HAL
open science

Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches in vitro : mise au point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle

Christel Logez

To cite this version:

Christel Logez. Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches in vitro : mise au point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ073 . tel-01136064

HAL Id: tel-01136064

https://theses.hal.science/tel-01136064

Submitted on 26 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

IREBS – UMR 7242 – Équipe RCPG, douleur et inflammation

THÈSE présentée par :

Christel LOGEZ

soutenue le : **27 novembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie

Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches *in vitro* : mise au point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle

THÈSE dirigée par :

Dr SIMONIN Frédéric	Chargé de recherche, université de Strasbourg
Dr WAGNER Renaud	Ingénieur de recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr JOCKERS Ralf	Directeur de recherche INSERM, Institut COCHIN, U1016, Paris
Dr MOUILLAC Bernard	Directeur de recherche INSERM, IGF, U661, Montpellier

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr HIBERT Marcel	Professeur, université de Strasbourg
Dr FERRY Gilles	Chef de Projet Recherche, Institut de Recherche Servier, Croissy-sur-Seine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marcel HIBERT, Ralf JOCKERS et Bernard MOUILLAC d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie également l'Institut de Recherche Servier, l'Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg et l'ANRT de m'avoir donné les moyens matériels et financiers de réaliser ce projet.

Je veux témoigner ici toute ma reconnaissance à Jean BOUTIN, Gilles FERRY, Frédéric SIMONIN et Renaud WAGNER qui m'ont accordé leur confiance pour mener ce projet et qui m'ont encadrée durant cette thèse. Votre disponibilité, votre soutien, votre enthousiasme et vos conseils m'ont beaucoup aidée.

Un merci tout particulier à Renaud qui m'a accueillie en stage de master 2 il y a bientôt 7 ans et avec qui je travaille et partage le même bureau depuis. Avec ton « éternel optimisme », tu as souvent su trouver les mots pour me rassurer, me redonner confiance et me remotiver. Merci de t'être autant investi avec moi dans ce projet du début jusqu'à la fin. Merci à toi pour ton écoute, tes conseils, ta bonne humeur et ton humour. C'est un réel plaisir de travailler avec toi.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe « GPCR et Douleurs » de Strasbourg au grand complet, les nouveaux, les permanents et les anciens, pour leur aide et les bons moments passés ensembles. Je ne vous citerai pas tous mais sachez que j'ai une pensée pour chacun d'entre vous. Merci en particulier à Céline et Isabelle avec qui j'ai longtemps partagé mes repas le midi à la cafétéria, ces petits moments de détente ont souvent été un sas de décompression pour moi. Merci également à Olivier pour sa bonne humeur et sa gentillesse et avec qui nous avons partagé nos premiers GDR et présentations à l'extérieur en tant qu'étudiants en thèse.

Un grand merci également tous les membres de l'équipe « BPMC » de Croissy-sur-Seine, qui m'ont chaleureusement accueillie parmi eux pendant un an. Je remercie chacun d'entre vous de m'avoir aidée à trouver mes repères dans le laboratoire, appris à utiliser les appareils que je ne connaissais pas et guidée pour la logistique et les démarches administratives. Merci en particulier à Sylvie qui m'a encadrée sur la partie biophysique, ton aide et tes conseils m'ont beaucoup apporté. Je tiens également à remercier Céline qui m'a aidée et conseillée pour les analyses pharmacologiques.

Je souhaite très sincèrement remercier Jean-Louis BANÈRES et Marjorie DAMIAN de l'IBMM de Montpellier, avec qui j'ai réalisé les expériences de reconstitution en nanodisques. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, de m'avoir accordé de votre temps, de m'avoir aidée pour la réalisation des expériences et de m'avoir donné toutes ces explications.

Je remercie chaleureusement mes amis de leur soutien et de leurs encouragements : Julie, Anne-Flore et Matt, Chris et Isa, Claire et Ben, Isabelle L., Gaëlle, Max, Caro et Matteo, Thierry, Sarah et Killian, Tan, Cédric et Gabrielle. Un grand merci également à ma famille : mes parents ; Mike, Sandie, Anthony, Alexi et Thomas ; Chris, Jenni, Emma et Léa ; Nath, Max, Chloée et Lucie ; Stéph et Frank. Si j'en suis là aujourd'hui c'est aussi grâce à vous. Désolée de ne pas avoir été plus présente ces derniers temps.

Pour finir je voudrais remercier de tout mon cœur celui qui a partagé toute cette aventure avec moi et qui partage ma vie aujourd'hui. Merci pour ta patience et ta compréhension. Merci d'avoir su trouver les mots pour me réconforter, m'encourager et me remotiver dans les moments difficiles. Et surtout, merci infiniment pour ton aide et ton soutien.

