions, validating this optimization procedure. As a result, the initial GPCR expression classification was significantly modified, with ratios shiffting from 45 to 15% for lowly expressed receptors, from 40 to 45% for medium and from 15 to 40% for highly expressed GPCRs.

A cooperative effect of the combined parameters could be measured for five receptors (ACM2\_PIG, OPRK\_HUMAN, A2AB\_HUMAN, D2DR\_HUMAN and NY1R\_HUMAN). Actually, in the case of the ACM2\_PIG and A2AB\_HUMAN receptors for instance, the Bmax values were improved with a factor of 3.4 fold and 3.8 fold respectively, whereas separate improvement factors were lower than 1.5 and 2 respectively. For the very large majority of the other GPCR, no significant cooperative effect could be observed with even one singular exception for the HH2R\_HUMAN receptor where a better improvement factor was determined with ligand added alone (7.72 fold) compared to the combined optimization condition (3.97 fold).

# Comparison of immunodetection and ligand binding data

From the binding results we obtained using this expression optimization procedure, we were able to evaluate how overexpression was improved in terms of functional receptors detected. Some previous optimization studies described that the proportion of active receptors could be improved while the total amount of receptor produced remained constant (Sarramegna et al. 2002,), whereas one similar study on the D2S receptor showed that improving binding values was correlating with an increase of the total amount of produced receptors (Grunewald et al.

2004). In regards to these opposite observations, we wanted to assess how the total amount of expressed receptors was evolving according to the optimization performed.

Therefore, the membrane preparation that were obtained from cells grown in standard and in optimized expression conditions were analysed using a dedicated quantitative dot-blot procedure (Zeder-Lutz et al., submitted). In this optimized methodology, the Flag-tag present in each construct was used for immunological detection. A membrane preparation of a well-characterized *Pichia pastoris* strain expressing the human b<sub>2</sub> adrenergic receptor (25 pmol/mg) was used as an internal standard for relative normalisation.

The Dot-blot results (Figure 2) revealed that the levels of expressed GPCRs were varying considerably, although the total protein yield of each membrane preparation were quite similar. Actually, four of the tested receptors showed only little staining in the Dot-blot experiment (HH2R\_HUMAN, OPRK\_HUMAN, NY1R\_HUMAN, D2DR\_MOUSE) while seven receptors revealed a signal similar or higher than the b2AR (A1AB\_HUMAN, ACM1\_MOUSE, ACM1\_HUMAN, A2AB\_HUMAN, NK3R\_HUMAN, NK1R\_HUMAN, 5H5A\_HUMAN).

These results also revealed than the signals obtained in standard or optimized conditions were quite similar in most cases and for seven receptors the total amount of immunodetected proteins was even lower after optimization (ACM1\_HUMAN, HH2R\_HUMAN, 5H1D\_HUMAN, A2AB\_HUMAN and D2DR\_HUMAN). Only for six receptors a significant signal increased could be measured (A1AB\_HUMAN, ACM2\_HUMAN, 5H1B\_HUMAN, OPRK\_MOUSE, 5H5A\_HUMAN and NK2R\_RAT).

# **DISCUSSION**

As part of a European membrane protein network (MePNet), our aim was to express 100 GPCRs in *Pichia pastoris* (see <a href="www.mepnet.org">www.mepnet.org</a>) and use the targets with the highest yields of functional protein for structural studies. Since no such systematic study of large-scale production of GPCRs in *P. pastoris* had been conducted to date, we further wanted to develop, evaluate and improve new tools for the expression, solubilisation and purification of these targets with the aim to increase the number of candidates available for structural studies. Thus, as a starting point we exploited the latest vector and yeast strain optimisation for GPCR expression. The twenty recombinant clones investigated in the present study were selected as a representative panel of the total GPCR expressed in MePNet project. When placed in standard expression conditions, these clones showed significant specific ligand binding properties (Bmax), but only few receptors (NK2R\_HUMAN, AA2A\_HUMAN and NK2R\_RAT) were considered expressed at sufficient level to be compatible with structural studies.

Furthermore, the ligand affinity (K<sub>D</sub>) of HH2R\_HUMAN, NY1R\_HUMAN, A2AB\_HUMAN and NK3R\_HUMAN receptors was 3, 6, 13 and 38 fold higher respectively in *Pichia* membranes (Table 2) relative to what was described in native tissue (Leurs et al 1994, Parker et al 1998, Millan et al 2000, Oury-Donat et al 1995). As already observed for other GPCR expressed in *Pichia pastoris*, this could be explained by the differential lipid composition (nature and proportion) of yeast and mammalian membranes (*e.g.*, ergesterol versus cholesterol).

In order to improve the expression levels observed for the twenty receptors, we looked at optimising the experimental factor that are influencing expression conditions. For soluble proteins parameters including the balance of salts and nutrients in the media were also shown to be influential in improving yields in *Pichia* (Boettner et al 2002). However, the same parameters had little effect on the production of membrane proteins including GPCRs (data not shown). Similarly, some studies described that optimizing pH values during expression could be valuable for the expression of soluble protein (Koganesawa et al 2002). For the muopioid receptor (Sarramegna et al 2002) and other GPCRs (data not shown) similar observation were made but with a rather limited effect on expression levels. In the present study, we showed that a change in temperature or the addition of receptor specific ligands, DMSO, histidine in the medium resulted in significantly increased levels of recombinant protein.

# Temperature effect

In previous works, it has been shown that lowering temperature during expression could influence the yields of recombinant proteins. This has been observed with soluble proteins (Li et al 2001, Hong et al 2002, Jahic et al 2003b) but also with the mu-opioid receptor (Sarramegna et al 2002). We also found in revious unpublished works that a temperature range of between 18-24 °C during expression was optimal for various receptors. In this study, where the temperature was settled at 20°C, we could confirm the important effect on several functional receptor production. We actually found for ten targets (A1AB\_HUMAN, OPRK\_HUMAN, D2DR\_HUMAN, D2DR\_MOUSE, NK1R\_HUMAN, OPRK\_MOUSE, 5HT5\_HUMAN, NK2R\_HUMAN and NK2R\_RAT) that lowered expression temperature increased receptor yield up to six fold (Table 2). Interestingly receptors from the muscarinic acetylcholine family (ACM1\_HUMAN, ACM1\_MOUSE, ACM2\_HUMAN, ACM2\_PIG) revealed slightly decreased B<sub>max</sub> values upon temperature shift to 20°C, whereas two targets from the alpha 1B adrenergic receptor family, two from the D2 dopamine receptor family and two from the Kappa opioid family revealed 2-6 fold increased B<sub>max</sub> for the same temperature. This suggests that this temperature effect is strongly receptor specific.

Possible explanations for this temperature effect include slowing down protein production in order to not overload the translocation machinery, the protein processing or the cellular trafficking. This effect could be as well involved in lowering proteolytic activities (Jahic et al 2003a, Jahic et al 2003b) or up-regulating cold shock proteins that include chaperones.

Chaperones are proteins responsible for correct folding and assembly of polypeptide chains and are virtually present in all living organisms. Previous study showed that certain cold shock proteins, including chaperones, undergo induction following temperature shift from 30 to 10 °C in *S. cerevisiae* (reviewed in Inouye and Phadtare 2004). To our knowledge not much is known about the induction of cold shock proteins in *P. pastoris* but it could be possible that similar effects increase the level of certain chaperones after lowering the temperature to 20 °C in this yeast species. Furthermore, increased chaperone level could lead to higher amounts of proper folded recombinant receptor in yeast cells.

In addition to chaperone increase, it was also reported that *S. cerevisiae* undergo up- and down-regulation of many other genes upon cold shock. These are mainly genes involved in metabolism, protein folding, protein synthesis, transport and localisation as well as several uncharacterised proteins. Assuming that similar effects take place in *P. pastoris* after shifting

the temperature to lower temperature, there might be a combination of effects leading to increased amounts of functional receptor under these growth conditions.

# Ligand effect

Already over ten years ago, it was found that adding specific ligand to *S. cerevisiae* expression medium enhanced the relative fraction of receptors that specifically binds ligand (King et al 1990). Recently, we reported similar effects for the 5HT<sub>5</sub> receptor, the b2 adrenergic receptor (Weiss et al 1998) and the dopamine D2 receptor (Grunewald et al 2004). Here, we investigated how using ligands in *P. pastoris* culture media could be used as a general method to increase the overall yield of receptor binding sites for this system. Specifically, we compared the amount of binding-competent receptor produced when yeast clones were grown in expression media with and without ligand.

Interestingly, it was possible to increase the expression level for all receptors by adding ligand to the expression medium except for two (5H1B\_HUMAN, NK2R\_RAT - see Table 2). For some targets like the OPRK\_HUMAN, DRD2\_HUMAN and the 5HT5A\_HUMAN, the level of functional receptor could be increased by more than 2 fold compared to standard conditions and for the HH2R\_HUMAN receptor the improvement factor was even more than 7.

Even if this ligand effect is not clearly understood, it is speculated that the presence of the ligand could help in the protein folding steps during synthesis and then serve as a stabiliser for the produced receptor.

# DMSO effect

To our knowledge, this study is the first to report on the effect of DMSO on GPCR production in yeast. The production yield (B<sub>max</sub>) of sixteen out of twenty tested receptors was increased up to 6 fold compared to the standard conditions by adding 2.5 % DMSO to the expression medium (Table 2). Four receptors revealed almost no effect or slightly reduced production yield (ACM1 HUMAN, 5H1D HUMAN, NY1R HUMAN and NK1R HUMAN).

It was reported previously that additional DMSO in the growth medium dramatically alters the expression pattern of yeast (Zhang et al 2003). Among others, especially genes involved in lipid synthesis were up-regulated and could have positive effects on the production of

membrane proteins in yeasts (Murata et al 2003). Furthermore, it was shown that DMSO alters the membrane properties of several organisms dramatically (Yu et al 1994) leading to increased permeability of the membrane. This could explain the additive effect for the combination ligand/DMSO where the ligand can cross the membrane more easily and reach therefore the receptor population in internal membrane compartments.

# Histidine effect

Twelve of the tested receptors revealed increased expression level upon supplementing the medium with additional histidine. Here the improvement factor was not as strong as for the other parameters (<2). Histidine is known to stabilise proteins in solution but to our knowledge nothing is reported so far about the effect of histidine enriched expression media for recombinant membrane protein production. One scenario could be that histidine has more an additional nutrition effect on the yeast cell physiology rather than a direct interaction on the receptor. This would help for the recombinant protein production or protect the cells from toxic side effects of the recombinant protein. However, no evident data are available to explain this measurable effect and actually no enhanced growth could be detected upon addition of histidine (data not shown).

### Optimized condition

Interestingly, by combining all positively acting parameters in an optimized condition (temperature to  $20^{\circ}$ C, DMSO to 2.5%, specific ligand, 0.04% histidine), all clones revealed higher ligand binding values ( $B_{max}$ ) compared to the standard condition. Strikingly, 8 out of 20 receptors revealed high  $B_{max}$  values (> 20 pmol/mg) after optimisation. Several of them (D2DR\_HUMAN, NK2R\_HUMAN...) were even showing higher values to what was reported for expression in mammalian or insect cell lines (Sarramegna et al 2003), strengthen the high potency of this expression system.

Even for receptors where each separate effect was very little or negative (eg NY1R\_HUMAN) the  $B_{max}$  value was almost doubled (5.6 to 10 pmol/mg) by combining all supplements, clearly indicating some cooperative effects. On the other hand, it was obvious that for some receptors where significant improvement factors were observed for all

parameters, the final  $B_{max}$  value was not consistent with an additive effect indicating that the maximum optimisation level was reached. From these observation, we then proposed that, depending on the target, a certain amount of receptor that can be produced in a functional or non-functional form, and, dependent on the expression condition, the equilibrium can be shifted towards the functional form.

# Correlation between binding and Dot-blot data

Interestingly, the rank order of total receptor produced (as assessed by Dot-blots, Figure 2) did not correlate well with the results obtained from the ligand binding assays. For example A1AB HUMAN, ACM1 MOUSE and ACM1 HUMAN revealed strong signal in the Dotblot but little receptor binding in radioactive receptor binding assay (B<sub>max</sub> < 1 pmol/mg). Similarly, the receptor NK3R HUMAN revealed a strong signal in Dot-blot and a B<sub>max</sub> of 7.4 pmol/mg. Contrary, the receptors NK2R HUMAN, AA2A HUMAN and NK2R RAT revealed high ligand binding (Bmax > 75 pmol/mg) whereas the total amount of expressed receptor was low. This led to the conclusion that the amount of functional receptor (in terms of ligand binding) does not scale with the total amount of receptor produced. Consistent results were previously obtained for the mu opioid receptor also expressed in Pichia (Sarramegna et al 2002): fluorescent assessment of GFP-tagged receptor was compared with ligand binding, determining a ratio of functional receptor to total receptor of 1:20 in standard conditions. In the same study, this ratio was increased to 4:18 after optimization indicating that the improvements where acting on the functionality rather than on the total amount of the receptor produced. This was also the case for 14 receptors of the present study since the immunodetected signal were not changed after optimization while the total number of binding sites (Bmax) values were increased from 1.3 to more than 8 fold. For the six resting GPCRs, even if the total amount of detected protein was slightly increased, it was still less than the Bmax improvements. These data are all in agreement with the idea that GPCRs are expressed in Pichia under a functional / non-functional equilibrium that can be modulate with the expression conditions used.

# Improving GPCR expression in Pichia pastoris

Finally one can say we created a valuable toolbox for the optimisation of the GPCR production in P. pastoris. This toolbox consists of a protease deficient yeast strain, an optimised vector and a set of expression conditions to screen (temperature, DMSO, ligand and histidine). Even if each separate condition was not producing a positive effect with every GPCR tested, at least one of the four was beneficial on expression levels. Further, the combination of all positive parameters allowed to increase the  $B_{max}$  in every case, with often some significant cooperative effects observed. For some receptors, additional experiments allowed to improve further the number of active receptors in subtly refining the temperature, the type and concentration of ligand or the DMSO concentration (data not shown).

As a result, this kind of generic approach could be of great interest to rapidly and efficiently screen for rough optimization of one given GPCR expressed in *Pichia pastoris*. On this basis, further optimization may then be realized in refining each parameter as a second screening.

### **REFERENCES**

- Akermoun M, Koglin M, Zvalova-Iooss D, Folschweiller N, Dowell SJ, Gearing KL.
   Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells. Protein Expr Purif. 2005 (in press)
- 2. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J. 1999 18(7):1723-9.
- 3. Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast Pichia pastoris. J Biotechnol. 2002 99(1):51-62.
- 4. Drew D, Froderberg L, Baars L, de Gier JW. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 2003 1610(1):3-10.
- 5. Grunewald S, Haase W, Molsberger E, Michel H, Reilander H. Production of the human D2S receptor in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. Receptors Channels. 2004 10(1):37-50.
- 6. Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in Pichia pastoris. Biotechnol Bioeng. 2002 79(4):438-49.
- Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH,
   Patchett AA. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery.
   Trends Pharmacol Sci. 2001 22(3):132-40.
- 8. Inouye M, Phadtare S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. Sci STKE. 2004(237):pe26.
- 9. Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, Martinelle M, Enfors SO. Analysis and control of

- proteolysis of a fusion protein in Pichia pastoris fed-batch processes. J Biotechnol. 2003 102(1):45-53.
- 10. Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in Pichia pastoris bioreactor cultures. Microb Cell Fact. 2003 18;2(1):6.
- 11. King K, Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit. Science. 1990 250(4977):121-3. Erratum in: Science 1991 251(4990):144
- 12. Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. Chembiochem. 2002 3(10):928-44
- 13. Koganesawa N, Aizawa T, Shimojo H, Miura K, Ohnishi A, Demura M, Hayakawa Y, Nitta K, Kawano K. Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm Pseudaletia separata by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2002 25(3):416-25.
- 14. Kuhn P, Wilson K, Patch MG, Stevens RC. The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography. Curr Opin Chem Biol. 2002 6(5):704-10.
- 15. Leurs R, Smit MJ, Menge WM, Timmerman H. Pharmacological characterization of the human histamine H2 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. Br J Pharmacol. 1994 112(3):847-54.
- 16. Lundstrom K. Structural genomics of GPCRs. Trends Biotechnol. 2005 23(2):103-8.
- 17. Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta. 2003 1610(1):90-6.
- 18. Lyne PD Structure-based virtual screening: an overview. Drug Discov Today 2002 7(20):1047-55.

- 19. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast. 2005 22(4):249-70.
- 20. Massotte D. G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies. Biochim Biophys Acta. 2003 1610(1):77-89.
- 21. Millan MJ, Newman-Tancredi A, Audinot V, Cussac D, Lejeune F, Nicolas JP, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, Rivet JM, Dekeyne A, Gobert A. Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha(2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)(1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D(2) and D(3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. Synapse. 2000 35(2):79-95.
- 22. Murata Y, Watanabe T, Sato M, Momose Y, Nakahara T, Oka S, Iwahashi H. Dimethyl sulfoxide exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. J Biol Chem. 2003 278(35):33185-93
- 23. Oury-Donat F, Carayon P, Thurneyssen O, Pailhon V, Emonds-Alt X, Soubrie P, Le Fur G. Functional characterization of the nonpeptide neurokinin3 (NK3) receptor antagonist, SR142801 on the human NK3 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. J Pharmacol Exp Ther. 1995 274(1):148-54.
- 24. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science. 2000 289(5480):739-45.
- 25. Parker EM, Babij CK, Balasubramaniam A, Burrier RE, Guzzi M, Hamud F, Mukhopadhyay G, Rudinski MS, Tao Z, Tice M, Xia L, Mullins DE, Salisbury BG. GR231118 (1229U91) and other analogues of the C-terminus of neuropeptide Y are potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonists and neuropeptide Y Y4 receptor

- agonists. Eur J Pharmacol. 1998 349(1):97-105.
- 26. Reinhart C, Krettler C. Expression of membrane proteins in yeasts. REFS
- 27. Sarramegna V, Demange P, Milon A, Talmont F. Optimizing functional versus total expression of the human mu-opioid receptor in Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2002 24(2):212-20.
- 28. Sarramegna V, Talmont F, Demange P, Milon A. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. Cell Mol Life Sci. 2003 60(8):1529-46.
- 29. Schiller H, Haase W, Molsberger E, Janssen P, Michel H, Reilander H. The human ET(B) endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* shows high-affinity binding and induction of stacked membranes. Receptors Channels. 2000 7(2):93-107.
- 30. Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of Pichia pastoris for high-level foreign gene expression. Biotechnology 1994 12(2):181-4.
- 31. Sizmann D, Kuusinen H, Keranen S, Lomasney J, Caron MG, Lefkowitz RJ, Keinanen K. Production of adrenergic receptors in yeast. Receptors Channels. 1996 4(3):197-203.
- 32. Stanasila L, Pattus F, Massotte D. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: human opioid receptors under scrutiny. Biochimie. 1998 80(5-6):563-71.
- 33. Tate CG. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. FEBS Lett. 2001 504(3):94-8.
- 34. Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast Pichia

- pastoris. Biochem J. 1998 330:1137-47.
- 35. Weiss HM, Haase W, Reilander H. Expression of an integral membrane protein, the 5HT5A receptor. Methods Mol Biol. 1998 103:227-39.
- 36. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. Biosci Rep. 1994 14(6):259-81.
- 37. Zhang W, Needham DL, Coffin M, Rooker A, Hurban P, Tanzer MM, Shuster JR. Microarray analyses of the metabolic responses of Saccharomyces cerevisiae to organic solvent dimethyl sulfoxide. J Ind Microbiol Biotechnol. 2003 30(1):57-69.