Table des matières

Abréviations **5**

Liste des figures **7**

Préface **9**

Partie I : Introduction bibliographique **11**

1. Les récepteurs couplés aux protéines G **13**

1.1. Généralités sur les RCPG 13

1.1.1. La fonction générale des RCPG 13

1.1.2. La diversité des RCPG et de leurs ligands 14

1.1.3. Les classifications des RCPG 15

1.2. La structure des RCPG 16

1.2.1. La topologie commune des RCPG tirée des analyses de séquence 16

1.2.2. Les signatures moléculaires des RCPG tirées des structures cristallographiques 17

1.3. Le mode d'action des RCPG 20

1.3.1. Les différentes conformations des RCPG 20

1.3.2. Le mécanisme d'activation des RCPG 20

1.3.3. L'activation de la protéine G 22

1.3.4. La transduction du signal 24

2. L'intérêt de l'étude des RCPG **25**

2.1. Importance physiologique et thérapeutique des RCPG 25

2.2. La recherche pharmaceutique sur les RCPG 27

2.2.1. Le processus de découverte de médicament 27

2.2.2. Les techniques de criblage des molécules 28

2.3. L'intérêt des études *in vitro* 29

2.3.1. Un environnement expérimental controlé 29

2.3.2. Des informations sur les RCPG eux-mêmes 29

2.3.3. L'identification de nouveaux partenaires d'interaction 32

2.3.4. La caratérisation des interactions 35

3. Le challenge de l'étude de RCPG *in vitro* **40**

3.1. La surexpression des RCPG 41

3.1.1. Les bactéries 41

3.1.2. Les levures 42

3.1.3. Les cellules d'insectes 43

3.1.4. Les cellules de mammifères 44

3.1.5. Les systèmes acellulaires 44

3.2. La purification des RCPG 46

3.2.1. La préparation de membranes 46

3.2.2. La solubilisation 46

3.2.3. La purification 47

3.3. La stabilisation des RCPG purifiés 49

3.3.1. La modification des RCPG 49

3.3.2. L'ajout d'agents stabilisants 52

3.3.3. Le changement de l'environnement hydrophobe 54

4. Les RCPG étudiés dans ce projet **58**

4.1. Le récepteur de la mélatonine MT1 59

4.1.1. La mélatonine 59

4.1.2. Les récepteurs de la mélatonine 61

4.1.3. Effets et rôles 62

4.2. Le récepteur de l'adénosine A2A : 64

4.2.1. L'adénosine 64

4.2.2. Les récepteurs de l'adénosine 66

4.2.3. Effets et rôles 67

Objectifs du projet **69**

Partie II : Matériels et méthodes **71**
1. Les techniques préparatives **73**
1.1. Expression des RCPG dans la levure *Pichia pastoris* 73
1.2. Préparation des membranes de levure *Pichia pastoris* 73
1.3. Purification des RCPG 74
1.3.1. Solubilisation 74
1.3.2. Chromatographie d'affinité sur nickel 74
1.3.3. Chromatographie d'affinité sur résine anti-Flag 74
1.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique 74
1.4. Essais de stabilisation sur le récepteur MT1 75
1.4.1. Ajout de lipides 75
1.4.2. Echange des détergents avec des polymères amhiphiles 75
1.4.3. Reconstitution du récepteur MT1 en nanodisques 76
2. Les techniques d'analyses biochimiques **77**
2.1. Dosage protéique 77
2.2. SDS-PAGE et immunodétection 77
2.3. Digestion enzymatique par PNGase et TEV 78
2.3.1. Digestion par la PNGase 78
2.3.2. Digestion par la TEV 78
2.4. Test de fixation de radioligand à l'équilibre 78
2.4.1. Mise au point d'un test adapté aux protéines purifées 78
2.4.2. Courbe de saturation 79
2.4.3. Courbes de déplacement 80
2.5. Test d'activation de la protéine G 80
3. Les techniques d'analyses biophysiques **80**
3.1. Spetrométrie de masse 80
3.2. SEC-MALS 81
3.3. Microscopie électronique 82
3.4. Résonance plasmonique de surface 82
3.4.1. Capture du récepteur A2A purifié sur une puce SPR 82
3.4.2. Test d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR 82
3.4.3. Etude cinétique en un seul cycle de l'interaction ligand/récepteur par SPR 83
3.5. Etude de thermostabilité 83
3.5.1. Détermination du Tm du récepteur A2A avec le kit Proteostat™ 83
3.5.2. Détermination du Tm du récepteur A2A par l'appareil Optim® 1000 84
3.5.3. Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de ligand par l'appareil Optim® 1000 84

Partie III : Résultats et discussions **87**
1. Production, purification et caractérisation du récepteur de l'adénosine A2A **89**
1.1. Introduction 89
1.2. Production et purification du récepteur A2A 90
1.2.1. Production du récepteur A2A dans la levure *Pichia pastoris* 90
1.2.2. Solubilisation et purification du récepteur A2A 92
1.3. Caractérisation biochimique et biophysique des récepteurs A2A purifiés 95
1.3.1. Etude de la nature des différentes formes purifiées 95
1.3.1.1. Etude de la glycosylation du récepteur A2A purifiés 95
1.3.1.2. Mise en évidence d'une troncation C-terminale par des méthodes biochimiques 96
1.3.1.3. Analyse par spectrométrie de masse 97
1.3.2. Analyse de l'homogénéité et de l'état d'oligomérisation 98
1.3.2.1. Analyse en SEC-MALS 98
1.3.2.2. Analyse en microscopie électronique 99
1.4. Etude d'interactions ligand/récepteur purifié 100
1.4.1. Etude par des tests de fixation de radioligand à l'équilibre 100
1.4.1.1. Mise au point d'un test adapté aux protéines purifiées 100
1.4.1.2. Courbe de saturation de radioligand sur le récepteur A2A purifié 101
1.4.1.3. Etude de la stabilité de l'activité de liaison dans le temps 102
1.4.2. Etude par résonance plasmonique de surface 103
1.4.2.1. Capture du récepteur A2A purifié sur une puce SPR 104
1.4.2.2. Test d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR 104
1.4.2.3. Etude cinétique en un seul cycle de l'interaction ligand/récepteur par SPR 105
1.5. Etude de thermostabilité du récepteur A2A purifié 106

1.5.1. Détermination du Tm avec l'appareil Optim® 1000 107
1.5.1.1. Détermination du Tm du récpeteur A2A en absence de ligand 107
1.5.1.2. Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de ligand 107
1.5.2. Détermination du Tm du récepteur A2A avec le kit ProteoStat™ 108
1.6. Discussion 109
1.6.1. Production et purifcation du récepteur A2A 109
1.6.2. Mise au point d'un test de fixation de radioligand adapté aux récepteurs purifiés 110
1.6.3. Etude d'interaction ligand/récepteur purifié par SPR 111
1.6.4. Etude de thermostabilité 112
1.6.5. Conclusions et perspectives 113
2. Production, purification et caratérisation du récepteur MT1 114
2.1. Introduction 114
2.2. Article soumis 117
2.3. Conclusions et perspectives 143
3. Essais de stabilisation du récepteur MT1 143
3.1. Introduction 143
3.2. Ajout de lipides 144
3.3. Echange des détergents avec des polymères amphiphiles 145
3.4. Reconstitution en nanodisques 147
3.4.1. Assemblage et purification des nanodisques 147
3.4.2. Test d'activation de la protéine G 148
3.5. Discussion 150
3.5.1. L'ajout de lipide 150
3.5.2. L'échange des détergent avec des polymères amphiphiles 150
3.5.3. La reconsitution en nanodisques 151
3.5.4. Conclusions et perspectives 152
Conclusion générale 155
Annexes 157
Publication 1 : 159
Publication 2 : 161
Publication 3 : 163
Références Bibliographiques 165

Abréviations

AA2A : récepteur à l'Adénosine A2A
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique
APol : Amphipol
ATP : Adénosine Tri-Phophate
BCA : BiCinchoninic Acid
BCM : Barycentric mean
BHK : Baby Hamster Kidney
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA : Bovin Serum Albumin
Chaps : (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate)
CHO : Chinese Hamster Ovary
CHS : Cholesteryl Hemisuccinate
CMC : Concentration Micellaire Critique
CPM : (N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide)
DAG : diacylglycérol
DDM : n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside
DLS : Dynamic Light Scattering
DM : n-Decyl-β-D-Maltopyranoside
DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité Optique
DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
ECL : Extra-Cellular Loop
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique
Fos 14 : Fos-Choline-14
FRET : Förster Resonance Energy Transfer
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GIP : GPCR Interacting Protein
GMPc : Guanosine Mono-Phosphate cyclique
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HEK : Human Embryonic Kidney
ICL : Intra-Cellular Loop
IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography
IP_3 : Inositol triphophate
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
LT4 : Lysozyme T4
MSP : Membrane Scaffolding Protein
MT1 : récepteur à la mélatonine de type 1
MT2 : récepteur à la mélatonine de type 2
NAPol : Neutral Amphipol
PBS : Phospahte Buffer Saline
PEG : PolyEthylène Glycol
PEI : PolyEthyleneImine
PIP_2 : Phosphatidyl inositol bis-Phosphate
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PMSF : PhénylMéthylSulphonyl Fluoride
POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
RCPG : Récepteur Couplés aux Protéines G
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RU : Unité de Résonance
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SEC : Size Exclusion Chromatography
SEC-MALS : Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering
SPR : Surface Plasmon Resonance
SVF : Semliki Forest Virus
TAP : Tandem Affinity Purification
TBST : Tris Buffer Saline Tween
TEV : Tobacco Etch Virus
TM : domaine tansmembraire
Tm : température de fusion
YNB : Yeast Nitrogen Base
YPG : Yeast Peptone Glucose

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de la fonction générale des RCPG et de la diversité de leurs stimuli..... 13
Figure 2 : Représentation schématique en deux dimensions des récepteurs couplés aux protéines G. 16
Figure 3 : Représentation des premières des structures cristallographiques de RCPG..... 17
Figure 4 : Illustration des structures de RCPG résolues au cours du temps..... 18
Figure 5 : Illustration du réseau consensus de contacts non-covalentes dans les RCPG. 19
Figure 6 : Représentation schématique de l'effet pharmacologique des ligands. 20
Figure 7 : Illustration du mécanisme d'activation des RCPG. 21
Figure 8 : Représentation de la structure d'une protéine G hétérotrimérique. 22
Figure 9 : Représentation de la séquence d'activation de la protéine G par un récepteur lié à un agoniste..... 23
Figure 10 : Représentation schématique des deux principales voies de tranduction des protéines G. 24
Tableau 1 : Exemples de polymorphismes des RCPG associés à des maladies humaines. 26
Tableau 2 : Exemples de médicaments les plus vendus ciblant des RCPG. 26
Figure 11 : Illustration du processus de découverte de médicament..... 28
Figure 12 : Représentation schématique du principe de la diffusion dynamique de la lumière..... 30
Figure 13 : Illustration des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des trois structures secondaires retrouvés dans les protéines. 31
Figure 14 : Représentation schématique du principe des tests de thermostabilité basés sur la fluorescence. . 31
Figure 15 : Représentation schématique de différentes méthodes pour identifier des partenaires d'interaction. 33
Figure 16 : Représentation schématique du cycle de criblage par phage display. 35
Figure 17 : Illustration schématique du principe de FRET. 37
Figure 18 : Représentation schématique du principe de la résonance plasmonique de surface (SPR). 38
Figure 19 : Représentation schématique de la configuration de base d'un calorimètre de titration isotherme. 39
Figure 20 : Image de microscopie électronique à balayage de la bactérie *Escherichia coli*. 42
Figure 21 : Image de microscopie électronique de la levure *Pichia pastoris*. 43
Figure 22: Image de microscopie électronique de cellules d'insectes *Sf9* infectées par bacculovirus. 43
Figure 23: Image de microscopie électronique de cellules de mammifères..... 44
Figure 24 : Représentation schématique de l'expression acellulaire. 45
Figure 25 : Schéma représentant la solubilisation d'un RCPG par des détergents. 47
Figure 26 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en fusion avec le lysosyme T4. 50
Figure 27 : Représentation de la structure du récepteur de l'adénosine A2A thermostabilisé 51
Figure 28 : Représentation schématique d'une micelle de DDM et d'une micelle mixte DDM/CHS 52
Figure 29 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en complexe avec le Nb80 53
Figure 30 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en complexe avec la prtéine G hétérotrimérique..... 54
Figure 31 : Représentation schématique de l'échange des détergents par des amphipols. 56
Figure 32 : Schéma représentant une méthode de reconstitution de RCPG en liposome. 57
Figure 33 : Représentation schématique de la reconstitution d'un RCPG en nanodiques. 58
Figure 34 : Représentation de la structure de la mélatonine. 59
Figure 35 : Schéma de la voie de biosynthèse de la mélatonine. 60
Figure 36 : Représentation de la structure de l'adénosine..... 65
Figure 37 : Schéma des voies de synthèse et de dégradation de l'adénosine extracellulaire..... 65
Figure 38 : Représentation schématique de la construction plasmidique pour l'expression du RCPG A2A .. 90
Figure 39 : Analyse des membranes exprimant l'A2A par western blot et test de fixation de radioligand..... 91
Figure 40 : Résultats de la purification de l'A2A sur colonne de nickel 93
Figure 41 : Résultats de la purification de l'A2A sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique..... 94
Figure 42 : Analyse de la déglycosylation par PNGase F 95
Figure 43 : Mise en évidence d'une probable délétion par des méthodes biochimiques 96
Figure 44 : Illustration du recouvrement de séquence des peptides analysés par spectrométrie de masse..... 97
Figure 45 : Spectre de SEC-MALS obtenu pour le récepteur A2A purifié..... 99
Figure 46 : Image de microscopie électronique à coloration négative du récepteur A2A purifié..... 99
Figure 47 : Test de fixation du radioligand [3H]ZM241385 avec différentes méthodes de séparation..... 101
Figure 48 : Courbe de saturation de radioligand sur différentes fractions purifiées du récepteur A2A 102

Figure 49 : Suivi de l'activité de liaison de radioligand en cours du temps..... 103
Figure 50 : Sensorgramme des tests d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR ... 105
Figure 51 : Sensorgramme de l'étude cinétique de l'interaction de ligand avec le récepteur A2A par SPR. 106
Figure 52 : Détermination du Tm du récepteur A2A en absence de ligand par l'appareil Optim® 1000 107
Figure 53 : Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de concentration croissante en ligand par l'appareil Optim® 1000..... 108
Figure 54 : Détermination du Tm du récepteur A2A en absence de ligand avec le kit ProteoStat™ 109
Figure 55 : Test de fixation du radioligand sur le récepteur MT1 additionné de lipides 145
Figure 56 : Test de fixation du radioligand sur le récepteur MT1 stabilisé en NAPols seul ou additionné de lipides..... 146
Figure 57 : Résultats de la purification des nanodisques sur colonne de nickel 148
Figure 58 : Test d'activation de la protéine G sur le récepteur MT1 reconstitué en nanodisque..... 149

Préface

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de protéines membranaires, avec plus de 800 gènes codants identifiés dans le génome humain. Les RCPG ont la capacité de lier une grande diversité de ligands, aussi bien des molécules endogènes tels que les hormones, les nucléotides, les neurotransmetteurs, que des signaux exogènes comme les photons, les molécules odorantes ou gustatives. Localisés à la surface des cellules dans la membrane plasmique, ils sont des intermédiaires clés dans la transmission de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Ces récepteurs, exprimés dans tous les organes du corps humain, jouent un rôle primordial dans la communication intercellulaire et la réception des signaux sensoriels. Ils sont impliqués dans la plupart des grandes fonctions physiologiques et, par conséquent, dans les dysfonctionnements associés. Ils représentent donc des cibles thérapeutiques très intéressantes pour le traitement de nombreuses pathologies, telles que des maladies cardiaques, des désordres du système nerveux central ou inflammatoires, et sont déjà la cible de 30 % des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique. Les RCPG ont donc un grand intérêt aussi bien pour la recherche fondamentale que pour la santé publique.