# **FIGURES**

Receptor		Radioligand	Cold ligand	Binding buffer	Washing buffer	Ref.	
#	Name	Uniprot	- Ladiongund	(conc.)	Binding carrer		
1	ADA1B_HUMAN	P35368	[ <sup>3</sup> H]Prazosin	Prazosin (1µM)	30mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1% BSA	30mM Tris pH7.4	Millan, 2000
2	ACM1_MOUSE	P12657	[ <sup>3</sup> H]QNB	Atropine (10µM)	50mM Tris pH7.4	50mM Tris pH7.4	Peralta, 1987
3	ACM1_HUMAN	P11229	[³H]QNB	Atropine (10µM)	50mM Tris pH7.4	50mM Tris pH7.4	Peralta, 1987
4	HRH2_HUMAN	P25021	[3H]Tiotidine	Cimetidine (700µM)	50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50mM Tris pH7.4	Leurs, 1994
5	ACM2_PIG	P06199	[ <sup>3</sup> H]QNB	Atropine (10µM)	50mM Tris pH7.4	50mM Tris pH7.4	Peralta, 1987
6	OPRK_HUMAN	P41145	[3H]Diprenorphin	Naloxone (10µM)	20mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl	H <sub>2</sub> O	Befort, 1996
7	5HT1D_HUMAN	P28221	[ <sup>3</sup> H]GR125743	Yohimbine (10µM)	50mM Tris pH7.4, 4mM CaCl <sub>2</sub> , 10μM Pargyline, 0.1% Ascorbic acid	50mM Tris pH7.4	Audinot, 2001
8	ADA2B_HUMAN	P18089	[3H]Rauwolscine	Yohimbine (50µM)	30mM Hepes pH7.4, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1% BSA	30mM Tris pH7.4	Millan, 2000
9	ACM2_HUMAN	P08172	[ <sup>3</sup> H]QNB	Atropine (10µM)	50mM Tris pH7.4	50mM Tris pH7.4	Peralta, 1987
10	DRD2_HUMAN	P14416	[3H]Spiperone	Butaclamol (10µM)	50mM Tris pH7.4, 150mM NaCl	H <sub>2</sub> O	Hill, 1996
11	NK3R_HUMAN	P29371	[ <sup>3</sup> H]SR142801	SB222200 (10µM)	50mM Tris pH7.4, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1mM EDTA	50mM Tris pH7.4	Sarau, 2000
12	NPY1R_HUMAN	P25929	[ <sup>3</sup> H]NPY	BIBP (30µM)	50mM Tris pH7.4, 5mM KCl, 10mM NaCl, 2.5mM CaCl <sub>2</sub> , 0.1% BSA	50mM Tris pH7.4	Cabrele, 2001
13	DRD2_MOUSE	P61168	[3H]Spiperone	Butaclamol (1µM)	50mM Tris pH7.4, 150mM NaCl	H <sub>2</sub> O	Hill, 1996
14	5HT1B_HUMAN	P28222	[ <sup>3</sup> H]GR125743	GR127935 (10µM)	50mM Tris pH7.7, 5mM CaCl <sub>2</sub> , 50mM NaCl, 50mM KCl,12.5mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , BSA 0.1% 10µM Pargyline, 0.1% Ascorbic acid	50mM Tris pH7.4	Domenech, 1997
15	NK1R_HUMAN	P25103	[ <sup>3</sup> H]SR140333	SR140333 (5μM)	30mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1% BSA	30mM Tris pH7.4	Lundstrom, 1997
16	OPRK_MOUSE	P33534	[3H]Diprenorphin	Naloxone (10µM)	20mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl	H <sub>2</sub> O	Befort, 1996
17	5HT5A_HUMAN	P47898	[³H]LSD	Serotonin (1mM)	50mM Tris pH7.4, 100mM NaCl	H <sub>2</sub> O	Rees, 1994
18	NK2R_HUMAN	P21452	[ <sup>3</sup> H]SR48968	SR48968 (10µM)	50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 20% Glycerol	H <sub>2</sub> O	Grisshammer, 1994
19	AA2AR_HUMAN	P29274	[ <sup>3</sup> H]ZM241385	Theophylline (1mM)	20mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl	20mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl	Weiss, 2002
20	NK2R_RAT	P16610	[ <sup>3</sup> H]SR48968	SR48968 (1µM)	50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 20% Glycerol	H <sub>2</sub> O	Grisshammer, 1994

Table 1 :Binding protocols and reference.

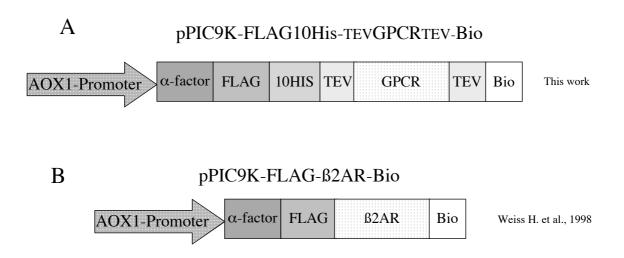
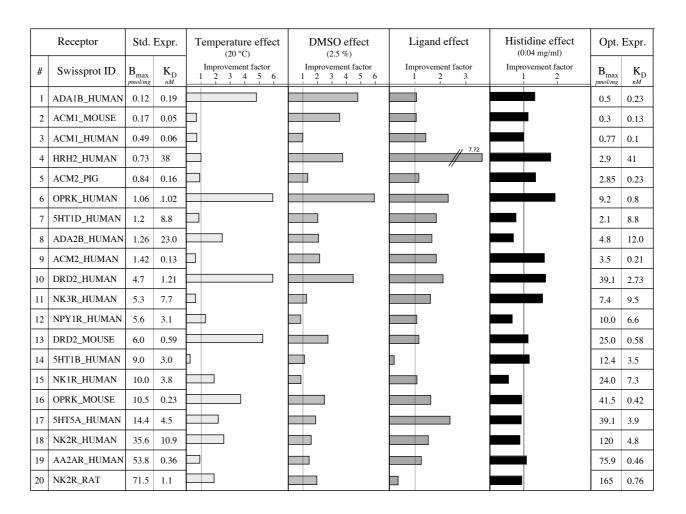
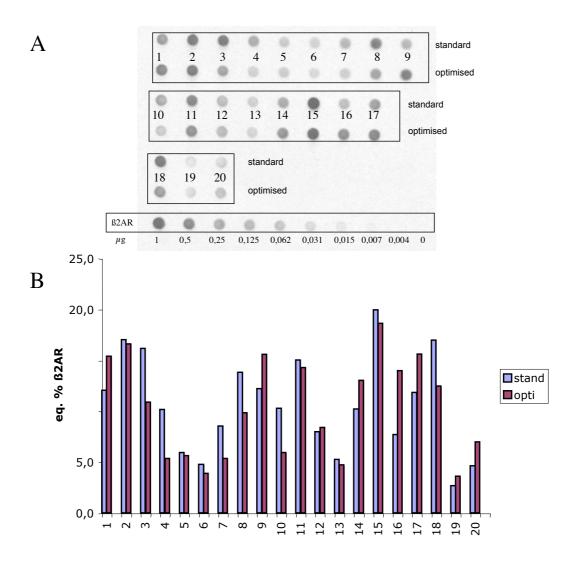


Figure 1: Expression constructs for the production of the &protection 2-adrenergic receptor and MePNet G-protein coupled receptor in *P.pastoris*. AOX1-Promoter: Alcohol oxidase 1 gene promoter;  $\alpha$ -factor: coding region for a prepropetide secretion signal sequence from S. cerevisae mating type factor  $\alpha$ ; FLAG: coding sequence for the FLAG-tag; 10 HIS: coding sequence for the His-tag consisting of 10 histidine codon; Bio: coding region for the biotynylation domain of the transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii*. TEV: Tev protease clevage site.

- (A) Expression vector used for the production of GPCR in the MePNet program.
- (B) Expression vector used for the production of human ß2 adrenergic receptor in *P. pastoris*. This vector was already describe (Weiss H. et al., 1998) and kindly gives by H. Michel's laboratory.



**Table 2 : Effect of four different parameters on functional receptor production.** This table resum for the 20 GPCR tested the Bmax and Kd values in classical induction conditions. The improvement factor of the tested parameters (calculate accordingly to the classical condition : for classical induction the improvement factor is 1). The Bmax and Kd value of optimised induction condition (combination of parameters that generate positif effect).



**Figure2 : Dot-blot on 20 GPCR**. A. dot-blot on membrane preparation revealed with anti-Flag M2 antibody. B. Quantification of the dot-blot using ScionImage (software)

# Chapitre 8 : Solubilisation et Purification

### I. Introduction

Les cibles les plus intéressantes du point de vue des résultats de mesures de fonctionalité ont été sélectionées pour les étapes suivantes comprenant la solubilisation et la purification.

Préalablement aux études de purification, nous devions déterminer les conditions permettant d'extraire les récepteurs des membranes en les rendant solubles dans l'eau tout en conservant un environnement favorable au maintien de leurs fonctionnalités et à leurs stabilités. De façon habituelle, cette extraction est réalisée par l'emploi de détergents doux (LeMaire et al., 2000). Les détergents solubilisent les protéines membranaires en mimant l'environnement lipidique des membranes biologiques. Les détergents possèdent une partie polaire et une partie hydrophobe qui leur permet de dissoudre la bicouche lipidique pour former des complexes solubles dans l'eau contenant des lipides et des protéines membranaires. De tels complexes composés de détergent, de protéine et probablement de lipides sont appelés « micelles mixtes ». Les lipides et les détergents composant les micelles mixtes entourent les domaines transmembranaires ( hydrophobes ) des protéines membranaires ce qui permet de maintenir la structure de la protéine (Sanders et al. 2004) et de conserver les protéines membranaires en solution. Il existe de nombreux détergents disponibles qui peuvent présenter un grand nombre de structures moléculaires différentes (Sanders et al. 2004). Le choix des détergents et des conditions expérimentales peut avoir un énorme impact sur le succès de la méthodologie appliquée à une protéine membranaire particulière (Garavito et al. 2001).

Il faut cependant noter que les détergents les plus efficaces pour la solubilisation ne sont souvent pas optimum pour l'étape de cristallisation. En effet, les protéines membranaires sont généralement plus solubles et plus stables en présence de détergents ayant de longues chaînes alkylées, mais ces détergents diminuent l'efficacité de cristallisation en formant de grandes micelles et en augmentant la concentration en solvant (lwata . 2003).

La stratégie adoptée au sein du projet MePNet consiste à soumettre les récepteurs à un premier criblage utilisant des conditions de solubilisation dites « standard » et en criblant une série de 15 détergents différents sélectionnés pour le projet. La liste de détergents utilisés à été mise au point grâce à un important travail bibliographique (Jones. 1999). À la suite de ce premier criblage, les détergents fournissant les résultats les plus intéressants en termes de solubilisation et de maintien de l'activité sont sélectionnés pour une seconde étape de criblage. Ces cribles secondaires font varier divers paramètres tels que la concentration en protéine, en détergent et en agent stabilisant tel que le glycérol, ou encore

la force ionique et l'ajout d'additif afin de sélectionner une condition de solubilisation optimisée qui sera utilisée pour la purification.

Les méthodes de purification des protéines membranaires utilisent comme pour les protéines solubles des techniques de chromatographie. Cependant, les protéines membranaires peuvent présenter de fortes interactions avec les supports chromatographiques ce qui diminue l'efficacité de certaines des colonnes utilisées. Par conséquent les chromatographies d'affinités sont choisies préférentiellement pour les protéines membranaires (Iwata 2003).

Une mise au point préalable de l'étape de purification a été réalisée afin de déterminer la stratégie la plus adaptée au projet. Le protocole mis au point exploite la présence de l'étiquette 10-Histidine située en N-terminal et le domaine de biotinylation fusionné en C-terminal des récepteurs exprimés. Ainsi, la purification des récepteurs peut se réaliser en deux étapes. La première utilise une colonne d'affinité de type Nickel permettant de retenir le récepteur par l'intermédiaire de l'étiquette 10-Histidine. La fraction éluée est ensuite chargée sur une colonne d'affinité de type avidine monomérique qui retient le récepteur par son extrémité C-terminal biotinylée. Le récepteur ainsi purifié est ensuite concentré. Ces tests ont été réalisés en batch ou en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Aktä-FPLC, Amersham Bioscience). A chacune de ces différentes étapes, la qualité de la purification a été analysée sur gel d'acrylamide coloré au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent. Des études de fonctionnalités ont été réalisées en parallèle afin de suivre la quantité de récepteurs fonctionnels présents à chacune des étapes de cette purification.

La réalisation d'études structurales nécessite en général l'obtention de quelques milligrammes de protéines purifiées. Dans le cas des protéines membranaires, cela représente de grandes quantités de protéines qui ne peuvent être produites que par la mise en oeuvre d'importants volumes de culture. Dans le cas de la levure *Pichia pastoris*, l'utilisation de cultures en fermenteur permet de pallier ce problème et divers protocoles de fermentation ont largement été décrits comme apportant une nette amélioration des résultats observés en erlens (Prinz et al. 2004, Jahic et al. 2003). Dans le cadre de cette étude, des tests de fermentation ont été réalisés sur l'un des récepteurs étudiés, le récepteur à sérotonine 1D, en utilisant dans un premier temps des conditions standard de culture puis en faisant varier la température d'induction. Les données préliminaires obtenues se sont montrées plutôt encourageantes mais nécessitent d'être optimisées pour pouvoir poursuivre l'étude.

L'analyse par Western-blot des échantillons obtenus aux différentes étapes de la purification nous a révélé la présence de protéines présentes à des tailles supérieures à celles attendues. Afin de déterminer le degré de maturation de ces protéines

(hyperglycosylation, défaut de clivage de la séquence signal...), des analyses spécifiques ont été réalisées.

### II. Solubilisation

Trois différents récepteurs présentant d'intéressants résultats lors des tests de fixation de ligand à l'équilibre ont été sélectionnés pour l'étape de solubilisation. Il s'agit des récepteurs humains à sérotonine 1D, à neuropeptide Y1 et à histamine H2.

La stratégie adoptée est celle qui a été mise en place pour l'ensemble du projet MePNet : dans un premier temps, criblage d'un panel de 15 détergents (tableau 16), puis optimisation des conditions de solubilisation en faisant varier certains paramètres tels que la concentration en sel et en glycérol.

Le criblage des 15 détergents (tableau16) a été réalisé en utilisant des conditions dites « standard ». Ces conditions consistent à solubiliser les protéines membranaires à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon de solubilisation contenant 10% de glycérol, 100 mM de NaCl et 20 mM de tampon Hepes à pH7. La solubilisation est réalisée pendant 2h00 à 4 °C. Les protéines solubilisées sont récupérées à la suite d'une ultracentrifugation et sont quantifiées afin de déterminer le pourcentage de protéines solubilisées pour chaque détergent testé. La quantité de récepteur solubilisé est analysée en parallèle par des tests d'immunodétection.

Des études qualitatives sont ensuite réalisées sur ces échantillons par la mise en oeuvre de tests de fixation de ligand à l'équilibre (« binding »). Une méthode de filtration et de comptage permettant de traiter 96 échantillons à la fois (TopCount, Perkin Elmer) est utilisée lors de cette étape. Un échantillon membranaire non solubilisé est testé en parallèle afin de servir de référence.

DETERGENT	CLASSIFICATION	Concentration utilisée	CMC mM
DoDM/LM	n-dodecyl-ß-D-maltopyranoside	1	0,17
Ng	Nonyl-ß-D-glucoside	1	6,5
OG	n-octyl-B-D-glucopyranoside	2	19
UM	n-undecyl-ß-D-maltopyranoside	1	0,59
DM	n-decyl-β-D-maltopyranoside	1	1,6
DG	n-decyl-ß-D-glucopyranoside	1	2;3
D/C	Digitonin/Cholate	1.25/0.25	?/9 ;15
L-sucrose	Laurylsucrose	1	0,3
FOS12	Fos-Choline12	1	1,5
FOS14	Fos-Choline14	1	0,12
FOS16	Fos-Choline16	0,1	0,013
LDAO	Lauryldimethylamine oxide	1	2
Cymal 6	Cyclohexyl-hexyl-ß-D-maltoside	1	0,56
ZW3-12	n-dodecyldulfobetaine	1	2;4
CHAPS	(3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propane sulfonate)	1	6;10
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	1	8
Négatif	0	0	0

Tableau 16 : Liste des détergents utilisés.

Le SDS est utilisé comme témoin puisqu'il s'agit d'un détergent très fort qui a la capacité de dénaturer irréversiblement la protéine. Le témoin négatif ne contient pas de détergent

### 1. Solubilisation du récepteur à sérotonine 1D

Les résultats de « binding » ainsi que les pourcentages de solubilisation sont présentés pour chacun des détergents testés dans le graphique de la figure 91A.

Le criblage des détergents nous a permis de sélectionner les trois détergents permettant de conserver au mieux la fonctionnalité du récepteur. Ces détergents correspondent au DM (non ionique), FOS16 (dérivé lipidique) et CHAPS (zwitterionique). Ces détergents permettent d'obtenir un pourcentage de solubilisation supérieur à 40% (rapport entre protéines présentes dans la fraction solubilisée et protéines présentes dans l'échantillon avant solubilisation), à l'exception du CHAPS pour lequel on obtient 33% de protéines membranaires solubilisées (Figure 91A).

Ces échantillons ont également été déposés sur une membrane de nitrocellulose et analysés par Dot-blot (figure 92) afin de déterminer la quantité de récepteur solubilisé (quantification du dot-blot présentée sur la figure 93). Le dot-blot nous indique que ces trois détergents solubilisent le récepteur mais que le FOS16 est cependant moins efficace que les deux autres détergents, le CHAPS étant celui qui solubilise la plus grande quantité de récepteurs. Par ailleurs, et comme on pouvait s'y attendre, aucune solubilisation n'est observée pour le témoin négatif ne contenant pas de détergent (voir dot-blot, figures 92 et 93).

Une optimisation a ensuite été réalisée en utilisant comme détergent le CHAPS et le FOS16 et en faisant varier les concentrations en sel et en glycérol (Figure 91B). Ces résultats indiquent que pour le CHAPS, l'utilisation de glycérol à une concentration de 50% apporte de meilleurs résultats qu'à 25 %. On observe également pour ce détergent que l'augmentation de la concentration en sel n'améliore pas les résultats. Pour le FOS16, aucun des paramètres parmi ceux testés n'améliore les conditions de solubilisation. Bien qu'elle soit loin d'être exhaustive cette étude nous a permis d'identifier une condition permettant de maintenir l'activité du récepteur tout en le solubilisant. Cette condition optimisée, qui utilise 1% de CHAPS, 250 mM de NaCl et 50% de Glycérol, sera celle utilisée lors de l'étape de purification.

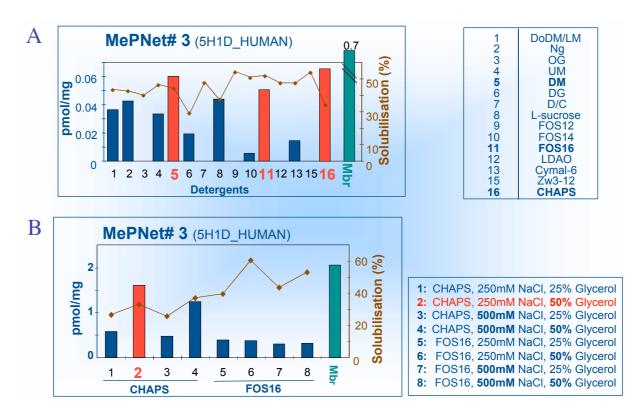


Figure 91 : Solubilisation du récepteur 5HT1D.

Le criblage de 15 détergents (A) permet de sélectionner les détergents sur lesquels des optimisations seront réalisées (B). L'expérience de binding est réalisée sur des plaques 96-puits. La quantification de la concentration de protéines solubilisées nous a permis de déterminer le pourcentage de purification présenté en brun pour chaque condition testée.

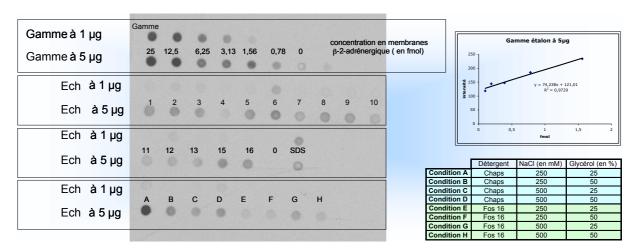


Figure 92 : Dot-blot comparant différentes conditions de solubilisation.

1 à 5 μg d'extrait solubilisé est déposé sur le dot et révélé grâce à un anticorps M2 anti-FLAG.

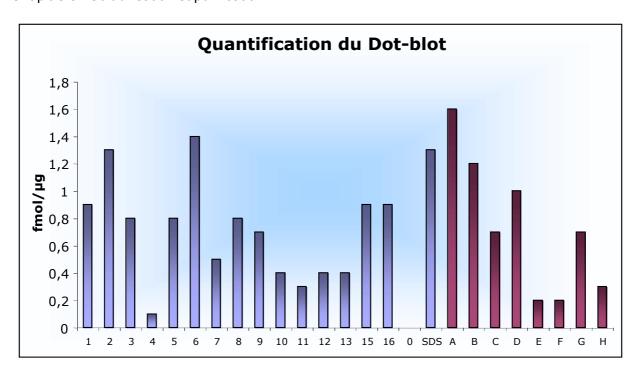


Figure 93: Quantification du dot-blot.