Depuis les premières études utilisant des molécules radioactives pour détecter ces récepteurs et en décrire les propriétés dans les années 1970, en passant par le clonage des gènes codant ces protéines dans les années 1980, jusqu'aux études réalisées pour comprendre les mécanismes de reconnaissance des ligands et de signalisation cellulaire et mettre à jour la structure de ces récepteurs, la recherche s'intéresse depuis plus de 40 ans aux RCPG. De nombreux travaux ont permis d'avancer dans la compréhension du fonctionnement de ces récepteurs et plusieurs grandes découvertes ont d'ailleurs été récompensées de leur intérêt par un prix Nobel. Le premier remonte à 1971, décerné à Earl W. Sutherland pour ses découvertes concernant les mécanismes d'action des hormones, notamment l'adrénaline. Plus tard, en 1994, Alfred G. Gilman et Martin Rodbell obtiennent le prix Nobel de physiologie et médecine pour la découverte des protéines G et leur rôle dans la transduction du signal dans les cellules entre les RCPG et leurs effecteurs. En 2000, Arvid Carlsson, Paul Greengard et Eric R. Kandel reçoivent le prix Nobel de physiologie et médecine pour avoir établi le rôle des RCPG dans la transmission synaptique et la transduction des signaux dans le système nerveux. Richard Axel et Linda B. Buck ont cloné les gènes codant pour des centaines de récepteurs aux odeurs et ont défini l'organisation générale du système olfactif, ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie et médecine en 2004. Et plus récemment, Robert J. Lefkowitz et Brian Kobilka ont reçu le prix Nobel de chimie 2012 pour leurs travaux sur les RCPG.

Robert J. Lefkowitz a été depuis 40 ans un des leader dans le domaine des RCPG forgeant certains concepts majeurs. Il a définit avec André De Léan le concept de complexe ternaire entre récepteur, protéine G et effecteur. Son laboratoire a également décrit avec minutie les mécanismes moléculaires de l'internalisation des RCPG, de leur recyclage et/ou de leur dégradation. Avec Susanna Cotecchia et Michel A. Kjelsberg, Robert J. Lefkowitz a établi le concept d'activité constitutive des RCPG. Il a aussi été impliqué, avec Michel Bouvier et d'autres équipes, dans la génération du concept de signalisation fonctionnelle. Brian Kobilka a démarré dans le laboratoire de Robert J. Lefkowitz, où il a cloné le gène codant pour le récepteur β2-adrénergique. Puis il a monté son laboratoire et a entrepris d'obtenir la structure cristallographique du récepteur β2-adrénergique et d'autres RCPG. La tâche est immense, de nombreux laboratoires dans le monde s'y attachent, sans succès. Les récepteurs sont faiblement exprimés, difficiles à purifier, et instables. En 2000, Krzysztof Palczewski réussit à cristalliser la rhodopsine bovine, un exploit, mais plus aisé vu la plus grande quantité de protéines naturellement exprimées. Après plus de 15 ans d'effort, Brian Kobilka a réussi à définir les conditions pour cristalliser le récepteur β2-adrénergique, dont il publie la structure en 2007. Depuis lors, son laboratoire et plusieurs autres ont réussi à cristalliser plus d'une cinquantaine de structures de 18 RCPG différents, en présence d'agonistes, d'antagonistes ou d'agonistes inverses. L'équipe de Brian Kobilka a même réussi à co-cristalliser une forme pleinement active du récepteur β2-adrénergique en interaction avec une protéine G. Les découvertes de Robert J. Lefkowitz et Brian Kobilka ont ainsi été cruciales pour améliorer la compréhension du fonctionnement des RCPG à l'échelle moléculaire (Bockaert, 2012).

De façon générale, les nombreux travaux réalisés sur les RCPG ces dernières années ont permis de grandes avancées aussi bien dans la conception du fonctionnement des RCPG que dans le développement de nouveaux outils et stratégies pour les étudier. Mais loin de clore le chapitre de l'étude des RCPG, ces découvertes ouvrent au contraire de nouvelles perspectives dans ce domaine et renforce l'intérêt pour les RCPG.

Partie I : Introduction bibliographique

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

1.1. Généralités sur les RCPG

1.1.1. La fonction générale des RCPG

La membrane plasmique d'une cellule forme une barrière séparant l'environnement extérieur du cytoplasme cellulaire. Grâce à une perméabilité très sélective, elle joue un double rôle de protection et de contrôle des échanges entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. En effet, la membrane plasmique, en plus d'accepter sous certaines conditions des transferts passifs de molécules, présente à sa surface des protéines capables d'assurer des fonctions très diverses, telles que le transport de molécules, la reconnaissance intercellulaire, la transduction de signaux…

Parmi ces protéines membranaires, on trouve les récepteurs chargés de capter les stimuli extracellulaires et de transmettre l'information à l'intérieur de la cellule. Il existe plusieurs types de récepteurs membranaires différenciés en fonction de leur structure et de leur mode d'action, notamment les récepteurs de type canaux ioniques, les récepteurs à activité enzymatique (de type guanylate cyclase, tyrosine kinase, sérine/thréonine kinases…) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les RCPG ont pour rôle de capter les stimuli extracellulaires et de transmettre l'information à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques, d'où leur nom de récepteurs couplés aux protéines G. Les protéines G vont alors activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires, permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée (**Figure 1**).

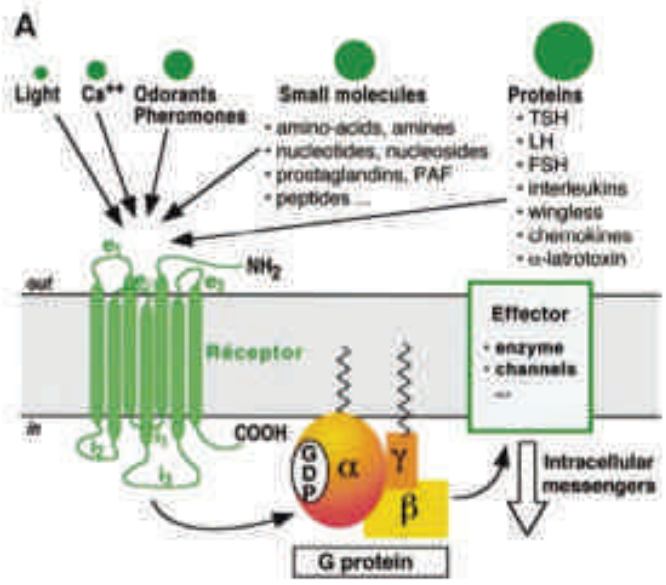


Figure 1 : Illustration de la fonction générale des RCPG et de la diversité de leurs stimuli.

La liaison de molécules messages sur la surface extracellulaire du récepteur permet l'activation de protéines G qui vont agir sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires. La diversité des messages qui activent ces récepteurs est une illustration de leur succès évolutif (Bockaert & Pin, 1999).

1.1.2. La diversité des RCPG et de leurs ligands

Parmi les récepteurs membranaires, les récepteurs couplés aux protéines G représentent la famille la plus large et la plus diversifiée (Bockaert et al., 2002). Ils sont ubiquitaires chez les eucaryotes et retrouvés dans presque toutes les types cellulaires et organismes, incluant les levures (Versele et al., 2001), les insectes (Hill et al., 2002), les plantes (Josefsson, 1999), les cellules de mammifères (Vassilatis et al., 2003). Le séquençage du génome humain a permis d'identifier la famille des RCPG comme une des plus grandes classes de protéines du génome des mammifères (Lander *et al.*, 2001 ; Venter *et al.*, 2001). Le nombre de RCPG dans le génome humain a été estimé à environ 950, dont 500 sont des récepteurs sensoriels et 450 des récepteurs de ligands endogènes (Takeda et al., 2002).

Ces récepteurs sont impliqués dans la transduction du signal d'une grande variété de stimuli endogènes ou exogènes (**Figure 1**), comprenant des photons (Okada et al., 2001), des molécules odorantes (Reed, 2004) ou gustatives (Adler et al., 2000), des ions (Brown et al., 1998), des amines (Vernier et al., 1995), des nucléotides (Fredholm et al., 2001), des acides aminés (Lujan et al., 2005), des peptides (Janecka et al., 2004), des protéines (Horuk, 2001), des lipides (Chun et al., 2002), des acides gras (Brown et al., 2005), des stéroïdes (Revankar et al., 2005), des intermédiaires du cycles de Krebs (He et al., 2004). Cependant, en plus des récepteurs dont le ligand a été identifié, il existe un grand nombre de RCPG sans ligand associé, appelés « RCPG orphelins ». Parmi les 500 RCPG sensoriels, les récepteurs de chimiokines et chemoattractant ont été pour la plupart « désorphelinisés », tandis que les récepteurs olfactifs et gustatifs restent en grande partie orphelin. Concernant les RCPG de ligands endogènes, une centaine d'entre eux sont toujours orphelins (Chung et al., 2008).

Au vu de leur grand nombre, les RCPG ont commencé à être répertoriés systématiquement dans des bases de données dans la fin des années 1980 et le début des années 1990. Celles-ci rassemblent les informations disponibles sur ces récepteurs (séquence, gène, famille, code nomenclature, structure tridimensionnelle) mais aussi sur leurs ligands, leurs mécanismes de transduction, leurs fonctions physiologiques… Il existe plusieurs bases de données concernant les RCPG tel que GPCRDB (Horn et al., 2003), IUPHAR (Foord *et al.*, 2005 ; Davenport *et al.*, 2013), GLIDA (Okuno et al., 2006).

1.1.3. Les classifications des RCPG

Malgré leur très grande diversité, les RCPG présentent certaines ressemblances et peuvent être regroupés en famille. Plusieurs systèmes de classification des RCPG ont été proposés en se basant sur différents critères, tels que l'homologie de séquence, la similarité fonctionnelle, le mode de liaison du ligand, la composition en acides aminés ou encore la phylogénie (Kumari et al., 2009).

La plus connue, et encore la plus utilisée, est la classification A-F qui a été établie par Kolakowski en 1994. Ce système a été conçu pour recouvrir tous les RCPG chez les vertébrés et les invertébrés. Basé sur l'homologie de séquence et la similarité fonctionnelle, il classe les RCPG en six familles : la famille A regroupe les récepteurs similaires à la rhodopsine, la famille B rassemble les récepteurs apparentés à celui de la Sécrétine, la famille C réuni les récepteurs proche de celui du Glutamate, la famille D comprend des récepteurs de phéromones fongiques (non humains), la famille E concerne des récepteurs de l'AMPc (non humains), et la famille F se rapporte aux récepteurs dénommés en anglais Frizzled et Smoothened (Attwood & Findlay, 1994 ; Kolakowski, 1994).

Bockaert et Pin ont proposé un autre système de classification, en cinq familles, basé sur le mode de liaison du ligand. La famille 1 réunit la majorité des RCPG liant des petits ligands, des peptides et des hormones glycoprotéiques. La famille 2 rassemble les récepteurs d'hormones peptidiques comme le glucagon, la sécrétine ou la calcitonine. La famille 3 est composée des récepteurs métabotropiques du glutamate, d'un récepteur au calcium, des récepteurs GABA et d'une sous-famille de récepteurs de phéromones des vertébrés. La famille 4 est constituée de récepteurs pour certaines phéromones reconnues pour agir sur des neurones sensoriels de l'organe vomeronasal. La famille 5 comprend des récepteurs homologues aux récepteurs Frizzled et Smoothened (Bockaert & Pin, 1998 ; Bockaert & Pin, 1999).

Plus récemment, Fredriksson et son équipe ont élaboré une classification dédiée aux RCPG humains. Basée sur une analyse phylogénétique des séquences de récepteurs du génome humain, elle sépare les RCPG en cinq groupes. Elle utilise la terminologie suivante : Glutamate (équivalent famille C ou 3), Rhodopsine (famille A ou 1), Adhésion (précédemment inclus dans la famille B ou 2), Frizzled (famille F ou 5) et Sécrétine (famille B ou 2), qui forme le système GRAFS (Fredriksson *et al.*, 2003 ; Schioth & Fredriksson, 2005).

1.2. La structure des RCPG

1.2.1. La topologie commune des RCPG tirée des analyses de séquence

Bien que les récepteurs couplés aux protéines G soient très nombreux et variés, ils possèdent tous une topologie commune (**Figure 2**). En effet, une analyse détaillée des séquences de RCPG a révélé l'existence d'une structure membranaire analogue : sept hélices α transmembranaires et hydrophobes, particulièrement bien conservées et composées chacune d'environ 25 à 35 acides aminés (Baldwin, 1993).

Ces domaines transmembranaires (souvent noté TM 1 à 7) sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) de taille variables. L'extrémité N-terminal est localisée du côté extracellulaire, tandis que l'extrémité C-terminal est située dans la région intracellulaire. Deux cystéines sont également conservées dans la plupart des RCPG, pouvant former un pont disulfure entre la première et la deuxième boucle extracellulaire. Certaines extrémités carboxy-terminales possèdent un site possible de palmitoylation, qui peut former un ancrage lipidique dans la membrane (on parle d'hélice 8, H8) et créer une quatrième boucle intracellulaire (Gether, 2000).

Par ailleurs, une forte identité de séquence des RCPG a été mise en évidence dans les segments transmembranaires, tandis que les parties hydrophiles présentent plus de divergence entre les récepteurs, notamment les extrémités amino- et carboxy-terminales et la boucle ICL3. La plus grande diversité est observée dans l'extrémité N-terminale, qui peut être relativement courte (10-50 acides aminés) pour les récepteurs des monoamines et des peptides, et beaucoup plus grande (350-600 acides aminés) pour les récepteurs d'hormones glycoprotéiques et les récepteurs de la famille glutamate (Kobilka, 2007).

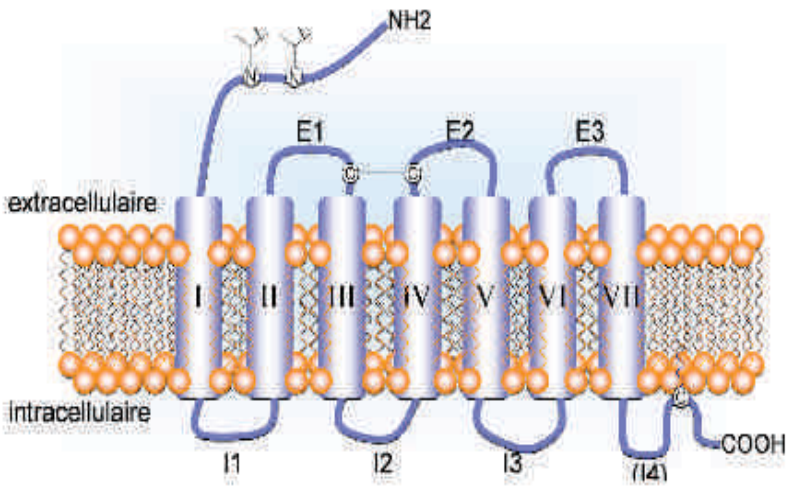


Figure 2 : Représentation schématique en deux dimensions des récepteurs couplés aux protéines G.