Quantification du dot-blot (figure 92) en utilisant le logiciel ScionImage. Les numeros 1 à 16 correspondent aux détergents listés dans le tableau 16. Le zero correspond à un contrôle sans détergent. Les lettres A à H correspondent à différentes conditions de solubilisation voir figure 92.

### 2. Solubilisation du récepteur à neuropeptide Y1

Les tests de fixation des ligands du récepteur NPY1 (figure 94) indiquent de plus grandes variations entre les détergents que dans le cas du récepteur à sérotonine 1D. En effet, certains détergents créent un environnement totalement défavorable à l'activité du récepteur à neuropeptide Y1 (tel que le OG ou le L-sucrose) tandis que d'autres permettent dans ces conditions dites « standard » de maintenir jusqu'à 30% de l'activité du récepteur (déterminé par comparaison avec l'activité présente dans la préparation membranaire initiale). Cinq détergents présentent ainsi des résultats intéressants : le CHAPS (zwitterionique), le UM (détergent non ionique), le FOS16 (un dérivé lipidique), le mélange D/C (mélange d'un détergent non ionique et ionique) et le DM (non ionique). Ces détergents solubilisent plus de 50% des protéines totales à l'exception du CHAPS qui en solubilise environ 40%. Les résultats d'immunodétection (non présentés) indiquent que le mélange Digitonin/Cholate solubilise la plus grande quantité de récepteur, les autres détergents présentent des efficacités de solubilisation plutôt moyennes et quasiment équivalentes.

Les résultats obtenus après optimisation montrent, pour les détergents testés, peu d'effet lié à l'augmentation de la concentration en glycérol, à l'exception du CHAPS pour lequel l'ajout de glycérol semble à nouveau avoir un effet positif. L'augmentation de la force

ionique ne semble pas non plus, dans cette expérience, permettre d'améliorer les conditions de solubilisation.

Les optimisations réalisées sur ces cinq détergents nous ont permis de sélectionner une condition se démarquant des autres et permettant de solubiliser le récepteur tout en conservant un maximum de fonctionnalité : elle comprend 1% de CHAPS, 100 mM de NaCl et 50% de Glycérol.

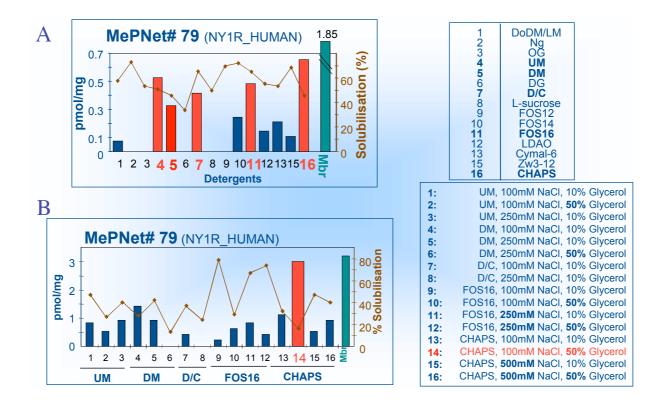


Figure 94 : Criblage et optimisation de la solubilisation du récepteur NPY1.

Les résultats du criblage des 15 détergents sont présentés sur le graphique A. Le graphique B présente les résultats des optimisations en utilisant cinq différents détergents. Les meilleures conditions sont indiquées en rouge.

### 3. Solubilisation du récepteur à histamine H2

Le criblage des 15 détergents (figure 95A) a permis pour ce récepteur de sélectionner trois différents détergents présentant des résultats significatifs. On constate pour ce récepteur un maintien très faible de la fonctionnalité lors de la solubilisation quelques soient les détergents utilisés. Les détergents sélectionnés lors de ce premier criblage sont : le mélange digitonine-cholate (mélange d'un détergent non-ionique et ionique), le Zw 3-12 et le CHAPS (deux détergents zwitterioniques). Le mélange digitonine-cholate présente le plus faible pourcentage de solubilisation. Les résultats d'immunodétection indiquent que parmi ces trois détergents c'est le mélange digitonin-cholate qui permet de solubiliser la plus importante quantité de récepteur (résultats non présentés).

L'optimisation des conditions (figure 95B) nous indique à nouveau de faibles valeurs de « binding » par rapport à la préparation membranaire initiale. La meilleure condition de solubilisation identifiée par cette expérience présente en effet des valeurs de binding correspondant au tiers de la valeur observée pour les membranes. Cette condition comprend 1% de CHAPS, 100 mM de NaCl et 50% de Glycérol.

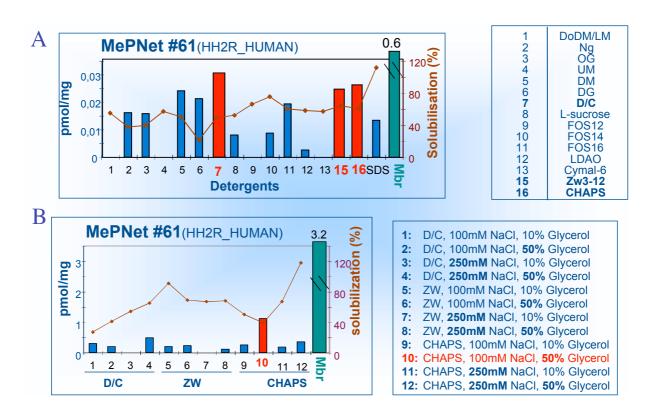


Figure 95 : Solubilisation du récepteur à histamine H2.

Le criblage des 15 détergents est présenté sur le graphique A. Les optimisations sont présentées sur le graphique B.

### **III. Purification**

Cette partie présente les résultats des travaux de purification réalisés sur deux des récepteurs parmi les trois étudiés en solubilisation. Il s'agit des récepteurs à sérotonine 1D et à neuropeptide Y1. Après la réalisation d'une solubilisation en utilisant les conditions optimisées déterminées dans le paragraphe précédent, une purification en deux étapes est appliquée.

La première étape utilise l'étiquette 10 histidine située dans la région N-terminal des récepteurs. L'étiquette histidine est fréquemment utilisée pour la purification de protéines recombinantes. L'utilisation de 10 histidines au lieu d'une étiquette 6-Histidine (plus couramment utilisée) présente l'avantage de lier plus fortement la matrice d'affinité. Par conséquent, de plus fortes concentrations en éluant (ici en imidazole) peuvent être utilisées dans les étapes de lavage précédent l'élution afin d'éliminer une plus grande quantité de contaminants.

Cette étiquette 10 histidines permet l'utilisation d'une chromatographie d'affinité chélatant des ions métalliques ou IMAC (IMAC : immobilized-metal affinity chromatography). En effet, certains acides aminés (tel que l'histidine) peuvent former des complexes avec les métaux chélatés autour d'un pH neutre (pH 6-8) (Sundberg & Martin. 1974). Lors d'essais préliminaires, nous avons testé les propriétés d'affinité de différents ions métalliques (le Zn<sup>2+</sup>, le Ni 2+ et le Cu 2+) chélatés par différentes résines (Pharmacia ou Sigma) pour la purification du récepteur à sérotonine 1D. L'efficacité de purification a été déterminée par une quantification de la concentration protéique de chaque éluat ainsi que par un test d'immunodétection utilisant un anticorps M2 anti-Flag. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer, pour chacun des éluats, le pourcentage de récepteur récupéré en fonction des matrices testées. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec les matrices de Ni<sup>2+</sup> (Sigma) et de Cu <sup>2+</sup> (Pharmacia) qui sont en effet connues pour permettre les plus fortes liaisons. Des résultats moins spécifiques ont été obtenus avec la matrice Zn<sup>2+</sup> (Pharmacia) qui présente une moindre efficacité de liaison. Sur la base de ces résultats, c'est la colonne de nickel qui a été choisie comme première étape de purification pour la suite de l'étude.

On peut par ailleurs noter que les chromatographies d'affinité de type Nickel sont fréquemment employées pour la purification de RCPG fusionnés à une étiquette Histidine. C'est en effet de cette façon que les récepteurs à cannabinoïdes CB2 (Feng W. et al., 2002), à dopamine D2S (Jong et al. 2004), à endothéline ETB (Schiller et al.2000) et à opioïdes de type mu (Sarramegna V. et al., 2005) exprimés dans la levure *P.pastoris* ont été purifiés.

La seconde étape de purification utilise l'étiquette de biotinylation fusionnée dans la région C-terminal du récepteur. Des colonnes d'affinité couplées à la streptavidine peuvent

être utilisées pour la purification de protéines biotinylées. En effet, une très forte interaction existe entre la biotine et la streptavidine, ce qui nécessite cependant des conditions dénaturantes pour l'élution. Afin d'éviter ces désagréments, nous préférons l'utilisation de monomères d'avidine qui permet de diminuer l'affinité de la liaison avec la biotine et d'éluer les protéines par compétition en utilisant un tampon contenant de la biotine.

Cette approche de purification utilisant ces deux étapes a permis à Schiller et al. d'obtenir des résultats particulièrement intéressants pour la purification du récepteur à endotheline ETB exprimé dans la levure *P.pastoris* (Schiller et al., 2001).

### 1. Purification dans des conditions classiques

### 1.1. Récepteur à neuropeptide Y1

Des premiers essais de purification ont été réalisés sur le récepteur à neuropeptide Y1 en utilisant les conditions optimales déterminées pour la solubilisation et les conditions standard ci-après définies pour la purification.

Lors de la première étape de purification, l'échantillon solubilisé à été mis en contact avec une résine d'agarose chélatée avec des ions nickel (HisTrap HP) pendant une nuit à 4°C. L'élution de cette colonne a été réalisée en utilisant un gradient d'imidazole allant de 0 à 500 mM d'Imidazole. Les éluats ont ensuite été déposés sur une colonne d'avidine monomérique (Monomeric Avidin Gel, Pierce) puis élués par compétition avec la biotine. Une analyse par westerns-blot a ensuite été réalisée sur les différents échantillons recueillis à la sortie des colonnes de nickel et d'avidine afin de repérer les fractions contenant le récepteur étudié. Les résultats sont présentés dans la figure 96.

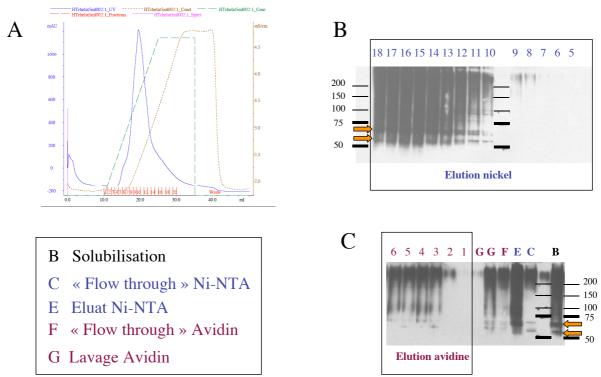


Figure 96: Purification dans les conditions classiques du R79.

Profil de l'élution de la colonne de nickel (A). (B) Immunodétection par western-blot (en utilisant un anticorp M2 anti-FLAG) des différents éluats de la colonne de nickel; Les éluats de la colonne d'avidine sont présentée en C.

La révélation des westerns-blots indique la présence de plusieurs bandes correspondant très probablement à différentes formes du récepteur fusionné à ses étiquettes. En effet, la taille estimée pour le récepteur à neuropeptide Y1 est de 42 kDa. La fusion de ce récepteur aux différentes étiquettes ajoute environ 15 kDa, ce qui correspond à un total de 57 kDa. On peut effectivement visualiser une bande correspondant à cette taille, ainsi qu'une autre bande présente aux alentours des 70kDa. Cette seconde forme du récepteur peut s'expliquer par l'absence de clivage de la séquence signal, tel que cela a déjà été démontré pour certains récepteurs exprimés dans la levure *P.pastoris* (Weiss et al. 1995 ; Weiss et al. 1998 ; Feng et al. 2002).

La séquence signal présente une taille de 7 kDa mais contient 3 sites putatifs de glycosylation ce qui contribue à l'ajout sur le récepteur d'environ 10kDa supplémentaires (total de 67kDa). Les deux bandes principales observées sur les westerns-blots (figure 96B et C) correspondent donc très probablement aux formes clivées et non-clivées du récepteur.

Par ailleurs, l'apparence diffuse des bandes observées pour les RCPG dans le haut des gels SDS peut également être liée à une hétérogénéité des événements de glycosylation comme cela a déjà été décrit (Grisshammer et al., 1995). En effet, la présence de trois sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser (Thr)) dans la région N-terminal du récepteur

NPY1 rend plausible cette explication. Afin de tester cette hypothèse, une étude à été spécialement menée et les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe 4 de ce chapitre.

Enfin, ces différentes bandes de hauts poids moléculaires peuvent également correspondre à des états de multimérisation du récepteur. La présence de tels multimères a en effet déjà été décrite lors d'utilisation de gels réducteurs et dénaturants et est représentative de la nature fortement hydrophobe des récepteurs (Sizmann et al. 1996 ; Grisshammer et al., 1995 ; Ratnala et al., 2004).

Pour ce qui concerne les résultats de la purification proprement dite, présentés sur la figure 96, on constate qu'une faible quantité de récepteur est encore présente dans la fraction correspondant aux protéines qui ne se sont pas fixées sur la colonne de nickel (figure 96C colonne C).

Les résultats de l'élution de la première colonne de nickel utilisant un gradient d'imidazole sont présentés sur la figure 96A et indiquent la formation d'un pic d'élution correspondant à une concentration d'environ 300 mM d'Imidazole. Le résultat du western-blot réalisé sur les éluats de la colonne de nickel (figure 96B) indique que le récepteur n'est élué qu'à partir des 2 derniers tiers du pic ce qui suggère que le début du pic doit probablement correspondre à l'élution de protéines contaminantes.

On détecte à nouveau la présence de quelques récepteurs dans la fraction correspondant aux protéines qui ne se sont pas fixées sur la colonne d'avidine (figure 96C, colonne F) ainsi que lors du lavage de la colonne d'avidine (figure 96C ligne G). L'élution de la colonne d'avidine est réalisée en utilisant 2mM de biotine et entraîne la formation de deux pics d'élution. L'immunodétection correspondant aux fractions récupérées est présentée sur la figure 96C (colonne 1 à 6) et révèle la présence de récepteurs dans les deux pics d'élution.

Afin de déterminer le degré de purification nous avons ensuite réalisé des gels SDS PAGE colorés au nitrate d'argent (figure 97A). Ces gels indiquent la présence de deux bandes en fin de purification qui correspondent aux tailles attendues (cf ci-dessus). La comparaison avec le western blot (figure 97C) nous permet de confirmer que ces bandes correspondent à celles du récepteur.

La concentration protéique de l'éluat avidine a été éstimée à 400µg (par mesure de l'absorbance à 280nm).

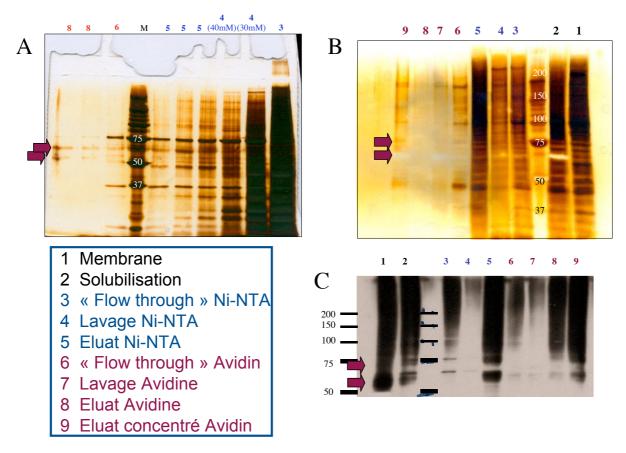


Figure 97 : Révélation sur gel SDS PAGE des différents échantillons de la purification du récepteur NY1R\_HUMAN (R79).

Les figures A et B présentent deux exemples de gels révélés à l'argent et correspondant à des purifications dans des conditions classiques du R79. Une révélation de ces différents échantillons par western-blot (révélé avec un anticorp M2) est présentée en C.

Des analyses qualitatives ont ensuite été réalisées sur l'ensemble de ces échantillons par des mesures de liaison au NPY (figure 98). Les résultats indiquent la présence de récepteur actif tout au long de cette purification.

Les résultats obtenus dans ces expériences de fixation de ligand indiquent la présence de 4 pmol de récepteur actif par mg de protéine dans l'éluat d'avidine. Sachant que pour un récepteur de cette taille-ci (57 kDa), un récepteur pur et 100% actif représente environ 17 000 pmol/mg, notre rendement de purification de récepteur actif semble très faible.

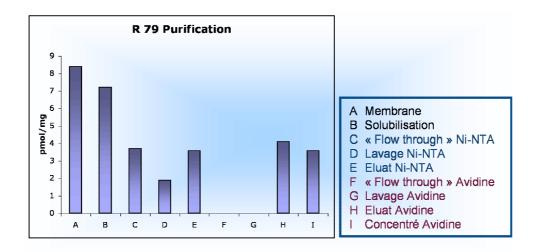


Figure 98 : Mesure de liaison au 3H-NPY des différents échantillons de la purification du R79.

L'expérience est réalisée en présence de 8nM de radioligand (conditions non saturantes)

Les deux principales raisons qui peuvent expliquer ce relatif échec sont d'une part expérimentales (les techniques de séparation ligands fixés / ligands libres ne sont probablement pas les mieux adaptées), mais également et plus probablement liées à une dénaturation même partielle de la structure des récepteurs durant la purification. Par conséquent des optimisations consistant à ajouter du ligand lors de la solubilisation et de la purification afin de tenter de stabiliser le récepteur sous une forme active ont été réalisées et sont présentées dans le paragraphe 2.2.

### 1.2. Récepteur à serotonine 1D

La taille attendue pour le récepteur à sérotonine est de 41 kDa. Le récepteur fusionné aux étiquettes utilisées a une taille d'environ 56 kDa. Si la séquence signal du récepteur n'est pas clivée la taille du RCPG est attendue aux environs de 66 kDa. Ce récepteur présente également trois sites potentiels de N-Glycosylation situés dans la région N-terminal du récepteur. Ces glycosylations peuvent également augmenter la taille du récepteur.

Ce récepteur a été purifié en suivant une procédure identique à celle décrite précédemment et les différents échantillons obtenus ont été analysés dans un premier temps par Western-blot (Figure 99). Sur ces profils d'immunodétection, on observe une bande principale située aux alentours de 55kDa et une seconde bande d'une taille proche de 65kDa. Ces tailles peuvent correspondre aux formes clivées et non-clivées du récepteur.

L'élution de la colonne de nickel a également été réalisé grâce à un gradient d'imidazole. De manière identique au récepteur à neuropeptide Y1, un pic de DO à 280 nm apparaît aux environs des 300 mM d'imidazole (figure 99A). L'analyse par immunodétection

des éluats (figure 99B) indique la présence du récepteur dans ce pic à partir de la fraction n°10. Par ailleurs, comme dans l'exemple précédent, tous les récepteurs ne se sont pas fixés sur la colonne de nickel (figure 99B, piste C). L'élution de la colonne d'avidine forme un seul pic de DO à 280nm correspondant à l'élution du récepteur comme le montre le Westernblot.

Afin d'évaluer le pourcentage de purification des gels d'acrylamide, colorés à l'argent et au bleu de coomassie ont été réalisés. On observe sur ces deux gels en fin de purification la présence majoritaire d'une bande correspondant à la taille attendue. Cette bande a également été révélée sur le western-blot qui a été réalisé en parallèle.

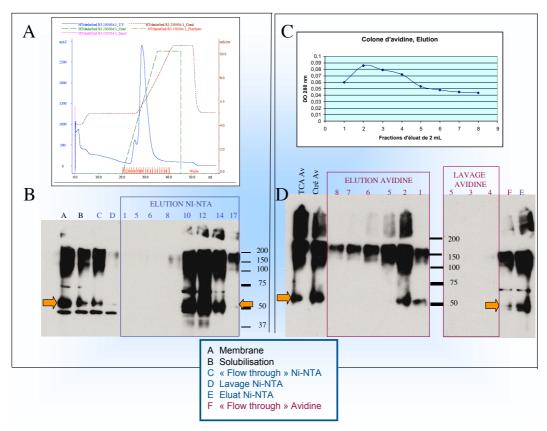


Figure 99 Purification dans les conditions classiques du récepteur à sérotonine 1D

La figure A correspond à la représentation graphique de l'élution de la collone de nickel. La figure C correspond à la mesure de la DO 280 des éluats de la colonne d'Avidine. Les figures B et D correspondent aux western-blot (avec un anticorps M2 anti-FLAG) réalisés sur les différents éluats et échantillons de la purification.

Afin d'évaluer le pourcentage de purification, des gels d'acrylamide colorés au nitrate d'argent et au bleu de coomassie ont été réalisés (Figure 100). En fin de purification, on observe sur ces deux gels la présence majoritaire d'une bande correspondant à la taille attendue. Cette bande a également été révélée sur le western-blot qui a été réalisé en parallèle.

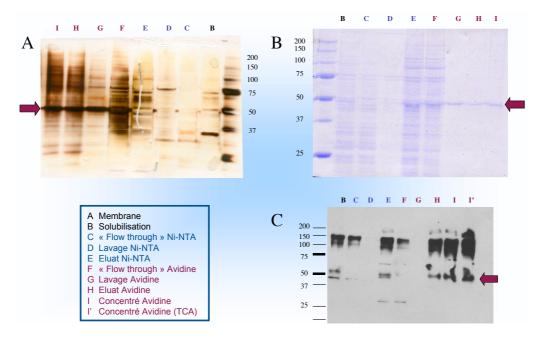


Figure 100 : Migration sur Gel SDS PAGE des différents échantillons de la purification.

Le gel A à été coloré à l'argent et le gel B au bleu de Coomassie. Un western blot (C) à été réalisé sur ces mêmes échantillons (Anicorp M2)

L'analyse qualitative a été évaluée en déterminant à chacune des étapes les récepteurs capables de lier le 3H-GR125743 (figure 101A). Les résultats indiquent une conservation de l'activité des récepteurs tout au long de la purification.

Afin d'avoir une idée plus précise de la quantitée globale de récepteur une courbe de saturation a été réalisée sur le récepteur purifié (figure 101B). Le Bmax (« maximal Binding » : quantité totale de sites présents) atteint est de 5 pmol/mg avec une affinité (Kd) de 1,9 nM. Comme précédemment, ces valeurs sont loin de correspondre à celles que l'on peut attendre d'un récepteur purifié majoritairement actif et nous avons donc opté pour une optimisation des conditions de solubilisation et de purification en présence de ligand (paragraphe 2.2 suivant).

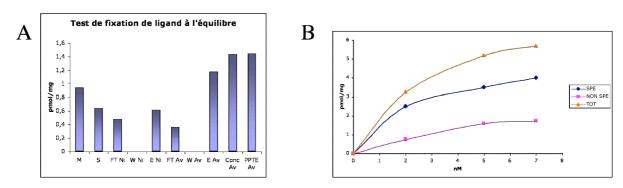


Figure 101: Mesure de la liaison au 3H-GR125743.

Les différents échantillons ont été téstés en présence de 11nM de radioligand (A). Une courbe de saturation a été réalisée su l'éluat de l'avidine (B).

## 2. Purification en stabilisant par l'intermédiaire d'ajout de ligand.

#### 2.1. Récepteur à neuropeptide Y1

Une méthode de purification identique à celle précédemment décrite à été utilisée. Cependant un ligand antagoniste non peptidique appelé BIBP 3226 à été ajouté lors de la solubilisation afin de stabiliser le récepteur. 355 mg de préparations membranaires ont été utilisées pour cette purification.

Les résultats de la purification sont présentés sur la figure 102 et présentent un profil identique aux résultats obtenu lors de la purification en condition classique. Un seul pic est obtenu lors de l'élution de la colonne de nickel (figure102A). Le récepteur est élué dans ce pic (figure 102B). En revanche, deux pics sont observés lors de l'élution de la colonne d'avidine (figure 102C) et contiennent tous deux le récepteur à neuropeptide Y1 élué (figure 102D).

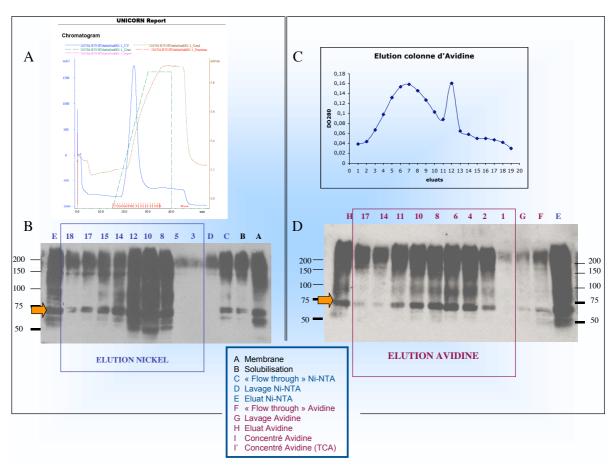


Figure 102 : Purification du récepteur n°79.

Les résultats de la colonne de nickel sont présentés en A (profil d'élution de la colonne de nickel) et B (western-blot des éluats) . Les résultats de la colonne d'Avidine sont présentés en C (mesure de la DO à 280 des éluats) et D (Wester-blot de éluats).

Sur les gels colorés à l'argent et au bleu de coomassie, deux bandes sont à nouveau observables en fin de purification (figure 103A et B pistes G, H et I) et correspondent aux tailles attendues des formes clivées et non clivées du récepteur à neuropeptide Y1.

Le résultat des tests de liaison au NPY (figure103C) indiquent une conservation de l'activité tout au long de la purification. Les valeurs de fonctionnalité sont plus importantes dans cette expérience que dans celle utilisant les conditions classiques. À l'inverse, on constate des valeurs plus faibles pour l'échantillon correspondant au récepteur solubilisé. Sachant que dans cette expérience la solubilisation a été réalisée en présence de ligand afin de stabiliser le récepteur dans une configuration liée, ce même ligand interfère très probablement en diminuant par compétition la fixation du radioligand. En fin de purification, la fraction éluée de la colonne d'avidine donne en revanche des résultats plus intéressants que dans les conditions classiques puisque dans ce cas c'est une valeur de 10 pmol/mg qui est mesurée. Même si cette piste paraît plus intéressante, la quantité de récepteur actif qu'il est possible d'obtenir reste encore très largement en de ça de qui est espérée, sans doute en raison du fait que le ligand a pu se décrocher du récepteur durant les étapes de purification et de lavage.

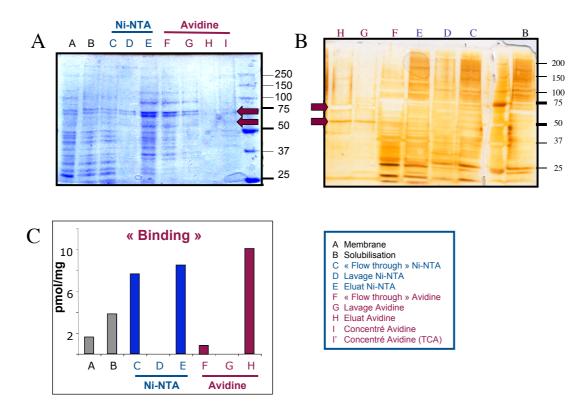


Figure 103 : Migration sur Gel SDS PAGE des échantillons de la purification (A et B) et mesure de la liaison au 3H-NPY (C).

Un gel coloré au bleu de coomassie est présenté en A et un gel coloré à l'argent est présenté en B. Le test de liaison au 3H NPY (C) est réalisé en présence de 7nM de radioligand.

#### 2.2. Récepteur à sérotonine 1D

Lors de cette purification 300nM du ligand antagoniste GR127935 a été ajouté lors de la solubilisation ainsi que tout au long de la purification.

Une première étape de purification sur colonne de nickel à été réalisée comme décrit précédemment. Elle a été suivie par étape de purification sur une colonne d'avidine cette fois-ci réalisée en utilisant une méthode dite en « batch ». L'échantillon a en effet été incubé sous agitation pendant une nuit à 4°C en présence de la résine d'avidine monomérique afin d'augmenter les probabilités d'intéraction biotine/avidine et ainsi d'améliorer les rendements de purification en limitant les pertes de récepteurs lors du chargement des colonnes.

Les résultats obtenus pour cette purification sont présentés dans la figure 104. Malgré l'approche de type « batch », on constate sur la figure 104D (piste F) qu'un grand nombre de récepteurs ne s'est malgré tout pas fixé sur la colonne d'avidine et également que de nombreux récepteurs se retrouvent dans la fraction correspondant au lavage de la colonne d'avidine (figure 104D piste G). Cette méthode en « batch » ne s'est donc pas révélée aussi intéressante que prévu.

Les expériences de liaison au 3H-GR125743 presentées sur la figure 105 indiquent de très faibles valeurs pour l'éluat d'avidine ne dépassant pas les 0,3 pmol/mg en présence de 5 nM de radioligand. L'utilisation de 12nM de radioligand nous à peine permis d'atteindre les 0,4 pmol/mg (résultat non présenté).

Ces faibles valeurs s'expliquent très probablement par la présence de ligand saturant les sites de liaison du récepteur et empêchant toute analyse par « binding » classique. Par conséquent, la quantité de récepteur fonctionnel présent en fin de purification est très certainement sous-estimée et n'est pas utilisable pour évaluer la qualité des échantillons purifiés.

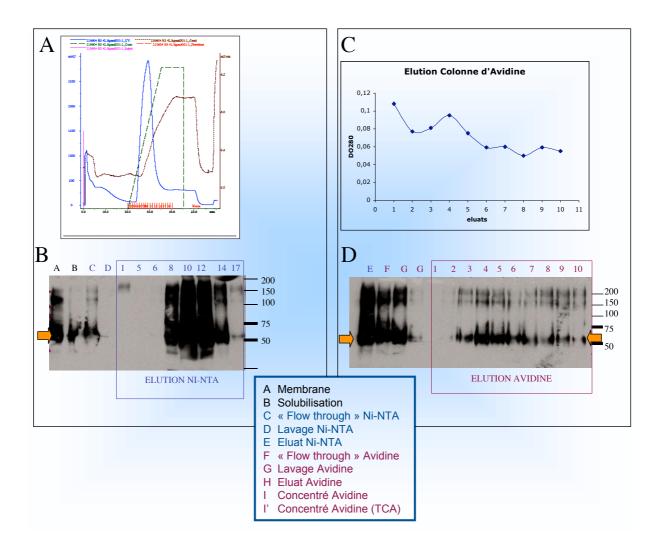


Figure 104 : Purification du récepteur n°3 en présence de 300nM de GR127935.

Les figures A (Profil d'élution) et B (western-blot sur les éluats) représentent les résultats obtenus sur la colonne de nickel. Les résultats C (DO à 280nm des éluats d'avidine) et D (western-blot des éluats) représentent les résultats obtenus sur la colonne d'avidine.

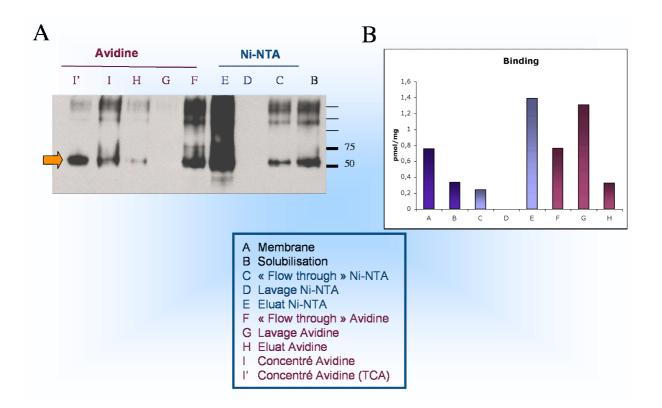


Figure 105 : Analyse des échantillons de la purification.

La présence du récepteur lors de la purification a été analysée par western-blot (A). Un test de liaison au 3H-GR125743 a été réalisé sur l'ensemble des échantillons en utilisant 5nM de radioligand (B).

Comme on peut le voir, les méthodes habituelles d'évaluation de la quantité de récepteurs actifs montrent leurs limites avec les techniques de purification utilisées. Cependant, si l'on s'en tient aux résultats révélés après coloration des gels SDS PAGE, ces procédures de purification apparaissent plutôt efficaces même si l'on peut détecter la présence de quelques contaminants.

Nous pensons donc que ces procédures restent tout à fait valables mais qu'il nous faut mettre en oeuvre d'autres approches ou techniques d'analyse pour pouvoir évaluer la qualité des échantillons purifiés. Celles-ci pourraient notamment correspondre à des expériences de reconstitution des récepteurs dans des vésicules lipidiques permettant de tester les paramètres de binding dans des conditions plus favorables. Il serait également intéressant de pouvoir tester les échantillons purifiés dans des techniques alternatives de fixation de ligand telle que la méthode dite de SPA (Scintillation Proximity Assay) ou bien celles utilisant la technologie Biacore. D'autres techniques d'analyse existent donc et peuvent être exploitées, mais toutes nécessitent des quantités de matériels bien supérieures à ce que nous produisons habituellement.

Afin d'obtenir de plus grande quantité de protéines purifiées, et en exploitant au mieux les possibilités offertes par la levure *Pichia pastoris*, nous avons réalisé des essais préliminaires de culture en fermenteurs avec le récepteur à serotonine 1D comme GPCR modèle.

#### IV. Fermentation

En permettant de contrôler précisément plusieurs paramètres majeurs d'une culture tels que la température, l'agitation, le pH, la concentration d'oxygène dissout et bien d'autres facteurs, les protocoles de fermentation concernant la levure *P. pastoris* sont largement décrits comme apportant une nette amélioration des résultats obtenus par culture en erlens, surtout en terme de biomasse.

Les premiers essais de fermentation que nous avons menés ont été réalisés dans un fermenteur de 3 litres en s'inspirant du protocole de fermentation à densité cellulaire modérée décrit par Higgins et collaborateurs (Higgins et al. 1998). Ce type de fermentation se réalise sans apport d'air enrichi en oxygène pendant le proccès, ce qui permet d'utiliser une configuration de fermenteur plus « basique ». En revanche, cette restriction limite la densité cellulaire qu'il est possible d'atteindre, ce qui *a priori* diminue également les niveaux de production de la protéine d'intérêt.

Dans un premier temps, le fermenteur est inoculé par des cellules en phase exponentielle de croissance qui sont alors cultivée en « batch » dans un milieu défini contenant du glycérol comme seule source de carbone. Le but recherché dans cette première phase est de permettre aux cellules de se diviser afin d'atteindre la biomasse recherchée. Cette culture se déroule donc en condition d'oxygène limitant jusqu'à ce que le glycérol présent dans le milieu soit complètement consommé: ce moment critique est visualisé par une augmentation de la quantité d'oxygène dissout présent dans le milieu puisque c'est désormais la source de carbone (le glycérol) qui devient le facteur limitant. L'étape suivante consiste alors à alimenter la culture en glycérol de façon très contrôlée afin d'une part de continuer à augmenter la densité cellulaire et d'autre part de débuter la dérépression du promoteur AOX1 pour faciliter la transition avec la phase d'alimentation en méthanol (Brierley et al. 1990). Durant cette phase, le glycérol est maintenu en concentration limitante dans le milieu.

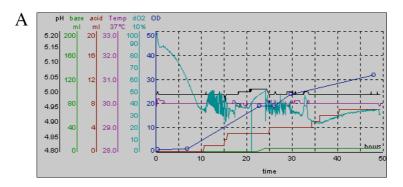
Au bout de 2 à 3 heures de culture dans ces conditions, on arrête l'alimentation en glycérol ce qui se traduit par un épuisement de la source de carbone dans le milieu (observable par la formation d'un pic de dO2). L'alimentation en méthanol permettant l'induction de l'expression peut alors démarrer de façon très progressive afin d'éviter toute

accumulation du méthanol dans le milieu (toxique pour les cellules) et de permettre à la levure de s'adapter progressivement.

Une telle fermentation a donc été réalisée dans les conditions décrites précédemment à une température de 30 °C et avec une durée d'expression de 18H. Le profil obtenu pour les différents paramètres de fermentation est présenté sur la figure 106A.

L'analyse par Western-blot des échantillons récoltés à différentes étapes (données non présentées) a permis de montrer que l'expression du récepteur à sérotonine démarrait dès la phase d'alimentation en glycérol durant laquelle le promoteur AOX1 est déréprimé. La réalisation de tests de fixation de ligand à l'équilibre sur ces mêmes échantillons, nous a permis d'obtenir en fin de fermentation des valeurs comparables à celles obtenus pour les conditions optimisées développées en erlens. Sachant qu'en fin de fermentation, la densité optique à 600nm atteinte est supérieure à 30, ce qui est environ 10 fois plus élevé que ce que l'on obtient habituellement en erlens, cette fermentation en condition classique nous a donné des résultats déjà très prometteurs.

Afin d'améliorer encore davantage ces rendements et de nous rapprocher des conditions optimales observées en erlens pour ce récepteur (diminution de la température d'induction et ajout d'additif) les conditions de fermentation du récepteur à sérotonine peuvent être encore largement modifiées.



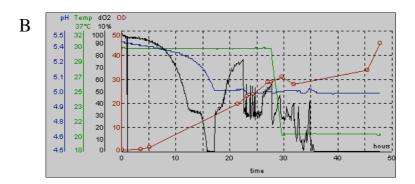


Figure 106 : Fermentation du récepteur à serotonine 1D.

A : Fermentation réalisée dans des conditions standard (induction à 30°C)

B : Fermentation réalisée avec une température d'induction à 20°C.

# V. Glycosylation et modifications post-traductionnelles

Pour les deux récepteurs NY1 et 5H1D analysés lors des procédures de purification, nous avions mis en évidence des bandes supplémentaires de tailles supérieures à celles attendues sur les gels et westerns-blots réalisés. Considérant la présence de 3 sites de N-glycosylation (N-X-S/T) présents en région N-terminal sur ces deux récepteurs, nous avons tenté de déterminer si ces bandes observées pouvaient être dues à des phénomènes d'hyperglycosylation des RCPGs ou à un défaut de clivage de la séquence signal.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une hyperglycosylation de la protéine, nous avons utilisé une déglycosylase, la PNGase F, qui clive les liaisons glycosamines situées entre les oligosaccharides et les résidus asparagine. L'effet de ce traitement sur des préparations membranaires fait apparaître pour les deux récepteurs testés, deux bandes ayant un poids moléculaire inférieur à la bande principale observée sur des membranes non traitées (figure 107B et C). L'une de ces bandes correspond à la taille attendue pour ces récepteurs fusionnnés aux étiquettes et qui correspond à 57 kDa pour le récepteur à neuropeptide Y1 et 56 kDa pour le récepteur à sérotonine 1D. La seconde bande ayant un poids moléculaire supérieur de 10 kDa à la taille attendue, elle est supposée correspondre à la forme du récepteur pour lequel la séquence signal n'a pas été clivée.

Afin de vérifier cette hypothèse, et dans le but de déterminer le degré de clivage de la séquence signal par l'endopeptidase Kex2 des récepteurs exprimés dans la levure, nous avons utilisé les différentes spécificités des anticorps monoclonaux M1 et M2 dirigés contre l'étiquette FLAG. Seuls les récepteurs ayant une séquence signal correctement clivée peuvent être reconnus par l'anticorps M1 qui se fixe d'une manière calcium-dépendante sur l'extrêmité N-terminal libre de l'épitope FLAG (Hopp et al. 1988). L'anticorps M2 quant à lui ne fait aucune distinction entre les deux formes du récepteur.

L'analyse des imunodétections (figure 107) nous a permis de montrer que seul l'anticorps M2 est capable de révéler les deux bandes des récepteurs tandis que l'anticorps M1 ne révèle que la bande inférieure.

Chapitre 8 : Solubilisation et purification

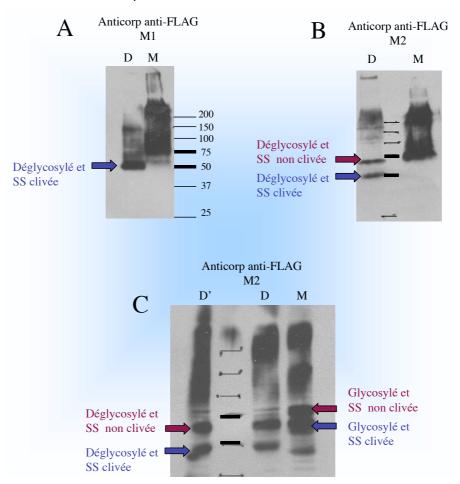


Figure 107 : Analyse de la glycosylation et de la présence de la séquence signal sur les récepteurs à sérotonine (C) et à neuropeptide Y1 (A et B).