L'extrémité amino-terminale (NH2) extracellulaire est représentée avec deux sites de N-glycosylation. Les sept hélices α transmembranaires (I à VII) sont reliées par trois boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3) et trois boucles intracellulaires (ICL1 à ICL3). Un pont disulfure peut relier la boucle E1 à la boucle E2. L'extrémité carboxy-terminal (COOH) intracellulaire peut présenter un ancrage lipidique dans la membrane ce qui crée une 4ème boucle intracellulaire. Adapté de (Spiegel, 1996).

1.2.2. Les signatures moléculaires des RCPG tirées des structures cristallographiques

La première structure cristallographique à haute résolution d'un RCPG de classe A a été publiée en 2000. Il s'agit de la rhodopsine bovine (**Figure 3A**), un récepteur activé par la lumière (Palczewski et al., 2000). Il a ensuite fallu attendre sept ans pour que la première structure tridimensionnelle d'un RCPG non visuel soit découverte (**Figure 3B**) : celle du récepteur β2-adrénergique (Rasmussen et al., 2007). Par la suite, quinze autres RCPG ont vu leur structure cristallographique résolue entre 2008 et 2012 essentiellement pour la classe A (**Figure 4**). Très récemment, la première structure d'un RCPG déterminée par résonance magnétique nucléaire a été publiée : le récepteur de chimiokine CXCR1, (Park et al., 2012). Au total, ces douze dernières années, plus de 75 structures de 18 RCPG différents ont été déterminées (**Figure 4**), seul ou en complexe avec des ligands de pharmacologie variée (Venkatakrishnan et al., 2013).

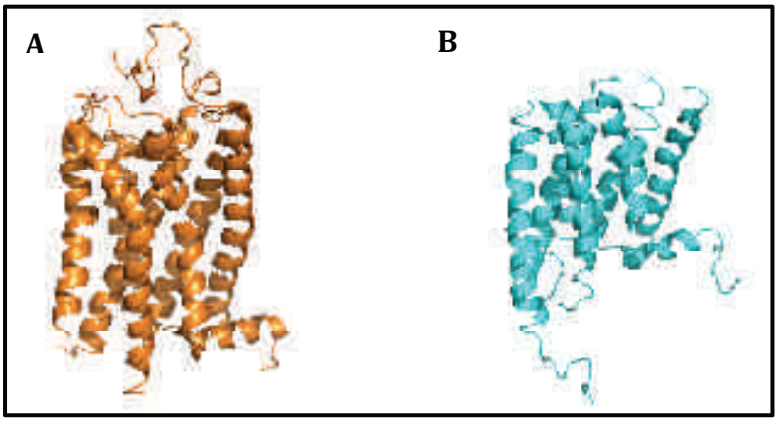


Figure 3 : Représentation des premières des structures cristallographiques de RCPG.

A : Représentation de la première structure cristallographique de la Rhodopsin bovine (PDB : 1F88).
B : Représentation de la première structure cristallographique du récepteur β2-adrénergique (PDB : 2R4R).

La résolution de ces structures tridimensionnelles a permis de confirmer la prédiction de la topologie commune mais surtout d'apporter de nouvelles informations sur la structure des RCPG au niveau moléculaire. La comparaison des structures a permis de révéler des similitudes et des différences entre les divers RCPG, dont la structure peut être divisée en trois régions principales : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire.

Concernant la région extracellulaire, les boucles ECL1 et ECL3 sont relativement courtes et présentent peu de structures secondaires, tandis que la boucle ECL2 et l'extrémité N-terminale présentent des longueurs et des structures très variables. Il semble exister deux types distincts de région extracellulaire avec une poche de fixation de ligand (i) obstruée, ce qui semble être le cas des récepteurs qui lient des ligands hydrophobes, ou (ii) exposée, ce qui concernerait les récepteurs qui lient des ligands solubles. Cette région, et particulièrement la boucle ECL2, semble impliquée dans les premières étapes de reconnaissance des ligands et aurait un rôle en terme de sélectivité.