 $\mathsf{D}$  : déglycosylation (PNGase F) dans des conditions non dénaturantes.  $\mathsf{D}'$  : déglycosylation (PNGase F) dans des conditions dénaturantes.

M: Membranes

L'ensemble de ces résultats confirme pour ces deux récepteurs la présence de formes avec ou sans séquence signal et présentant ou non des motifs de glycosylation. Comme cela à été démontré pour certains récepteurs exprimés dans *P.pastoris* (Grunewald et al. 2004 ; Weiss et al.,1998; Bretthauer et al. 2003), ces motifs de glycosylation pourraient être riches en résidus mannose.

Les problèmes parfois créés par des phénomènes d'hyperglycosylation ont plus fréquemment été répertoriés chez *S. cerevisiae* (Cregg et al. 1993) que chez *P. pastoris*. Dans le cas de RCPG exprimés dans la levure *P. pastoris* il a cependant été décrit que la glycosylation pouvait empêcher un clivage correct par l'endopeptidase Kex2 lorsque le site de glycosylation était physiquement trop proche de la région N-terminal du récepteur et donc de son site de clivage (Weiss et al. 1998 ; Grunewald et al. 2004).

Par ailleurs, l'absence de clivage peut également s'expliquer par un encombrement de la machinerie responsable des modifications post-traductionnelles lors de la surexpression d'une protéine hétérologue. En effet, une diminution de la température

d'induction ayant pour conséquence un ralentissement de la machinerie intracellulaire, peut permettre d'augmenter jusqu'à plus de 50% la quantité de récepteur ayant une séquence signal clivée (Grunewald et al. 2004).

### **VI. Conclusion**

Le criblage des détergents et l'optimisation de différents paramètres nous ont permis de sélectionner pour le récepteur à serotonine1D, le récepteur à histamine H2 et le récepteur à neuropeptide Y1 des conditions optimales de solubilisation trés proches. Ces conditions utilisent le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate), un détergent zwiterionique dérivé des sels biliaires (Hjelmeland. 1983) qui a fréquemment été utilisé dans la biochimie membranaire (Hjelmeland 1980) ainsi que pour la solubilisation de protéines membranaires (Banerjee et al.,1995; Ofri et al. 1992 ; Chattopadhyay et al. 2004). Dans les conditions que nous avons testées, c'est le détergent qui nous a permis de solubiliser ces trois récepteurs tout en conservant au mieux leurs capacités de fixer un ligand.

D'autre part, l'augmentation de la force ionique est généralement favorable à la solubilisation. Une concentration en NaCl de 100 ou 250 mM semble être suffisante pour les récepteurs testés. On notera cependant que la concentration micellaire critique du CHAPS est dépendante de la concentration en NaCl de la solution (Chattopadhyay et al. 1996). Finalement, dans les conditions sélectionnées, l'utilisation de 50% de glycérol a également montré un effet bénéfique, en permettant vraisemblablement de stabiliser l'activité des récepteurs. On notera cependant que cette concentration élevée en glycérol n'est probablement pas favorable aux études cristallographiques et que des solutions intermédiaires devront sans doute être envisagées.

Nous avons par la suite appliqué une procédure de purification pour deux récepteurs qui nous a permis d'obtenir des protéines purifiées mais dont une faible proportion semble active d'après les tests réalisés. La réalisation d'une solubilisation en présence de ligand semble améliorer la stabilité des deux récepteurs et permet d'obtenir de meilleurs rendements de purification. En revanche, les tests habituellement mis en oeuvre pour déterminer la fonctionnalité des protéines purifiées se révèlent peu appropriés pour ce type d'approche et ne permettent pas de rendre compte du réel rendement de purification en termes de récepteurs actifs. Des études complémentaires mettant en oeuvre des techniques alternatives seraient donc nécessaires.

Chapitre 8 : Solubilisation et purification

L'analyse des modifications post-traductionnelles a démontré une glycosylation de ces récepteurs ainsi que la présence de deux formes de récepteur présentant ou non un clivage de la séquence signal. Pour obtenir une meilleure homogénéité des protéines hétérologues exprimées une déglycosylation ainsi qu'un clivage de la séquence signal par la protéase Kex2 pourraient être réalisés *in vitro*. Cependant, une alternative efficace et préférable consisterait à utiliser une protéase TEV *in vitro* qui permettrait par la même occasion de retirer les étiquettes fusionnées aux récepteurs avant les essais de cristallisation.

Afin d'obtenir des quantités suffisantes de récepteurs purifiés pouvant convenir aux contraintes liées aux études cristallographiques, l'étape de culture à grande échelle est nécessaire. Les essais de fermentations réalisées sur le récepteur à sérotonine 1D ont donné de premiers résultats prometteurs, mais des optimisations restent encore à réaliser.

#### VII. Matériels et méthodes

#### 1. Solubilisation

Pour le criblage des différents détergents (voir tableau1) les préparations membranaires sont incubées à une concentration de 1mg/ml dans un tampon de solubilisation (10% glycérol, 100mM NaCl, 20mM Hepes pH 7.4, 1mM de PMSF) dans lequel les différents détergents testés sont ajoutés aux concentrations indiquées dans le tableau 1. La solubilisation est réalisée sous agitation à 4°C pendant 2h00. Le surnageant est ensuite récupéré après une ultracentrifugation de 45 minutes à 4°C et à 100 000g. Les protéines solubilisées présentes dans le surnageant sont quantifiées par BCA (Pierce) et analysées par des tests de fixation de ligand à l'équilibre et par western-blot.

Les optimisations sont ensuite réalisées en faisant varier dans le tampon de solubilisation les concentrations en NaCl et en Glycérol.

#### 2. Test de fixation de ligand à l'équilibre « Binding »

Le criblage des détergents par des tests de binding a été réalisé en utilisant un format 96 puits et l'appareil de filtration TopCount (Packard Bioscience). Les conditions de binding utilisées pour le criblage des détergents ainsi que pour les échantillons issus de la purification sont identiques à celles qui sont décrites dans le chapitre 7.

#### 3. Purification

La solubilisation est réalisée dans les conditions optimisées. après ultracentrifugation les protéines solubilisées sont chargées en une seule fois ou pendant une nuit à 4°C sur une colonne IMAC (métal immobilisé sur une matrice de sépharose) de type Nickel (HisTrap 5ml, Amersham). Les protéines non fixées sur la colonne correspondent à la fraction non retenue ou « flow through ». La colonne est ensuite lavée en utilisant le tampon de solubilisation. L'élution est réalisée en utilisant un tampon de solubilisation contenant 0,5M d'Imidazole. Un gradient d'imidazole allant de 0 à 500mM est ensuite appliqué sur la colonne.

Les éluats de la colonne de nickel sont rassemblés avant d'être déposés sur une résine d'avidine monomérique (Pierce). Aprés un lavage de la colonne, la protéine est éluée en utilisant un tampon de solubilisation contenant 2mM de biotine. Les fractions sont récoltées et l'élution des protéines est suivit par la mesure de la DO à 280nm.

Les échantillons récupérés en fin de purification sont concentrés en utilisant des concentrateurs ayant un seuil de coupure de 10kDa.

L'éluat d'avidine peut également être concentré par précipitation au trichloroacétate (TCA). Pour cela, l'échantillon est incubé en présence de 10% de TCA pendant 30 minutes à 4°C. Une centrifugation basse vitesse (13000 rpm, 15minute, 4°C) permet de récupérer les protéines précipitées. Le culot est ensuite rincé avec de l'acétone froid et séché avant d'être déposé sur un gel SDS PAGE 10%.

#### 4. Coloration à l'argent et au bleu de coomassie

La coloration à l'argent est réalisée en fixant le gel une heure dans une solution de fixation (50% éthanol, 10% acide acétique). Trois lavages de 20 minutes sont ensuite réalisés avec 30% d'éthanol. Le gel est ensuite coloré pendant 20 minutes avec une solution de coloration (0,2% nitrate d'argent, 0,02% de formaldéhyde). Le gel est ensuite rincé deux fois 20 secondes avec de l'eau distillée. Une solution de développement (6% carbonate de sodium, 0,02mM thiosulfate de sodium, 0,02% formaldéhyde) est ensuite ajoutée. La coloration est arrêtée en utilisant une solution contenant 5% d'acide acétique.

La coloration au bleu de coomassie est réalisée en colorant le gel pendant 20 minutes dans une solution contenant 0,1% de bleu R250, 50% de méthanol et 10% d'acide acétique.

Puis après un rinçage avec de l'eau distillée, le gel est décoloré avec une solution de décoloration (25% méthanol, 8% d'acide acétique).

#### 5. Fermentation

Une préculture est préparée préalablement afin d'inoculer le fermenteur. Cette préculture réalisée dans 50ml de MGY (1,34% YNB, 1% Glycérol, 4x10-5% de biotine, 100mM tampon phosphate pH6) est incubée à 30°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité optique à 600nm située entre 2 et 5 (pour la réalisation d'un litre de culture en fermenteur). Cette préculture est ensuite ajoutée stérilement dans le fermenteur contenant un milieu FM22 (contenant par litre de milieu : 42,9g KH2PO4, 5g (NH4)2SO4, 1g CaSO4.2H2O, 14,3g K2SO4, 11,7g MgSO4,.7H2O, 10g glycerol) supplémenté avec 1ml (pour 1L de FM22) de PMT4 (contenant par litre de milieu : 2g CuSO4.5H2O, 0,08gNal, 3g MnSO4.H2O, 0,2g Na2MoO4.2H2O, 0,02g H3BO3, 0,5g CaSo4.2H2O, 0,5g CoCl2, 7g ZnCl2, 22g FeSO4.7H2O, 0,2g biotine, 1ml H2SO4 conc.). Le pH du fermenteur est ensuite ajusté à 5, la température à 30°C et l'agitation à 450rpm. Le pH est régulé par une solution d'ammoniaque (NH4OH 30%). L'excès de production de mousse dans le fermenteur est régulé par l'ajout d'une solution contenant 5% d'anti mousse (Antifoam A Emulsion de Sigma).

La fermentation débute par une phase glycérol qui dure entre 20 et 24h. Lorsque le glycérol est entièrement épuisé dans le milieu, on passe à une étape d'alimentation en glycérol en utilisant une solution contenant 50% de glycérol et complétée avec du milieu FM22 (ne contenant pas de glycérol).

À la suite de cette étape une étape d'alimentation en méthanol est lancée pendant 24H. Pour cela on utilise une solution de méthanol 100% qui est supplémentée avec 4ml/L de FM22.

#### 6. Déglycosylation

La déglycosylation enzymatique, utilisant la N-glycopeptidase F (PNGase F; New England Biolabs) dans des conditions non-dénaturantes, est réalisée pendant 30 minutes à 37°C en utilisant 20000 unités/mg de membranes.

La déglycosylation dans des conditions dénaturantes comprend une étape préalable de dénaturation à 50°C pendant 10 minutes. La déglycosylation est ensuite réalisée en présence de NP40 conformément aux instructions du distributeur.

# Chapitre 9 : Conclusion et perspectives

La détermination de la structure des RCPG est un objectif difficile à atteindre. Les deux principales techniques permettant la résolution de structures tridimensionnelles (NMR et cristallographie aux rayons X) nécessitent de grandes quantités de protéines pures (milligrammes) et homogènes. En raison des très faibles niveaux d'expression des RCPG dans leurs cellules et tissus d'origine, la surexpression hétérologue de ces protéines est par conséquent une étape incontournable et il est essentiel pour cela de disposer de stratégies et d'outils d'expression efficaces.

Cependant on observe généralement de plus faibles rendements d'expression des protéines membranaires et des RCPG en particuliers dans les systémes d'expression hétérologue, par rapport aux protéines solubles. Cela peut s'expliquer par le mécanisme complexe nécessaire au repliement des protéines membranaires, par des modifications post-traductionnelles sophistiquées ainsi que par la présence d'un environnement lipidique souvent peu approprié. Dans ce cas précis, la présence de cholesterol s'est par exemple révélée comme étant importante pour l'activité de nombreux récepteurs tels que les récepteurs à rhodopsine (Albert et al. 1996), à acétylcholine (Criado et al., 1982), à oxytocine (Gimpl et al., 1995) et ß 2 adrenergique (Kirilovsky et al., 1983). Or dans les levures comme *Pichia pastoris* par exemple, le stérol majoritaire est l'ergostérol qui n'est pas toujours capable de compenser le besoin en cholestérol. C'est ainsi qu'on a pu observé que la liaison de ligand sur le récepteur opioïde de type mu a été amélioré dans des membranes de levures lors du remplacement de l'ergosterol par du cholesterol (Lagane et al. 2000).

Au cours de cette étude comprenant l'analyse d'un grand nombre de cibles, les développements méthodologiques se sont révélés comme étant essentiels dans de nombreux domaines tel que la biologie moléculaire, l'expression, la solubilisation et la purification.

Ainsi, la première partie de ce travail consistait à l'adaptation et au développement de méthodes permettant une généralisation des protocoles pour l'ensemble des cibles testées et de convenir à l'approche haut débit du projet. Des approches de collecte et de clonage des ADN des RCPG recherchés, aux protocoles de transformation et de criblage des clones levures recombinant, nous avons pu développer des procédures efficaces, fiables et reproductibles permettant de répondre aux contraintes imposées. De la même manière, des approches rigoureuses et structurées ont permis de proposer des méthodes globales permettant non seulement de sélectionner les clones d'expression les plus intéressants de manière efficace et rapide et d'établir une classification des récepteurs en fonction des niveaux d'expression observés.

Par la suite, nous avons exploré de façon extensive les différentes pistes permettant d'optimiser la quantité de récepteurs actifs exprimés afin d'augmenter le nombre de candidats susceptibles de pouvoir être inclus dans les études ultérieures de solubilisation et de purification. Nous avons ainsi identifié plusieurs paramètres expérimentaux présentant un impact important sur les niveaux d'expression de récepteurs fonctionnels et validé une approche générique sur un panel de 20 RCPG permettant d'augmenter de 2 à 4 fois les résultats obtenus dans des conditions standard. Une étude plus approfondie des conditions d'expression réalisée sur trois récepteurs à permis d'affiner encore davantage ces améliorations et d'augmenter jusqu'à 60 fois la quantité de récepteurs fonctionnels.

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes concentrés sur les études de solubilisation et de purification des meilleurs candidats. Nous avons dans un premier temps criblé différentes conditions de solubilisation afin de pouvoir sélectionner celles permettant d'extraire les récepteurs des membranes de façon efficace tout en maintenant leur capacité à fixer un ligand spécifique.

Des études de purification ont par la suite été réalisées sur deux récepteurs en utilisant deux étapes de purification par chromatographie d'affinité. La comparaison des résultats obtenus sur gel SDS-PAGE et par quantification de la quantité de récepteur fonctionnel semble indiquer que seule une faible proportion de récepteur purifié a conservé son activité. Des essais similaires en présence de ligand destiné à stabiliser les récepteurs durant la procédure de purification semblent indiquer une amélioration des rendements de purification que la quantité de récepteurs actifs reste difficilement quantifiable par les techniques utilisées. D'autres méthodes d'analyses pourraient permettre de préciser ces données mais nécessitent cependant des quantités de matériel plus conséquentes que celles produites par les techniques de culture habituelles.

Nous avons donc initié des études préliminaires de culture en fermenteur destinées à jeter les bases de la production de masse des récepteurs. Ces expériences se sont révélées très encourageantes mais un important travail d'optimisation reste encore à réaliser pour atteindre les objectifs fixés.

Chapitre 9: Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats réunis dans le cadre du projet MePNet (prévu et financé initialement pour une durée de trois ans) se sont montrés particulièrement encourageants, validés par une dizaine d'articles scientifiques qui sont ou seront publiés. Ces résultats ont convaincu les différents partenaires impliqués dans ce réseau de prolonger l'étude pour une durée de trois ans supplémentaires. Cette seconde partie du projet s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés en mettant l'accent sur le développement des procédures de production à grande échelle, mais surtout sur l'optimisation des conditions les plus favorables à la stabilisation des récepteurs durant les étapes de solubilisation, de purification et de cristallisation. A l'heure actuelle, des essais de cristallisation sont déjà en cours dans le laboratoire du Professeur So Iwata à Londres pour certains RCPG dont le récepteur à sérotonine 1D.

# **Bibliographie**

- ABBRACCHIO, M. P. & BURNSTOCK, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol Ther 64, 445-75.
- ABDULAEV, N. G., POPP, M. P., SMITH, W. C. & RIDGE, K. D. (1997). Functional expression of bovine opsin in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Protein Expr Purif 10, 61-9.
- ACHER, R., CHAUVET, J. & CHAUVET, M. T. (1995). Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. Adv Exp Med Biol 395, 615-27.
- ADHAM, N., KAO, H. T., SCHECTER, L. E., BARD, J., OLSEN, M., URQUHART, D., DURKIN, M., HARTIG, P. R., WEINSHANK, R. L. & BRANCHEK, T. A. (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT1F): a fifth 5-HT1 receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 408-12.
- AHLQUIST, R. P. (1948). a study of the adrenotopic receptors. Am. J. Physiol 153, 586-600.
- ALBERT, A. D., BOESZE-BATTAGLIA, K., PAW, Z., WATTS, A. & EPAND, R. M. (1996). Effect of cholesterol on rhodopsin stability in disk membranes. Biochim Biophys Acta 1297, 77-82.
- AMLAIKY, N., RAMBOZ, S., BOSCHERT, U., PLASSAT, J. L. & HEN, R. (1992). Isolation of a mouse "5HT1E-like" serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus. J Biol Chem 267, 19761-4.
- ANDERSEN, B. & STEVENS, R. C. (1998). The human D1A dopamine receptor: heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae and purification of the functional receptor. Protein Expr Purif 13, 111-9.
- ARKINSTALL, S., EDGERTON, M., PAYTON, M. & MAUNDRELL, K. (1995). Co-expression of the neurokinin NK2 receptor and G-protein components in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. FEBS Lett 375, 183-7.
- ASH, A. S. & SCHILD, H. O. (1966). Receptors mediating some actions of histamine. Br J Pharmacol 27, 427-39.
- AUDINOT, V., BEAUVERGER, P., LAHAYE, C., SUPLY, T., RODRIGUEZ, M., OUVRY, C., LAMAMY, V., IMBERT, J., RIQUE, H., NAHON, J. L., GALIZZI, J. P., CANET, E., LEVENS, N., FAUCHERE, J. L. & BOUTIN, J. A. (2001). Structure-activity relationship studies of melanin-concentrating hormone (MCH)-related peptide ligands at SLC-1, the human MCH receptor. J Biol Chem 276, 13554-62.
- BACH, M., SANDER, P., HAASE, W. & REILANDER, H. (1996). Pharmacological and biochemical characterization of the mouse 5HT5A serotonin receptor heterologously produced in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Receptors Channels 4, 129-39.
- BAI, M., TRIVEDI, S. & BROWN, E. M. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. J Biol Chem 273, 23605-10.
- BAILEY, W. J., VANTI, W.B., GEORGE, S. R., BLEVINS, R., SWAMINATHAN, S., BONINI, J.A., SMITH, K. E., WEINSHANK, R.L., O'DOWD, B. F. (2001). Patent status of the therapeutically important G-protein-coupled receptors. Expert Opin Ther Patents 11, 1861-1887.
- BALDWIN, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. Embo J 12, 1693-703.
- BANERES, J. L., MARTIN, A., HULLOT, P., GIRARD, J. P., ROSSI, J. C. & PARELLO, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. J Mol Biol 329, 801-14.