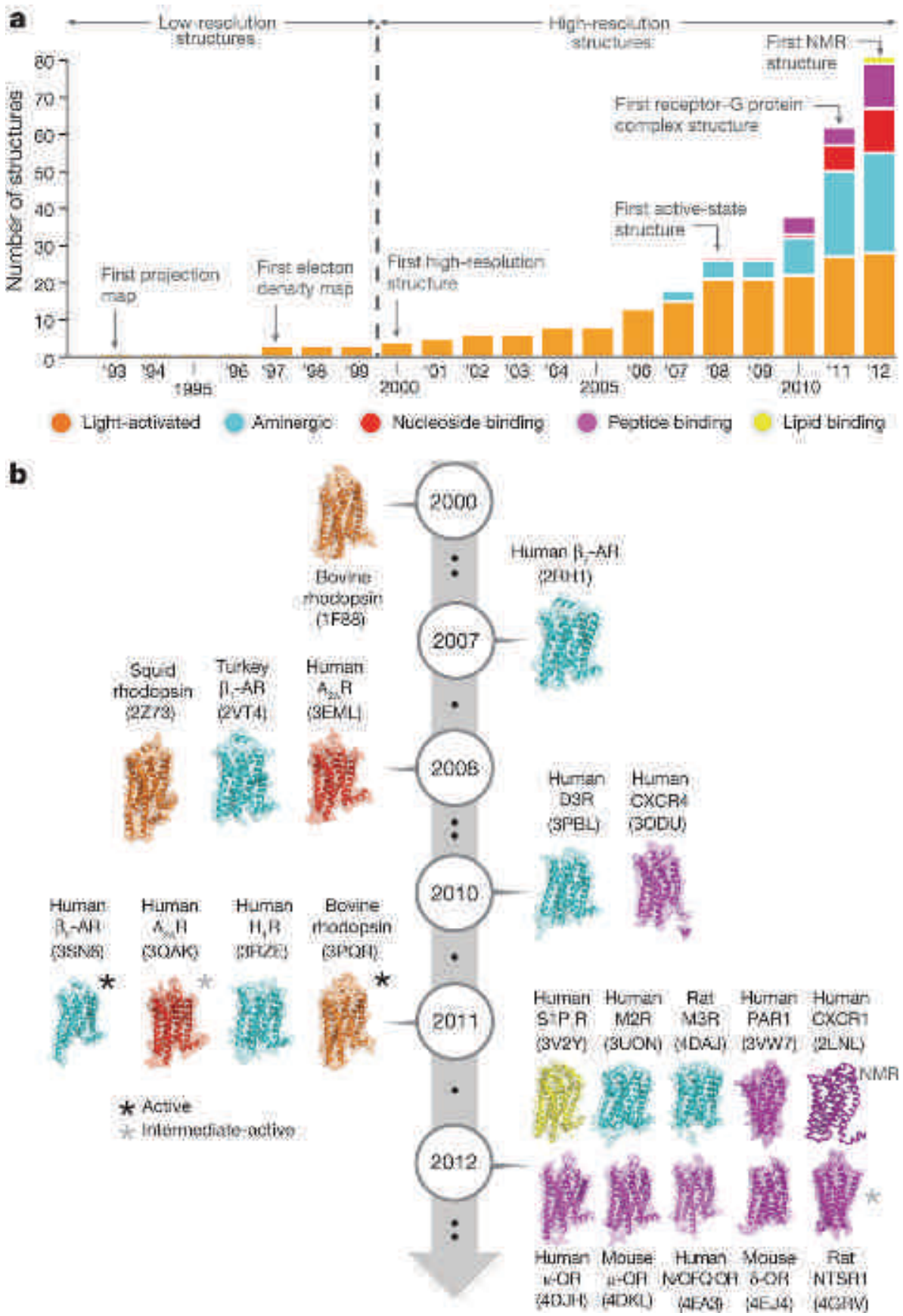


Figure 4 : Illustration des structures de RCPG résolues au cours du temps.

a : Graphique illustrant l'augmentation du nombre de structures de GPCR avec le temps.
b : Frise chronologique montrant la représentation de structures de RCPG et l'année de publication. Les conformations actives sont marquées d'un astérisque noir, et une conformation intermédiaire est marquée d'un astérisque gris. Les numéros d'accession de la Protéine Data Banque sont indiquées entre parenthèses (Venkatakrishnan et al., 2013).

La région transmembranaire qui forme le noyau structurel, montre un réseau consensus de 24 contacts entre les segments transmembranaires, médiés par 36 acides aminés topologiquement équivalents (**Figure 5**). Le TM3 notamment montre des contacts très conservés avec les TM2, TM4, TM5 et TM6 et semble avoir un rôle clé dans le maintien de la structure. De plus, la plupart des résidus en contact avec le ligand ont une topologie équivalente dans les TM3, TM6 et TM7. Ceci constituerait un motif consensus de la poche de fixation de ligand au niveau de la région transmembranaire dans presque tous les RCPG de la classe A.

Les boucles intracellulaires, l'extrémité C-terminale et les extrémités cytoplasmiques des TM sont impliquées dans la liaison avec des effecteurs, tels que les protéines G, les kinases ou les arrestines. Dans les structures disponibles, ICL1 contient typiquement six acides aminés formant un tour d'hélice, tandis que ICL2 présente soit un ou deux tours d'hélice soit un tronçon non structuré. La structure du récepteur β2-adrénergique en complexe avec une protéine G hétérotrimérique a montré une interaction entre l'ICL2 du RCPG et l'extrémité N-terminale de la sous-unité α de la protéine G. La boucle ICL3 et l'extrémité C-terminale sont des régions longues et variables et probablement intrinsèquement désordonnées dans de nombreux RCPG. Ces régions non structurées exposent des motifs peptidiques linéaires qui reconnaissent des partenaires spécifiques et permettent une régulation de leur liaison et de leur fonction (Venkatakrishnan et al., 2013).

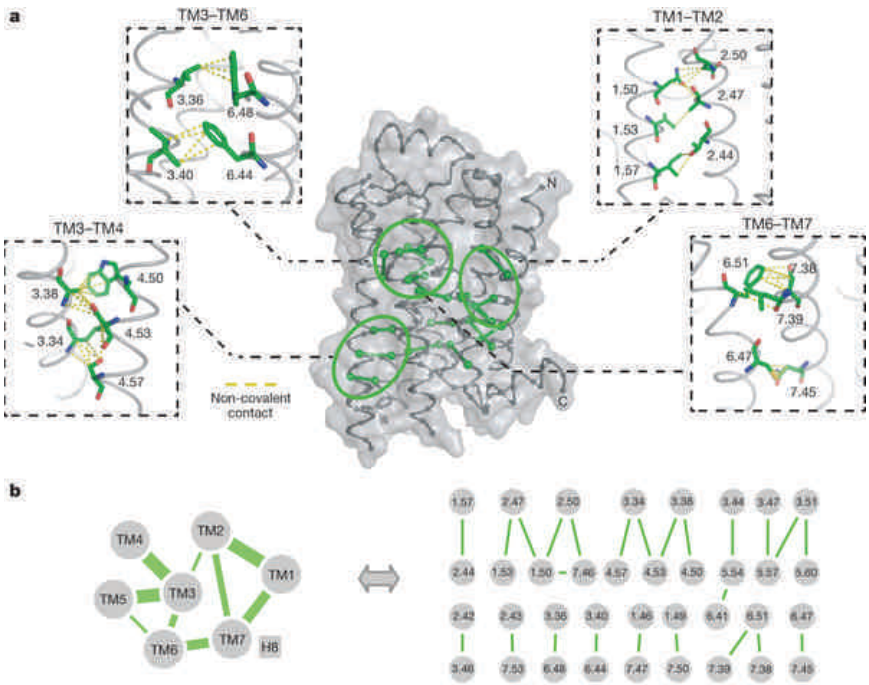


Figure 5 : Illustration du réseau consensus de contacts non-covalentes dans les RCPG.

a : Un réseau de 24 contacts entre les TM médié par 36 résidus est montré sur une structure du β1-AR. Les contacts géographiquement concentrée entre les résidus sont présentés dans les panneaux; pour maintenir une clarté visuelle, les contacts entre TM3 et TM5 ne sont pas représentés.
b : Représentation schématique du réseau de contacts (lignes vertes) entre les TM (cercles) et l'hélice H8 (carré). L'épaisseur des lignes est proportionnelle au nombre de contacts entre les TM à gauche, tandis qu'à droite, l'épaisseur est uniforme car ici une ligne indique juste la présence d'un contact et non le nombre (Venkatakrishnan *et al*., 2013).

1.3. Le mode d'action des RCPG

1.3.1. Les différentes conformations des RCPG

De nombreux RCPG possèdent une activité constitutive, correspondant à l'activité du récepteur en absence de ligand, qui peut être attribuée à la flexibilité conformationnelle inhérente au récepteur. Selon leur effet sur l'activité basale des récepteurs, les ligands sont décrits comme des agonistes complets s'ils conduisent à l'activation complète d'une voie de signalisation donnée, comme des agonistes partiels s'ils conduisent à une activation partielle, comme des antagonistes s'ils se lient au récepteur sans effet sur l'activité basale et comme des agonistes inverses, s'ils conduisent à la diminution de l'activité constitutive (**Figure 6**). Ainsi, les agonistes, complets ou partiels, stabilisent préférentiellement le récepteur dans une conformation active, tandis que les antagonistes et agonistes inverses stabilisent une conformation inactive des récepteurs (Deupi & Kobilka, 2010).