- BANERES, J. L., MESNIER, D., MARTIN, A., JOUBERT, L., DUMUIS, A. & BOCKAERT, J. (2005). Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy. J Biol Chem 280, 20253-60.
- BANERES, J. L. & PARELLO, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. J Mol Biol 329, 815-29.
- BANERJEE, P., JOO, J. B., BUSE, J. T. & DAWSON, G. (1995). Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. Chem Phys Lipids 77, 65-78.
- BANNWARTH, M. & SCHULZ, G. E. (2003). The expression of outer membrane proteins for crystallization. Biochim Biophys Acta 1610, 37-45.
- BARGMANN, C. I. (1998). Neurobiology of the Caenorhabditis elegans genome. Science 282, 2028-33.
- BARNES, N. M. & SHARP, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 38, 1083-152.
- BATZRI, S. & HARMON, J. W. (1986). Is [3H]-tiotidine a specific ligand for the H2-receptor? Pharmacology 32, 241-7.
- BEAUDET, A., GREENSPUN, D., RAELSON, J. & TANNENBAUM, G. S. (1995). Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function. Neuroscience 65, 551-61.
- BENNETT, M. R. (2000). The concept of transmitter receptors: 100 years on. Neuropharmacology 39, 523-46.
- BENOVIC, J. L., STRASSER, R. H., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 2797-801.
- BERTIN, B., FREISSMUTH, M., BREYER, R. M., SCHUTZ, W., STROSBERG, A. D. & MARULLO, S. (1992). Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in Escherichia coli. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits. J Biol Chem 267, 8200-6.
- BOCKAERT, J., CLAEYSEN, S., BECAMEL, C., PINLOCHE, S. & DUMUIS, A. (2002). G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. Int Rev Cytol 212, 63-132.
- BOCKAERT, J. & PIN, J. P. (1998). [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. C R Acad Sci III 321, 529-51.
- —. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. Embo J 18, 1723-9.
- BOHM, S. K., GRADY, E. F. & BUNNETT, N. W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J 322 (Pt 1), 1-18.
- BOHM, S. K., KONG, W., BROMME, D., SMEEKENS, S. P., ANDERSON, D. C., CONNOLLY, A., KAHN, M., NELKEN, N. A., COUGHLIN, S. R., PAYAN, D. G. & BUNNETT, N. W. (1996). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. Biochem J 314 (Pt 3), 1009-16.
- BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K. A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K. L., DURKIN, M. M., LAKHLANI, P. P., BONINI, J. A., PATHIRANA, S., BOYLE, N., PU, X., KOURANOVA, E.,

- LICHTBLAU, H., OCHOA, F. Y., BRANCHEK, T. A. & GERALD, C. (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 8966-71.
- BOUVIER, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. Nat Rev Neurosci 2, 274-
- BRADY, A. E. & LIMBIRD, L. E. (2002). G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. Cell Signal 14, 297-309.
- BRETTHAUER, R. K. (2003). Genetic engineering of Pichia pastoris to humanize N-glycosylation of proteins.

   Trends Biotechnol 21, 459-62.
- BREYER, R. M., STROSBERG, A. D. & GUILLET, J. G. (1990). Mutational analysis of ligand binding activity of beta 2 adrenergic receptor expressed in Escherichia coli. Embo J 9, 2679-84.
- BRIERLEY, R. A., BUSSINEAU, C., KOSSON, R., MELTON, A. & SIEGEL, R. S. (1990). Fermentation development of recombinant Pichia pastoris expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. Ann N Y Acad Sci 589, 350-62.
- BUNEMANN, M. & HOSEY, M. M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. J Physiol 517 (Pt 1), 5-23.
- BUNEMANN, M., LEE, K. B., PALS-RYLAARSDAM, R., ROSEBERRY, A. G. & HOSEY, M. M. (1999).

  Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. Annu Rev Physiol 61, 169-92.
- BURGUENO, J., ENRICH, C., CANELA, E. I., MALLOL, J., LLUIS, C., FRANCO, R. & CIRUELA, F. (2003).

  Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. J Neurochem 86, 785-91.
- BURNSTOCK, G., SATCHELL, D. G. & SMYTHE, A. (1972). A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. Br J Pharmacol 46, 234-42.
- BUSUTTIL, B. E., TURNEY, K. L. & FRAUMAN, A. G. (2001). The expression of soluble, full-length, recombinant human TSH receptor in a prokaryotic system. Protein Expr Purif 23, 369-73.
- BUTZ, J. A., NIEBAUER, R. T. & ROBINSON, A. S. (2003). Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast.
   Biotechnol Bioeng 84, 292-304.
- CABRELE, C. & BECK-SICKINGER, A. G. (2000). Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. J Pept Sci 6, 97-122.
- CEREGHINO, G. P., CEREGHINO, J. L., ILGEN, C. & CREGG, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris. Curr Opin Biotechnol 13, 329-32.
- CEREGHINO, J. L. & CREGG, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS Microbiol Rev 24, 45-66.
- CERIONE, R. A., SIBLEY, D. R., CODINA, J., BENOVIC, J. L., WINSLOW, J., NEER, E. J., BIRNBAUMER, L., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1984). Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system. The pure beta-adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. J Biol Chem 259, 9979-82.

- CERIONE, R. A., STRULOVICI, B., BENOVIC, J. L., STRADER, C. D., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1983). Reconstitution of beta-adrenergic receptors in lipid vesicles: affinity chromatography-purified receptors confer catecholamine responsiveness on a heterologous adenylate cyclase system. Proc Natl Acad Sci U S A 80, 4899-903.
- CHAPOT, M. P., ESHDAT, Y., MARULLO, S., GUILLET, J. G., CHARBIT, A., STROSBERG, A. D. & DELAVIER-KLUTCHKO, C. (1990). Localization and characterization of three different beta-adrenergic receptors expressed in Escherichia coli. Eur J Biochem 187, 137-44.
- CHATTOPADHYAY, A. & HARIKUMAR, K. G. (1996). Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: implications in receptor solubilization. FEBS Lett 391, 199-202.
- CHATTOPADHYAY, A., JAFURULLA, M. & KALIPATNAPU, S. (2004). Solubilization of serotonin1A receptors heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. Cell Mol Neurobiol 24, 293-300.
- CIVELLI, O. (2005). GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. Trends Pharmacol Sci 26, 15-9.
- CONN, P. M., ROGERS, D. C. & MCNEIL, R. (1982). Potency enhancement of a GnRH agonist: GnRH-receptor microaggregation stimulates gonadotropin release. Endocrinology 111, 335-7.
- COUVINEAU, A., FABRE, C., GAUDIN, P., MAORET, J. J. & LABURTHE, M. (1996). Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor. Evidence that asparagine 58 or 69 is crucial for correct delivery of the receptor to plasma membrane. Biochemistry 35, 1745-52.
- CRAFT, C. M., WHITMORE, D. H. & WIECHMANN, A. F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. J Biol Chem 269, 4613-9.
- CRAMER, H., MULLER-ESTERL, W. & SCHROEDER, C. (1997). Subtype-specific desensitization of human endothelin ETA and ETB receptors reflects differential receptor phosphorylation. Biochemistry 36, 13325-32.
- —. (1998). Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with differential receptor phosphorylation. J Cardiovasc Pharmacol 31 Suppl 1, S203-6.
- CRAMER, H., SCHMENGER, K., HEINRICH, K., HORSTMEYER, A., BONING, H., BREIT, A., PIIPER, A., LUNDSTROM, K., MULLER-ESTERL, W. & SCHROEDER, C. (2001). Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. Eur J Biochem 268, 5449-59.
- CREGG, J. M., BARRINGER, K. J., HESSLER, A. Y. & MADDEN, K. R. (1985). Pichia pastoris as a host system for transformations. Mol Cell Biol 5, 3376-85.
- CREGG, J. M., CEREGHINO, J. L., SHI, J. & HIGGINS, D. R. (2000). Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 16, 23-52.
- CREGG, J. M. & MADDEN, K. R. (1989). Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers.

   Mol Gen Genet 219, 320-3.
- CREGG, J. M. & RUSSELL, K. A. (1998). Transformation. Methods Mol Biol 103, 27-39.
- CREGG, J. M., SHEN, S., JOHNSON, M. & WATERHAM, H. R. (1998). Classical genetic manipulation. Methods Mol Biol 103, 17-26.
- CREGG, J. M., VEDVICK, T. S. & RASCHKE, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign

- genes in Pichia pastoris. Biotechnology (N Y) 11, 905-10.
- CRIADO, M., EIBL, H. & BARRANTES, F. J. (1982). Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. Biochemistry 21, 3622-9.
- CRONAN, J. E., JR. (1990). Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. J Biol Chem 265, 10327-33.
- DAAKA, Y., LUTTRELL, L. M., AHN, S., DELLA ROCCA, G. J., FERGUSON, S. S., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 273, 685-8.
- DALE, H. H., LAIDLAW, P. P. (1910). The Physiological Action of Beta-imidazolylethylamine. The Journal of Physiology (London) 41, 318-44.
- DALY, R. & HEARN, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit 18, 119-38.
- DAVID, N. E., GEE, M., ANDERSEN, B., NAIDER, F., THORNER, J. & STEVENS, R. C. (1997). Expression and purification of the Saccharomyces cerevisiae alpha-factor receptor (Ste2p), a 7-transmembrane-segment G protein-coupled receptor. J Biol Chem 272, 15553-61.
- DAVIDSON, J. S., MCARDLE, C. A., DAVIES, P., ELARIO, R., FLANAGAN, C. A. & MILLAR, R. P. (1996).

  Asn102 of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing C-terminal glycinamide. J Biol Chem 271, 15510-4.
- DE JONG, L. A., GRUNEWALD, S., FRANKE, J. P., UGES, D. R. & BISCHOFF, R. (2004). Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from Pichia pastoris. Protein Expr Purif 33, 176-84.
- DE LECEA, L., CRIADO, J. R., PROSPERO-GARCIA, O., GAUTVIK, K. M., SCHWEITZER, P., DANIELSON, P. E., DUNLOP, C. L., SIGGINS, G. R., HENRIKSEN, S. J. & SUTCLIFFE, J. G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. Nature 381, 242-5.
- DE VRIES, L., MOUSLI, M., WURMSER, A. & FARQUHAR, M. G. (1995). GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 11916-20.
- DEL VALLE, J. & GANTZ, I. (1997). Novel insights into histamine H2 receptor biology. Am J Physiol 273, G987-96.
- DESSY, C., KELLY, R. A., BALLIGAND, J. L. & FERON, O. (2000). Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling. Embo J 19, 4272-80.
- DEVREOTES, P. N. (1994). G protein-linked signaling pathways control the developmental program of Dictyostelium. Neuron 12, 235-41.
- DI GUAN, C., LI, P., RIGGS, P. D. & INOUYE, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein. Gene 67, 21-30.
- DIEFFENBACH CW, D. G. (1995). PCR primer: A laboratory Manual. —.
- DINGER, M. C., BADER, J. E., KOBOR, A. D., KRETZSCHMAR, A. K. & BECK-SICKINGER, A. G. (2003).

  Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells. J Biol Chem 278, 10562-71.

- DIXON, R. A., KOBILKA, B. K., STRADER, D. J., BENOVIC, J. L., DOHLMAN, H. G., FRIELLE, T., BOLANOWSKI, M. A., BENNETT, C. D., RANDS, E., DIEHL, R. E. & ET AL. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature 321, 75-9.
- DIXON, R. A., SIGAL, I. S., CANDELORE, M. R., REGISTER, R. B., SCATTERGOOD, W., RANDS, E. & STRADER, C. D. (1987). Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. Embo J 6, 3269-75.
- DOHERTY, A. G. (2001). Metabotropic glutamate receptors. Encyclopedia of life sciences.
- DOHLMAN, H. G., CARON, M. G., DEBLASI, A., FRIELLE, T. & LEFKOWITZ, R. J. (1990). Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. Biochemistry 29, 2335-42.
- DOHLMAN, H. G., THORNER, J., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. Annu Rev Biochem 60, 653-88.
- DOMENECH, T., BELETA, J. & PALACIOS, J. M. (1997). Characterization of human serotonin 1D and 1B receptors using [3H]-GR-125743, a novel radiolabelled serotonin 5HT1D/1B receptor antagonist. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 356, 328-34.
- DUPORT, C., LOEPER, J. & STROSBERG, A. D. (2003). Comparative expression of the human beta(2) and beta(3) adrenergic receptors in Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta 1629, 34-43.
- EBERLE, A. N., MILD, G., SCHLUMBERGER, S., DROZDZ, R., HINTERMANN, E. & ZUMSTEG, U. (2004).

  Expression and characterization of melanin-concentrating hormone receptors on mammalian cell lines.

   Peptides 25, 1585-95.
- EHLRICH, P., MORGENROTH, J. (1957). Immunology and Cancer Research. —.
- ELORZA, M. V., MUNOZ RUIZ, E. & VILLANUEVA, J. R. (1966). Production of yeast cell-wall lytic enzymes on a semi-defined medium by a Streptomyces. Nature 210, 442-3.
- EMORINE, L. J., MARULLO, S., BRIEND-SUTREN, M. M., PATEY, G., TATE, K., DELAVIER-KLUTCHKO, C. & STROSBERG, A. D. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. Science 245, 1118-21.
- ERICKSON, J. R., WU, J. J., GODDARD, J. G., TIGYI, G., KAWANISHI, K., TOMEI, L. D. & KIEFER, M. C. (1998). Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. J Biol Chem 273, 1506-10.
- ERLENBACH, I., KOSTENIS, E., SCHMIDT, C., HAMDAN, F. F., PAUSCH, M. H. & WESS, J. (2001). Functional expression of M(1), M(3) and M(5) muscarinic acetylcholine receptors in yeast. J Neurochem 77, 1327-37.
- EVA, C., KEINANEN, K., MONYER, H., SEEBURG, P. & SPRENGEL, R. (1990). Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. FEBS Lett 271, 81-4.
- FABER, K. N., HARDER, W., AB, G. & VEENHUIS, M. (1995). Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. Yeast 11, 1331-44.
- FABRE, J. E., NGUYEN, M., LATOUR, A., KEIFER, J. A., AUDOLY, L. P., COFFMAN, T. M. & KOLLER, B. H. (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism

- in P2Y1-deficient mice. Nat Med 5, 1199-202.
- FENG, W., CAI, J., PIERCE, W. M., JR. & SONG, Z. H. (2002). Expression of CB2 cannabinoid receptor in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 26, 496-505.
- FERGUSON, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol Rev 53, 1-24.
- FICCA, A. G., TESTA, L. & TOCCHINI VALENTINI, G. P. (1995). The human beta 2-adrenergic receptor expressed in Schizosaccharomyces pombe retains its pharmacological properties. FEBS Lett 377, 140-4.
- FLING, S. P. & GREGERSON, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. Anal Biochem 155, 83-8.
- FLOWER, D. R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. Biochim Biophys Acta 1422, 207-34.
- FOTIADIS, D., LIANG, Y., FILIPEK, S., SAPERSTEIN, D. A., ENGEL, A. & PALCZEWSKI, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. Nature 421, 127-8.
- FRIELLE, T., COLLINS, S., DANIEL, K. W., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & KOBILKA, B. K. (1987).

  Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 7920-4.
- FUKUDA, K., KUBO, T., AKIBA, I., MAEDA, A., MISHINA, M. & NUMA, S. (1987). Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. Nature 327, 623-5.
- FURTHMAYR, H., KAHANE, I. & MARCHESI, V. T. (1976). Isolation of the major intrinsic transmembrane protein of the human erythrocyte membrane. J Membr Biol 26, 173-87.
- FURUKAWA, H. & HAGA, T. (2000). Expression of functional M2 muscarinic acetylcholine receptor in Escherichia coli. J Biochem (Tokyo) 127, 151-61.
- GAIBELET, G., MEILHOC, E., RIOND, J., SAVES, I., EXNER, T., LIAUBET, L., NURNBERG, B., MASSON, J.
   M. & EMORINE, L. J. (1999). Nonselective coupling of the human mu-opioid receptor to multiple inhibitory G-protein isoforms. Eur J Biochem 261, 517-23.
- GARAVITO, R. M. & FERGUSON-MILLER, S. (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. J Biol Chem 276, 32403-6.
- GENTLES, A. J. & KARLIN, S. (1999). Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?

   Trends Genet 15, 47-9.
- GEORGE, S. R., FAN, T., XIE, Z., TSE, R., TAM, V., VARGHESE, G. & O'DOWD, B. F. (2000).

  Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. J Biol Chem 275, 26128-35.
- GEORGE, S. R., LEE, S. P., VARGHESE, G., ZEMAN, P. R., SEEMAN, P., NG, G. Y. & O'DOWD, B. F. (1998). A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. J Biol Chem 273, 30244-8.
- GERHARDT, C. C. & VAN HEERIKHUIZEN, H. (1997). Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. Eur J Pharmacol 334, 1-23.
- GERNGROSS, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotechnol 22, 1409-14.

- GETHER, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors.

   Endocr Rev 21, 90-113.
- GILMAN, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem 56, 615-49.
- GIMPL, G., KLEIN, U., REILANDER, H. & FAHRENHOLZ, F. (1995). Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. Biochemistry 34, 13794-801.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H. W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. & OLIVER, S. G. (1996). Life with 6000 genes. Science 274, 546, 563-7.
- GRISSHAMMER, R., DUCKWORTH, R. & HENDERSON, R. (1993). Expression of a rat neurotensin receptor in Escherichia coli. Biochem J 295 (Pt 2), 571-6.
- GRISSHAMMER, R., LITTLE, J. & AHARONY, D. (1994). Expression of rat NK-2 (neurokinin A) receptor in E. coli. Receptors Channels 2, 295-302.
- GRISSHAMMER, R. & TATE, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. Q Rev Biophys 28, 315-422.
- GRUNEWALD, S., HAASE, W., MOLSBERGER, E., MICHEL, H. & REILANDER, H. (2004). Production of the human D2S receptor in the methylotrophic yeast P. pastoris. Receptors Channels 10, 37-50.
- GSCHWIND, A., ZWICK, E., PRENZEL, N., LESERER, M. & ULLRICH, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. Oncogene 20, 1594-600.
- HAENDLER, B., HECHLER, U., BECKER, A. & SCHLEUNING, W. D. (1993). Expression of human endothelin receptor ETB by Escherichia coli transformants. Biochem Biophys Res Commun 191, 633-8.
- HAMBLIN, M. W. & METCALF, M. A. (1991). Primary structure and functional characterization of a human 5-HT1D-type serotonin receptor. Mol Pharmacol 40, 143-8.
- HAMM, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. J Biol Chem 273, 669-72.
- HAMPE, W., VOSS, R. H., HAASE, W., BOEGE, F., MICHEL, H. & REILANDER, H. (2000). Engineering of a proteolytically stable human beta 2-adrenergic receptor/maltose-binding protein fusion and production of the chimeric protein in Escherichia coli and baculovirus-infected insect cells. J Biotechnol 77, 219-34.
- HANSEN, M. K., TAMS, J. W., FAHRENKRUG, J. & PEDERSEN, P. A. (1999). Functional expression of rat VPAC1 receptor in Saccharomyces cerevisiae. Receptors Channels 6, 271-81.
- HARDEN, T. K. (1983). Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. Pharmacol Rev 35, 5-32.
- HARDEN, T. K., LAZAROWSKI, E. R. & BOUCHER, R. C. (1997). Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity.

   Trends Pharmacol Sci 18, 43-6.
- HARGRAVE, P. A., HAMM, H. E. & HOFMANN, K. P. (1993). Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. Bioessays 15, 43-50.

- HARGRAVE, P. A., MCDOWELL, J. H., CURTIS, D. R., WANG, J. K., JUSZCZAK, E., FONG, S. L., RAO, J. K. & ARGOS, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. Biophys Struct Mech 9, 235-44.
- HARTIG, P. R., BRANCHEK, T. A. & WEINSHANK, R. L. (1992). A subfamily of 5-HT1D receptor genes. Trends Pharmacol Sci 13, 152-9.
- HARTIG, P. R., HOYER, D., HUMPHREY, P. P. & MARTIN, G. R. (1996). Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT1B and 5-HT1D receptor subtypes. Trends Pharmacol Sci 17, 103-5.
- HATT, H., LANG, K. & GISSELMANN, G. (2001). Functional expression and characterization of odorant receptors using the Semliki Forest virus system. Biol Chem 382, 1207-14.
- HEBERT, T. E. & BOUVIER, M. (1998). Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. Biochem Cell Biol 76, 1-11.
- HELDIN, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. Cell 80, 213-23.
- HENDERSON, R., BALDWIN, J. M., CESKA, T. A., ZEMLIN, F., BECKMANN, E. & DOWNING, K. H. (1990).

  An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. Biochem Soc Trans 18, 844.
- HIGGINS, D. R. & CREGG, J. M. (1998). Introduction to Pichia pastoris. Methods Mol Biol 103, 1-15.
- HILDEBRANDT, V., FENDLER, K., HEBERLE, J., HOFFMANN, A., BAMBERG, E. & BULDT, G. (1993).

  Bacteriorhodopsin expressed in Schizosaccharomyces pombe pumps protons through the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 3578-82.
- HILDEBRANDT, V., RAMEZANI-RAD, M., SWIDA, U., WREDE, P., GRZESIEK, S., PRIMKE, M. & BULDT, G. (1989). Genetic transfer of the pigment bacteriorhodopsin into the eukaryote Schizosaccharomyces pombe. FEBS Lett 243, 137-40.
- HILL, D. R., CAMPBELL, N. J., SHAW, T. M. & WOODRUFF, G. N. (1987a). Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK antagonists. J Neurosci 7, 2967-76.
- HILL, D. R., SHAW, T. M. & WOODRUFF, G. N. (1987b). Species differences in the localization of 'peripheral' type cholecystokinin receptors in rodent brain. Neurosci Lett 79, 286-9.
- HJELMELAND, L. M. (1980). A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 6368-70.
- HJELMELAND, L. M., NEBERT, D. W. & OSBORNE, J. C., JR. (1983). Sulfobetaine derivatives of bile acids: nondenaturing surfactants for membrane biochemistry. Anal Biochem 130, 72-82.
- HOFFMANN, M., VERZIJL, D., LUNDSTROM, K., SIMMEN, U., ALEWIJNSE, A. E., TIMMERMAN, H. & LEURS, R. (2001). Recombinant Semliki Forest virus for over-expression and pharmacological characterisation of the histamine H(2) receptor in mammalian cells. Eur J Pharmacol 427, 105-14.
- HOLMES, C. L., LANDRY, D. W. & GRANTON, J. T. (2003). Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. Crit Care 7, 427-34.
- HOPP, T. P., PRICKETT, K.S., PRICE, V.L., LIBBY, R.T., MARCH, C.J., CERRETTI, D.P., URDAL, D.L., AND CONLON, P.J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio Technology* **6**, 1204–1210.
- HOWARD, A. D., WANG, R., PONG, S. S., MELLIN, T. N., STRACK, A., GUAN, X. M., ZENG, Z., WILLIAMS, D. L., JR., FEIGHNER, S. D., NUNES, C. N., MURPHY, B., STAIR, J. N., YU, H., JIANG, Q.,

- CLEMENTS, M. K., TAN, C. P., MCKEE, K. K., HRENIUK, D. L., MCDONALD, T. P., LYNCH, K. R., EVANS, J. F., AUSTIN, C. P., CASKEY, C. T., VAN DER PLOEG, L. H. & LIU, Q. (2000). Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. Nature 406, 70-4.
- HOYER, D., CLARKE, D. E., FOZARD, J. R., HARTIG, P. R., MARTIN, G. R., MYLECHARANE, E. J., SAXENA, P. R. & HUMPHREY, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacol Rev 46, 157-203.
- HOYER, D. & MARTIN, G. R. (1996). Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. Behav Brain Res 73, 263-8.
- HUANG, H. J., LIAO, C. F., YANG, B. C. & KUO, T. T. (1992). Functional expression of rat M5 muscarinic acetylcholine receptor in yeast. Biochem Biophys Res Commun 182, 1180-6.
- IWATA, M., ABRAMSON, J., BYRNE, B. & IWATA, S. (2003). Structure and function of quinone binding membrane proteins. Adv Protein Chem 63, 151-76.
- JAHIC, M., WALLBERG, F., BOLLOK, M., GARCIA, P. & ENFORS, S. O. (2003). Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in Pichia pastoris bioreactor cultures. Microb Cell Fact 2, 6.
- JI, T. H., GROSSMANN, M. & JI, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. J Biol Chem 273, 17299-302.
- JINGAMI, H., NAKANISHI, S. & MORIKAWA, K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate receptor. Curr Opin Neurobiol 13, 271-8.
- JOCKERS, R., LINDER, M. E., HOHENEGGER, M., NANOFF, C., BERTIN, B., STROSBERG, A. D., MARULLO, S. & FREISSMUTH, M. (1994). Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. J Biol Chem 269, 32077-84.
- JONES, M. N. (1999). Surfactants in membrane solubilisation. Int J Pharm 177, 137-59.
- JULIUS, D., BRAKE, A., BLAIR, L., KUNISAWA, R. & THORNER, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alphafactor. Cell 37, 1075-89.
- KAJKOWSKI, E. M., PRICE, L. A., PAUSCH, M. H., YOUNG, K. H. & OZENBERGER, B. A. (1997).

  Investigation of growth hormone releasing hormone receptor structure and activity using yeast expression technologies. J Recept Signal Transduct Res 17, 293-303.
- KAUPMANN, K., HUGGEL, K., HEID, J., FLOR, P. J., BISCHOFF, S., MICKEL, S. J., MCMASTER, G., ANGST, C., BITTIGER, H., FROESTL, W. & BETTLER, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature 386, 239-46.
- KAUPMANN, K., MALITSCHEK, B., SCHULER, V., HEID, J., FROESTL, W., BECK, P., MOSBACHER, J., BISCHOFF, S., KULIK, A., SHIGEMOTO, R., KARSCHIN, A. & BETTLER, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature 396, 683-7.
- KENNEDY, M. E. & LIMBIRD, L. E. (1993). Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. J Biol Chem 268, 8003-11.
- KIEFER, H., KRIEGER, J., OLSZEWSKI, J. D., VON HEIJNE, G., PRESTWICH, G. D. & BREER, H. (1996).

  Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution, and ligand binding.

   Biochemistry 35, 16077-84.

- KIEFER, H., MAIER, K. & VOGEL, R. (1999). Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli. Biochem Soc Trans 27, 908-12.
- KIMURA, Y., VASSYLYEV, D. G., MIYAZAWA, A., KIDERA, A., MATSUSHIMA, M., MITSUOKA, K., MURATA, K., HIRAI, T. & FUJIYOSHI, Y. (1997). Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. Nature 389, 206-11.
- KING, K., DOHLMAN, H. G., THORNER, J., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1990). Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit. Science 250, 121-3.
- KIRILOVSKY, J. & SCHRAMM, M. (1983). Delipidation of a beta-adrenergic receptor preparation and reconstitution by specific lipids. J Biol Chem 258, 6841-9.
- KITAMURA, K., KANEKO, T. & YAMAMOTO, Y. (1971). Lysis of viable yeast cells by enzymes of Arthrobacter luteus. Arch Biochem Biophys 145, 402-4.
- KLABUNDE, T. & EVERS, A. (2005). GPCR antitarget modeling: pharmacophore models for biogenic amine binding GPCRs to avoid GPCR-mediated side effects. Chembiochem 6, 876-89.
- KLABUNDE, T. & HESSLER, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. Chembiochem 3, 928-44.
- KNIAZEFF, J., GALVEZ, T., LABESSE, G. & PIN, J. P. (2002). No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. J Neurosci 22, 7352-61.
- KOLAKOWSKI, L. F., JR., JUNG, B. P., NGUYEN, T., JOHNSON, M. P., LYNCH, K. R., CHENG, R., HENG, H. H., GEORGE, S. R. & O'DOWD, B. F. (1996). Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors. FEBS Lett 398, 253-8.
- KOLAKOWSKI, L. F., JR., O'NEILL, G. P., HOWARD, A. D., BROUSSARD, S. R., SULLIVAN, K. A., FEIGHNER, S. D., SAWZDARGO, M., NGUYEN, T., KARGMAN, S., SHIAO, L. L., HRENIUK, D. L., TAN, C. P., EVANS, J., ABRAMOVITZ, M., CHATEAUNEUF, A., COULOMBE, N., NG, G., JOHNSON, M. P., THARIAN, A., KHOSHBOUEI, H., GEORGE, S. R., SMITH, R. G. & O'DOWD, B. F. (1998). Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. J Neurochem 71, 2239-51.
- KOLB, K. H., JAENICKE, G., KRAMER, M. & SCHULZE, P. E. (1967). Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. Ann N Y Acad Sci 141, 85-95.
- KOPIN, A. S., LEE, Y. M., MCBRIDE, E. W., MILLER, L. J., LU, M., LIN, H. Y., KOLAKOWSKI, L. F., JR. & BEINBORN, M. (1992). Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 3605-9.
- KRUPNICK, J. G. & BENOVIC, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38, 289-319.
- KUHN, P., WILSON, K., PATCH, M. G. & STEVENS, R. C. (2002). The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography. Curr Opin Chem Biol 6, 704-10.
- KüGELGEN, I. V. & WETTER, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 362, 310-323.
- LACATENA, R. M., CELLINI, A., SCAVIZZI, F. & TOCCHINI-VALENTINI, G. P. (1994). Topological analysis of

- the human beta 2-adrenergic receptor expressed in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 10521-5.
- 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. J Biol Chem 275, 33197-200.
- LANGLEY, J. N. (1905). On the reaction of cells of nerve endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. Journal of Physiology XXXIII, 374-413.
- —. (1906). On nerve endings and on special excitable substances in cells. Proc. R. Soc. Lond. B 78, 170-184.
- LAW, S. F., WOULFE, D. & REISINE, T. (1995). Somatostatin receptor activation of cellular effector systems.

   Cell Signal 7, 1-8.
- LE MAIRE, M., CHAMPEIL, P. & MOLLER, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim Biophys Acta 1508, 86-111.
- LEBERER, E., DIGNARD, D., HARCUS, D., THOMAS, D. Y. & WHITEWAY, M. (1992). The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. Embo J 11, 4815-24.
- LEFKOWITZ, R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. Cell 74, 409-12.
- —. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. — J Biol Chem 273, 18677-80.
- —. (2000). The superfamily of heptahelical receptors. Nat Cell Biol 2, E133-6.
- —. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. Trends Pharmacol Sci 25, 413-22.
- LEFKOWITZ, R. J., BENOVIC, J. L., KOBILKA, B., CARON, M.G., 1986. (1986). ß-Adrenergic receptors and rhodopsin: shedding new light on an old subject. Trends Pharmacol. Sci. 7, 444-448.
- LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. (1986). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. Curr Top Cell Regul 28, 209-31.
- LEFKOWITZ, R. J., PITCHER, J., KRUEGER, K. & DAAKA, Y. (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. Adv Pharmacol 42, 416-20.
- LEON, C., HECHLER, B., VIAL, C., LERAY, C., CAZENAVE, J. P. & GACHET, C. (1997). The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. FEBS Lett 403, 26-30.
- LEURS, R., SMIT, M. J., MENGE, W. M. & TIMMERMAN, H. (1994). Pharmacological characterization of the human histamine H2 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. Br J Pharmacol 112, 847-54.
- LI, Z., XIONG, F., LIN, Q., D'ANJOU, M., DAUGULIS, A. J., YANG, D. S. & HEW, C. L. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 21, 438-45.
- LIAPAKIS, G., FITZPATRICK, D., HOEGER, C., RIVIER, J., VANDLEN, R. & REISINE, T. (1996).

  Identification of ligand binding determinants in the somatostatin receptor subtypes 1 and 2. J Biol Chem 271, 20331-9.

- LIMBIRD, L. E. (2004). The receptor concept: a continuing evolution. Mol Interv 4, 326-36.
- LIU, X., DAVIS, D. & SEGALOFF, D. L. (1993). Disruption of potential sites for N-linked glycosylation does not impair hormone binding to the lutropin/choriogonadotropin receptor if Asn-173 is left intact. J Biol Chem 268, 1513-6.
- LOLL, P. J. (2003). Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. J Struct Biol 142, 144-53.
- LUNDSTROM, K. (2003). Semliki Forest virus vectors for large-scale production of recombinant proteins. Methods Mol Med 76, 525-43.
- —. (2005a). Structural biology of G protein-coupled receptors. Bioorg Med Chem Lett 15, 3654-7.
- —. (2005b). Structural genomics of GPCRs. Trends Biotechnol 23, 103-8.
- LUNDSTROM, K., MICHEL, A., BLASEY, H., BERNARD, A. R., HOVIUS, R., VOGEL, H. & SURPRENANT, A. (1997). Expression of ligand-gated ion channels with the Semliki Forest virus expression system. J Recept Signal Transduct Res 17, 115-26.
- LUNDSTROM, K., MILLS, A., BUELL, G., ALLET, E., ADAMI, N. & LILJESTROM, P. (1994). High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. Eur J Biochem 224, 917-21.
- LUNDSTROM, K., VARGAS, A. & ALLET, B. (1995). Functional activity of a biotinylated human neurokinin 1 receptor fusion expressed in the Semliki Forest virus system. Biochem Biophys Res Commun 208, 260-6.
- LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. J Cell Sci 115, 455-65.
- MAEHLE, A. H., PRULL, C. R. & HALLIWELL, R. F. (2002). The emergence of the drug receptor theory. Nat Rev Drug Discov 1, 637-41.
- MALHERBE, P., KRATZEISEN, C., LUNDSTROM, K., RICHARDS, J. G., FAULL, R. L. & MUTEL, V. (1999).

  Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the human metabotropic glutamate receptor 8. Brain Res Mol Brain Res 67, 201-10.
- MARINISSEN, M. J. & GUTKIND, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci 22, 368-76.
- MARULLO, S., DELAVIER-KLUTCHKO, C., ESHDAT, Y., STROSBERG, A. D. & EMORINE, L. (1988). Human beta 2-adrenergic receptors expressed in Escherichia coli membranes retain their pharmacological properties. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 7551-5.
- MASU, Y., NAKAYAMA, K., TAMAKI, H., HARADA, Y., KUNO, M. & NAKANISHI, S. (1987). cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. Nature 329, 836-8.
- MASUDA, Y., TAKATSU, Y., TERAO, Y., KUMANO, S., ISHIBASHI, Y., SUENAGA, M., ABE, M., FUKUSUMI, S., WATANABE, T., SHINTANI, Y., YAMADA, T., HINUMA, S., INATOMI, N., OHTAKI, T., ONDA, H. & FUJINO, M. (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. Biochem Biophys Res Commun 293, 396-402.
- MAY, D. C., ROSS, E. M., GILMAN, A. G. & SMIGEL, M. D. (1985). Reconstitution of catecholamine-stimulated adenylate cyclase activity using three purified proteins. J Biol Chem 260, 15829-33.
- MCDONALD, P. H. & LEFKOWITZ, R. J. (2001). Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors'

- functions. Cell Signal 13, 683-9.
- MCLATCHIE, L. M., FRASER, N. J., MAIN, M. J., WISE, A., BROWN, J., THOMPSON, N., SOLARI, R., LEE, M. G. & FOORD, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393, 333-9.
- MENG, E. C. & BOURNE, H. R. (2001). Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? Trends Pharmacol Sci 22, 587-93.
- MERCIER, J. F., SALAHPOUR, A., ANGERS, S., BREIT, A. & BOUVIER, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem 277, 44925-31.
- MILANO, C. A., DOLBER, P. C., ROCKMAN, H. A., BOND, R. A., VENABLE, M. E., ALLEN, L. F. & LEFKOWITZ, R. J. (1994). Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 10109-13.
- MILLIGAN, G., RAMSAY, D., PASCAL, G. & CARRILLO, J. J. (2003). GPCR dimerisation. Life Sci 74, 181-8.
- MIYASAKA K, F. A. (2003). Cholecystokinin and cholecystokinin receptors. Journal of Gastroenterology 38, 1 13.
- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y. & UNWIN, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. Nature 423, 949-55.
- MOLLAAGHABABA, R., DAVIDSON, F. F., KAISER, C. & KHORANA, H. G. (1996). Structure and function in rhodopsin: expression of functional mammalian opsin in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11482-6.
- MONCZOR, F., FERNANDEZ, N., LEGNAZZI, B. L., RIVEIRO, M. E., BALDI, A., SHAYO, C. & DAVIO, C. (2003). Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model. Mol Pharmacol 64, 512-20.
- MUKHERJEE, C. & LEFKOWITZ, R. J. (1976). Desensitization of beta-adrenergic receptors by beta-adrenergic agonists in a cell-free system: resensitization by guanosine 5'-(beta, gamma-imino)triphosphate and other purine nucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 73, 1494-8.
- MUNCH, G., WALKER, P., SHINE, J. & HERZOG, H. (1995). Ligand binding analysis of human neuropeptide Y1 receptor mutants expressed in E. coli. Receptors Channels 3, 291-7.
- NATHANS, J. & HOGNESS, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell 34, 807-14.
- NEER, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell 80, 249-57.
- NEW, D. C. & WONG, J. T. (1998). The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. Biol Signals Recept 7, 98-108.
- NOBLE, F. & ROQUES, B. P. (1999). CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. Prog Neurobiol 58, 349-79.
- NORDMANN, A., BLOMMERS, M. J., FRETZ, H., ARVINTE, T. & DRAKE, A. F. (1999). Aspects of the molecular structure and dynamics of neuropeptide Y. Eur J Biochem 261, 216-26.
- NORRIS, D. B., GAJTKOWSKI, G. A., WOOD, T. P. & RISING, T. J. (1985). The use of an in vitro binding

- assay to predict histamine H2-antagonist activity. Agents Actions 16, 170-2.
- O'DOWD, B. F., HNATOWICH, M., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & BOUVIER, M. (1989). Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. J Biol Chem 264, 7564-9.
- O'DOWD, B. F., LEE, D. K., HUANG, W., NGUYEN, T., CHENG, R., LIU, Y., WANG, B., GERSHENGORN, M. C. & GEORGE, S. R. (2000). TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. Mol Endocrinol 14, 183-93.
- ODA, T., MORIKAWA, N., SAITO, Y., MASUHO, Y. & MATSUMOTO, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. J Biol Chem 275, 36781-6.
- OFRI, D., RITTER, A. M., LIU, Y. F., GIOANNINI, T. L., HILLER, J. M. & SIMON, E. J. (1992). Characterization of solubilized opioid receptors: reconstitution and uncoupling of guanine nucleotide-sensitive agonist binding. J Neurochem 58, 628-35.
- OGATA, K., UCHIDA, Y., KURIHARA, N., TANI, Y. & TOCHIKURA, T. (1969). Studies on transglycosidation to vitamin B6 by microorganisms. II. Chemical structure of pyridoxine glucoside. J Vitaminol (Kyoto) 15, 160-6.
- OKADA, T., ERNST, O. P., PALCZEWSKI, K. & HOFMANN, K. P. (2001). Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. Trends Biochem Sci 26, 318-24.
- OKADA, T., TERAKITA, A. & SHICHIDA, Y. (2002). [Structure-function relationship in G protein-coupled receptors deduced from crystal structure of rhodopsin]. Tanpakushitsu Kakusan Koso 47, 1123-30.
- OVALLE, R., SPENCER, M., THIWANONT, M. & LIPKE, P. N. (1999). The spheroplast lysis assay for yeast in microtiter plate format. Appl Environ Microbiol 65, 3325-7.
- OVCHINNIKOV YU, A. (1982). Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. FEBS Lett 148, 179-91.
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., FOX, B. A., LE TRONG, I., TELLER, D. C., OKADA, T., STENKAMP, R. E., YAMAMOTO, M. & MIYANO, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289, 739-45.
- PALMER, R. K., BOYER, J. L., SCHACHTER, J. B., NICHOLAS, R. A. & HARDEN, T. K. (1998). Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. Mol Pharmacol 54, 1118-23.
- PAPAC, D. I., THORNBURG, K. R., BULLESBACH, E. E., CROUCH, R. K. & KNAPP, D. R. (1992).

  Palmitylation of a G-protein coupled receptor. Direct analysis by tandem mass spectrometry. J Biol Chem 267, 16889-94.
- PARK, P. S., FILIPEK, S., WELLS, J. W. & PALCZEWSKI, K. (2004). Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. Biochemistry 43, 15643-56.
- PARKER, S. L., PARKER, M. S., SWEATMAN, T. & CROWLEY, W. R. (1998). Characterization of G protein and phospholipase C-coupled agonist binding to the Y1 neuropeptide Y receptor in rat brain: sensitivity to G protein activators and inhibitors and to inhibitors of phospholipase C. J Pharmacol Exp Ther 286, 382-91.
- PAYETTE, P., GOSSARD, F., WHITEWAY, M. & DENNIS, M. (1990). Expression and pharmacological characterization of the human M1 muscarinic receptor in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett

- 266, 21-5.
- PEROUTKA, S. J. (1994). Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors. Synapse 18, 241-60.
- PIN, J. P. & BOCKAERT, J. (1995). Get receptive to metabotropic glutamate receptors. Curr Opin Neurobiol 5. 342-9.
- PIN, J. P., GALVEZ, T. & PREZEAU, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther 98, 325-54.
- PISSIOS, P. & MARATOS-FLIER, E. (2003). Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals. Trends Endocrinol Metab 14, 243-8.
- PLAKIDOU-DYMOCK, S., DYMOCK, D. & HOOLEY, R. (1998). A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. Curr Biol 8, 315-24.
- PORRO, D. & MATTANOVICH, D. (2004). Recombinant protein production in yeasts. Methods Mol Biol 267, 241-58.
- PRESLAND, J. & STRANGE, P. G. (1998). Pharmacological characterisation of the D2 dopamine receptor expressed in the yeast Schizosaccharomyces pombe. Biochem Pharmacol 56, 577-82.
- PRESSE, F., NAHON, J. L., FISCHER, W. H. & VALE, W. (1990). Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. Mol Endocrinol 4, 632-7.
- PRICE, L. A., KAJKOWSKI, E. M., HADCOCK, J. R., OZENBERGER, B. A. & PAUSCH, M. H. (1995).

  Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway.

   Mol Cell Biol 15, 6188-95.
- PRICE, L. A., STRNAD, J., PAUSCH, M. H. & HADCOCK, J. R. (1996). Pharmacological characterization of the rat A2a adenosine receptor functionally coupled to the yeast pheromone response pathway. Mol Pharmacol 50, 829-37.
- PRINZ, B., SCHULTCHEN, J., RYDZEWSKI, R., HOLZ, C., BOETTNER, M., STAHL, U. & LANG, C. (2004). Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Pichia pastoris for structural genomics. J Struct Funct Genomics 5, 29-44.
- RANDS, E., CANDELORE, M. R., CHEUNG, A. H., HILL, W. S., STRADER, C. D. & DIXON, R. A. (1990). Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. J Biol Chem 265, 10759-64.
- RATNALA, V. R., SWARTS, H. G., VANOOSTRUM, J., LEURS, R., DEGROOT, H. J., BAKKER, R. A. & DEGRIP, W. J. (2004). Large-scale overproduction, functional purification and ligand affinities of the His-tagged human histamine H1 receptor. Eur J Biochem 271, 2636-46.
- REILANDER, H. & WEISS, H. M. (1998). Production of G-protein-coupled receptors in yeast. Curr Opin Biotechnol 9, 510-7.
- REISINE, T. & BELL, G. I. (1995a). Molecular biology of somatostatin receptors. Endocr Rev 16, 427-42. —. (1995b). Molecular properties of somatostatin receptors. Neuroscience 67, 777-90.
- ROBINSON, J. D. (2001). Mechanism of Synaptic Transmission: Bridging the gaps. —.
- ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. W. (1967). Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann N Y Acad Sci 139, 703-23.
- ROCHEVILLE, M., LANGE, D. C., KUMAR, U., SASI, R., PATEL, R. C. & PATEL, Y. C. (2000). Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. J Biol Chem 275, 7862-

9.

- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S. L. & KRANS, H. M. (1971). The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. J Biol Chem 246, 1877-82.
- ROMANOS, M., SCORER, C., SREEKRISHNA, K. & CLARE, J. (1998). The generation of multicopy recombinant strains. Methods Mol Biol 103, 55-72.
- ROMANOS, M. A., HUGHES, F. J., COMERFORD, S. A. & SCORER, C. A. (1995). Production of a phosphorylated GST:HPV-6 E7 fusion protein using a yeast expression vector and glutathione Stransferase fusions. Gene 152, 137-8.
- ROPER, D., JACOBY, E., KRUGER, P., ENGELS, M., GROTZINGER, J., WOLLMER, A. & STRASSBURGER, W. (1994). Modeling of G-protein coupled receptors with bacteriorhodopsin as a template. A novel approach based on interaction energy differences. J Recept Res 14, 167-86.
- SAMAMA, P., COTECCHIA, S., COSTA, T. & LEFKOWITZ, R. J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. J Biol Chem 268, 4625-36.
- SANDER, P., GRUNEWALD, S., BACH, M., HAASE, W., REILANDER, H. & MICHEL, H. (1994a).

  Heterologous expression of the human D2S dopamine receptor in protease-deficient Saccharomyces cerevisiae strains. Eur J Biochem 226, 697-705.
- SANDER, P., GRUNEWALD, S., MAUL, G., REILANDER, H. & MICHEL, H. (1994b). Constitutive expression of the human D2S-dopamine receptor in the unicellular yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta 1193, 255-62.
- SANDER, P., GRUNEWALD, S., REILANDER, H. & MICHEL, H. (1994c). Expression of the human D2S dopamine receptor in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe: a comparative study. FEBS Lett 344, 41-6.
- SANDERS, C. R., KUHN HOFFMANN, A., GRAY, D. N., KEYES, M. H. & ELLIS, C. D. (2004). French swimwear for membrane proteins. Chembiochem 5, 423-6.
- SARRAMEGNA, V., DEMANGE, P., MILON, A. & TALMONT, F. (2002a). Optimizing functional versus total expression of the human mu-opioid receptor in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 24, 212-20.
- SARRAMEGNA, V., MULLER, I., MOUSSEAU, G., FROMENT, C., MONSARRAT, B., MILON, A. & TALMONT, F. (2005). Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human muopioid receptor expressed in Pichia pastoris. Protein Expr Purif.
- 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, 1529-46.
- SARRAMEGNA, V., TALMONT, F., SEREE DE ROCH, M., MILON, A. & DEMANGE, P. (2002b). 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.
- SATO, T., SHIMADA, Y., NAGASAWA, N., NAKANISHI, S. & JINGAMI, H. (2003). Amino acid mutagenesis of the ligand binding site and the dimer interface of the metabotropic glutamate receptor 1. Identification of crucial residues for setting the activated state. J Biol Chem 278, 4314-21.
- SCHEER, A., BJORKLOF, K., COTECCHIA, S. & LUNDSTROM, K. (1999). Expression of the alpha 1b-

- adrenergic receptor and G protein subunits in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. J Recept Signal Transduct Res 19, 369-78.
- SCHILLER, H., HAASE, W., MOLSBERGER, E., JANSSEN, P., MICHEL, H. & REILANDER, H. (2000). The human ET(B) endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris shows high-affinity binding and induction of stacked membranes. Receptors Channels 7, 93-107.
- SCHILLER, H., MOLSBERGER, E., JANSSEN, P., MICHEL, H. & REILANDER, H. (2001). Solubilization and purification of the human ETB endothelin receptor produced by high-level fermentation in Pichia pastoris. Receptors Channels 7, 453-69.
- SCHULEIN, R., RUTZ, C. & ROSENTHAL, W. (1996). Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. J Biol Chem 271, 28844-52.
- SCHWEITZER, C., KRATZEISEN, C., ADAM, G., LUNDSTROM, K., MALHERBE, P., OHRESSER, S., STADLER, H., WICHMANN, J., WOLTERING, T. & MUTEL, V. (2000). Characterization of [(3)H]-LY354740 binding to rat mGlu2 and mGlu3 receptors expressed in CHO cells using semliki forest virus vectors. Neuropharmacology 39, 1700-6.
- SCORER, C. A., BUCKHOLZ, R. G., CLARE, J. J. & ROMANOS, M. A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Gene 136, 111-9.
- SCORER, C. A., CLARE, J. J., MCCOMBIE, W. R., ROMANOS, M. A. & SREEKRISHNA, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of Pichia pastoris for high-level foreign gene expression. Biotechnology (N Y) 12, 181-4.
- SHIMOMURA, Y., MORI, M., SUGO, T., ISHIBASHI, Y., ABE, M., KUROKAWA, T., ONDA, H., NISHIMURA, O., SUMINO, Y. & FUJINO, M. (1999). Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. Biochem Biophys Res Commun 261, 622-6.
- SHORR, R. G., LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. (1981). Purification of the beta-adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. J Biol Chem 256, 5820-6.
- SHORR, R. G., STROHSACKER, M. W., LAVIN, T. N., LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. (1982). The beta 1-adrenergic receptor of the turkey erythrocyte. Molecular heterogeneity revealed by purification and photoaffinity labeling. J Biol Chem 257, 12341-50.
- SIZMANN, D., KUUSINEN, H., KERANEN, S., LOMASNEY, J., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & KEINANEN, K. (1996). Production of adrenergic receptors in yeast. Receptors Channels 4, 197-203.
- SJOBERG, E. M., SUOMALAINEN, M. & GAROFF, H. (1994). A significantly improved Semliki Forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. —

  Biotechnology (N Y) 12, 1127-31.
- SMALL, K. M., TANGUAY, D. A., NANDABALAN, K., ZHAN, P., STEPHENS, J. C. & LIGGETT, S. B. (2003). Gene and protein domain-specific patterns of genetic variability within the G-protein coupled receptor superfamily. Am J Pharmacogenomics 3, 65-71.
- SMIT, M. J., LEURS, R., ALEWIJNSE, A. E., BLAUW, J., VAN NIEUW AMERONGEN, G. P., VAN DE VREDE, Y., ROOVERS, E. & TIMMERMAN, H. (1996a). Inverse agonism of histamine H2 antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. Proc Natl Acad Sci U S

- A 93, 6802-7.
- SMIT, M. J., ROOVERS, E., TIMMERMAN, H., VAN DE VREDE, Y., ALEWIJNSE, A. E. & LEURS, R. (1996b). Two distinct pathways for histamine H2 receptor down-regulation. H2 Leu124 --> Ala receptor mutant provides evidence for a cAMP-independent action of H2 agonists. J Biol Chem 271, 7574-82.
- SMIT, M. J., TIMMERMAN, H., BLAUW, J., BEUKERS, M. W., ROOVERS, E., JACOBS, E. H., HOFFMANN, M. & LEURS, R. (1996c). The C terminal tail of the histamine H2 receptor contains positive and negative signals important for signal transduction and receptor down-regulation. J Neurochem 67, 1791-800.
- SMIT, M. J., TIMMERMAN, H., HIJZELENDOORN, J. C., FUKUI, H. & LEURS, R. (1996d). Regulation of the human histamine H1 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. Br J Pharmacol 117, 1071-80.
- SMIT, M. J., VERZIJL, D., CASAROSA, P., NAVIS, M., TIMMERMAN, H. & LEURS, R. (2002). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor ORF74 constitutively activates p44/p42 MAPK and Akt via G(i) and phospholipase C-dependent signaling pathways. J Virol 76, 1744-52.
- SPIEGEL, A. M. (1996a). Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. Annu Rev Physiol 58, 143-70.
- —. (1996b). Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. J Clin Endocrinol Metab 81, 2434-42.
- SREEKRISHNA, K., BRANKAMP, R. G., KROPP, K. E., BLANKENSHIP, D. T., TSAY, J. T., SMITH, P. L., WIERSCHKE, J. D., SUBRAMANIAM, A. & BIRKENBERGER, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Gene 190, 55-62.
- SREEKRISHNA, K., NELLES, L., POTENZ, R., CRUZE, J., MAZZAFERRO, P., FISH, W., FUKE, M., HOLDEN, K., PHELPS, D., WOOD, P. & ET AL. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochemistry 28, 4117-25.
- STANASILA, L., LIM, W. K., NEUBIG, R. R. & PATTUS, F. (2000). Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpha fusion proteins in Escherichia coli. J Neurochem 75, 1190-9.
- STANASILA, L., MASSOTTE, D., KIEFFER, B. L. & PATTUS, F. (1999). Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in Escherichia coli and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. Eur J Biochem 260, 430-8.
- STOCKTON, J., BIRDSALL, N. J., BURGEN, A. S. & HULME, E. C. (1982). The theory, methods and relevance of muscarinic receptor binding studies. Scand J Gastroenterol Suppl 72, 43-7.
- STRADER, C. D., FONG, T. M., TOTA, M. R., UNDERWOOD, D. & DIXON, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. Annu Rev Biochem 63, 101-32.
- STROUD, R. M. & FINER-MOORE, J. (1985). Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. Annu Rev Cell Biol 1, 317-51.

- SUNDBERG, M. W., MEARES, C. F., GOODWIN, D. A. & DIAMANTI, C. I. (1974). Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. J Med Chem 17, 1304-7.
- TAKEDA, S., KADOWAKI, S., HAGA, T., TAKAESU, H. & MITAKU, S. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. FEBS Lett 520, 97-101.
- 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 Lett 394, 268-72.
- TAMARU, Y., NOMURA, S., MIZUNO, N. & SHIGEMOTO, R. (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. Neuroscience 106, 481-503.
- TATE, C. G. (2001). Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. FEBS Lett 504, 94-8.
- TATEMOTO, K. (1982a). Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 2514-8.
- —. (1982b). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 5485-9.
- TELLER, D. C., OKADA, T., BEHNKE, C. A., PALCZEWSKI, K. & STENKAMP, R. E. (2001). Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Biochemistry 40, 7761-72.
- TIERNEY, A. J. (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 128, 791-804.
- TRIGGLE, D. J. (2000). Pharmacological receptors: a century of discovery--and more. Pharm Acta Helv 74, 79-84.
- TRUMPP-KALLMEYER, S., HOFLACK, J., BRUINVELS, A. & HIBERT, M. (1992). Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. J Med Chem 35, 3448-62.
- TSAO, P., CAO, T. & VON ZASTROW, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 22, 91-6.
- TSUCHIYA, D., KUNISHIMA, N., KAMIYA, N., JINGAMI, H. & MORIKAWA, K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd3+. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2660-5.
- TUCKER, J. & GRISSHAMMER, R. (1996). Purification of a rat neurotensin receptor expressed in Escherichia coli. Biochem J 317 (Pt 3), 891-9.
- TUNARU, S., KERO, J., SCHAUB, A., WUFKA, C., BLAUKAT, A., PFEFFER, K. & OFFERMANNS, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. Nat Med 9, 352-5.
- VAN KOPPEN, C. J. & NATHANSON, N. M. (1991). The cysteine residue in the carboxyl-terminal domain of the m2 muscarinic acetylcholine receptor is not required for receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. J Neurochem 57, 1873-7.
- VAUGHAN, J. M., FISCHER, W. H., HOEGER, C., RIVIER, J. & VALE, W. (1989). Characterization of

- melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. Endocrinology 125, 1660-5.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., et al. (2001). The sequence of the human genome. Science 291, 1304-51.
- VERNIER, P., CARDINAUD, B., VALDENAIRE, O., PHILIPPE, H. & VINCENT, J. D. (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. Trends Pharmacol Sci 16, 375-81.
- WAEBER, C. & MOSKOWITZ, M. A. (1995). [3H]sumatriptan labels both 5-HT1D and 5-HT1F receptor binding sites in the guinea pig brain: an autoradiographic study. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 352, 263-75.
- WALSH, D. A., PERKINS, J. P. & KREBS, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. J Biol Chem 243, 3763-5.
- WANG, Y., ZHOU, Y., SZABO, K., HAFT, C. R. & TREJO, J. (2002). Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. Mol Biol Cell 13, 1965-76.
- WANK, S. A., HARKINS, R., JENSEN, R. T., SHAPIRA, H., DE WEERTH, A. & SLATTERY, T. (1992).

  Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 3125-9.
- WEGNER, G. H. (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeasts. FEMS Microbiol Rev 7, 279-83.
- WEISS, H. M. & GRISSHAMMER, R. (2002). Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli. Eur J Biochem 269, 82-92.
- WEISS, H. M., HAASE, W., MICHEL, H. & REILANDER, H. (1995). Expression of functional mouse 5-HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast Pichia pastoris: pharmacological characterization and localization. FEBS Lett 377, 451-6.
- WEISS, H. M., HAASE, W., MICHEL, H. & REILANDER, H. (1998). Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochem J 330 (Pt 3), 1137-47.
- WEISS, H. M., HAASE, W. & REILANDER, H. (1998b). Expression of an integral membrane protein, the 5HT5A receptor. Methods Mol Biol 103, 227-39.
- WEISS, J. M., MORGAN, P. H., LUTZ, M. W. & KENAKIN, T. P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. J Theor Biol 181, 381-97.
- WESS, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. Faseb J 11, 346-54.
- WESS, J., LIU, J., BLIN, N., YUN, J., LERCHE, C. & KOSTENIS, E. (1997). Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. Life Sci 60, 1007-14.
- WHITE, J. H., WISE, A., MAIN, M. J., GREEN, A., FRASER, N. J., DISNEY, G. H., BARNES, A. A., EMSON, P., FOORD, S. M. & MARSHALL, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. Nature 396, 679-82.
- WHITE, S. H. (2004). The progress of membrane protein structure determination. Protein Sci 13, 1948-9.
- WIMALAWANSA, S. J. (1995). Purification and biochemical characterization of neuropeptide Y2 receptor. J

- Biol Chem 270, 18523-30.
- WISE, A., FOORD, S. M., FRASER, N. J., BARNES, A. A., ELSHOURBAGY, N., EILERT, M., IGNAR, D. M., MURDOCK, P. R., STEPLEWSKI, K., GREEN, A., BROWN, A. J., DOWELL, S. J., SZEKERES, P. G., HASSALL, D. G., MARSHALL, F. H., WILSON, S. & PIKE, N. B. (2003). Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. J Biol Chem 278, 9869-74.
- WISE, A., JUPE, S. C. & REES, S. (2004). The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors.

   Annu Rev Pharmacol Toxicol 44, 43-66.
- WU, S. & LETCHWORTH, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of Pichia pastoris pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. Biotechniques 36, 152-4.
- XU, X., ZENG, W., POPOV, S., BERMAN, D. M., DAVIGNON, I., YU, K., YOWE, D., OFFERMANNS, S., MUALLEM, S. & WILKIE, T. M. (1999). RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. J Biol Chem 274, 3549-56.
- XU, Y. L., JACKSON, V. R. & CIVELLI, O. (2004). Orphan G protein-coupled receptors and obesity. Eur J Pharmacol 500, 243-53.
- YARDEN, Y., RODRIGUEZ, H., WONG, S. K., BRANDT, D. R., MAY, D. C., BURNIER, J., HARKINS, R. N., CHEN, E. Y., RAMACHANDRAN, J., ULLRICH, A. & ET AL. (1986). The avian beta-adrenergic receptor: primary structure and membrane topology. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 6795-9.
- ZHU, H., WANG, H. & ASCOLI, M. (1995). The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. Mol Endocrinol 9, 141-50.

La famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) est la plus importante famille de récepteurs transmembranaires responsables de la transduction de signaux extracellulaires. Cette famille protéique représente l'une des plus importantes catégories de cibles thérapeutiques puisqu'elles sont la cible de près de 60% des médicaments actuels (Howard et al. 2001, *TIPS* 22:132-140). Une seule structure de RCPG a été décrite à ce jour, celle de la rhodopsine bovine (Palczewski et al. 2000, *Science* 289:739-745).

Le travail présenté dans ce manuscrit est une contribution au projet de recherche européen MePNet (Membrane Protein Network) (Lundstrom K. 2004, *Curr Opin Drug Dicscov Devel.* 3:342-346). Le but de ce projet de biologie structurale consiste à exprimer une centaine de protéines membranaires de la famille des RCPG dans trois systèmes d'expression différents (*Escherichia coli, Pichia pastoris* et cellules de mammifères infectés par le Virus de la Forêt de Semliki - SFV).

Ce travail consiste à réaliser à chacune des étapes du progamme, l'étude d'un panel de plusieurs RCPG exprimés dans la levure *Pichia pastoris* tout en développant les méthodologies et les stratégies les plus adaptées aux contraintes du projet.

Dans un premier temps afin de faciliter l'obtention des différents ADN nécessaires à la réalisation du projet, une approche systématique de clonage d'ADNc à partir de différentes sources d'ADN et d'ARN a été développée et validée.

Par la suite, afin de réaliser une quantification fiable et reproductible des niveaux d'expression des RCPG chez *Pichia pastoris* une méthode d'imunodétection par dot-blot a spécifiquement été développée pour le projet.

La fonctionnalité des récepteurs exprimés a ensuite été quantifiée par des tests de fixation de ligands à l'équilibre (ou test de « Binding »). Dans le but d'optimiser les résultats obtenus dans des conditions standard d'expression, des études mesurant l'effet de différents paramétres sur l'expression de récepteurs fonctionnels ont par la suite été réalisées.

Préalablement aux étapes de purification, des tests de solubilisation ont été conduits pour sélectionner parmi un panel de 15 détergents les conditions permettant d'obtenir un bon rendement de solubilisation tout en conservant la fonctionnalité des récepteurs solubilisés.

Des études de purification par chromatographie d'affinité ont finalement été réalisées sur deux récepteurs. Les résultats prometteurs obtenus pourront certainement être améliorés par un certain nombre d'optimisations préparatives et analytiques.