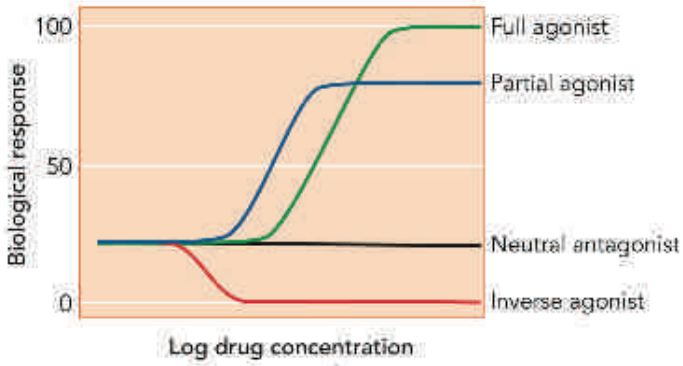


Figure 6 : Représentation schématique de l'effet pharmacologique des ligands.

Les agonistes complets activent totalement les récepteurs, les agonistes partiels ne les activent que partiellement, les antagonistes se lient aux récepteurs sans effet sur l'activité basale et les agonistes inverses diminuent l'activité basale. Adapté de (Deupi & Kobilka, 2010).

Cependant, certaines structures de récepteur lié à un agoniste sont très similaires à la conformation inactive. Ces conformations ont été proposées comme représentatives d'un état intermédiaire entre les conformations active et inactive (Lebon *et al.*, 2012). Ceci suggère que la liaison de l'agoniste n'est peut-être pas suffisante pour stabiliser les états pleinement actifs et que la liaison d'une protéine partenaire, comme la protéine G, l'arrestine ou un anticorps spécifique de la conformation active, est nécessaire pour atteindre et stabiliser l'état pleinement actif du récepteur. Les structures du récepteur β2-adrénergique liées, soit à un fragment d'anticorps de lama spécifique de la conformation active (Rasmussen *et al.*, 2011a), soit à la protéine Gs (Rasmussen *et al.*, 2011b), sont considérées comme représentatives de la conformation active d'un RCPG.

1.3.2. Le mécanisme d'activation des RCPG

Les récentes résolutions de structures tridimensionnelles des RCPG dans différentes conformations ont permis de caractériser les états actifs et inactifs des récepteurs au niveau moléculaire. Ces informations, couplées à celles obtenues par des techniques biochimiques,

biophysiques et informatiques, permettent de donner des indications sur les processus dynamiques et le mécanisme d'activation des RCPG de la classe A. En effet, l'activation du récepteur, qui implique la liaison d'un ligand agoniste dans le site de fixation, induit des changements de conformation correspondant à des mouvements des différents segments transmembranaires (**Figure 7**). Ces changements conformationnels sont de petite amplitude au niveau de la poche de fixation de l'agoniste mais conduisent finalement à de plus grands réarrangements structuraux dans la partie intracellulaire, facilitant ainsi la liaison à des effecteurs cytoplasmiques.

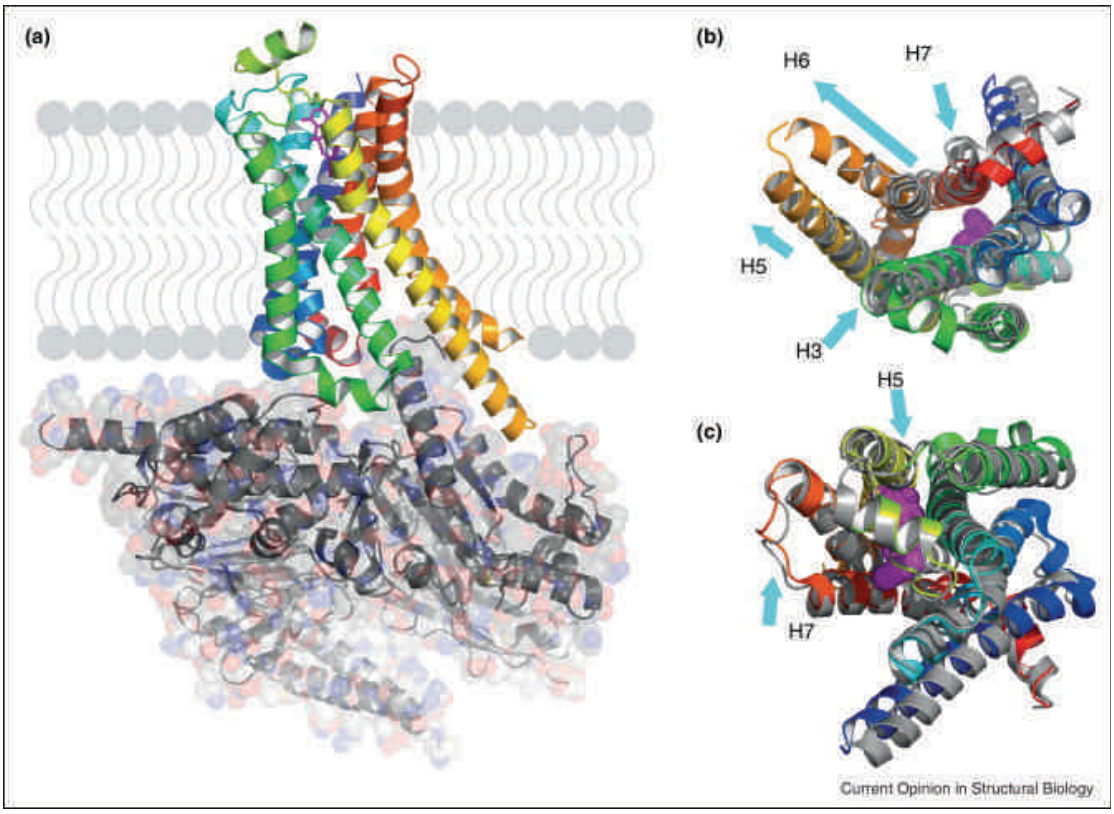


Figure 7 : Illustration du mécanisme d'activation des RCPG.

(a) Structure du récepteur adrénergique β2 en complexe avec la protéine Gs et le nanobody NB35. Le β2AR est en représentation cartoon avec la surface extracellulaire en haut de la figure (PDB ID 3SN6). L'agoniste BI-167107 est en représentation bâton (magenta). Le complexe protéine Gs-NB35 est représenté à la fois en ruban et en modèle d'espace de remplissage. La bicouche lipidique est schématisée en gris afin de faciliter la visualisation. Le repositionnement de l'hélice 6 ouvre une cavité dans laquelle l'extrémité C-terminale de la sous-unité α (gris foncé) vient s'arrimer.
(b) et **(c)** le β2AR est en représentation cartoon, la conformation active en couleur est superposée avec la conformation inactive en gris (structure du β2AR lié à l'agoniste inverse carazolol). Vue de la surface intracellulaire **(b)** ou de la surface extracellulaire **(c)**, avec des flèches (bleu) représentant le changement conformationnel β2AR subit lors de liaison agoniste et le couplage à une protéine G (Lebon *et al*., 2012).

Tout d'abord, la fixation d'un ligand agoniste induit la contraction de la poche de fixation du récepteur d'environ 1 Å, ce qui représente la première étape de l'activation du récepteur. Ensuite, les extrémités intracellulaires des TM3 et TM7 et l'extrémité extracellulaire du TM5 sont repositionnées vers l'intérieur du récepteur. Ces différents réarrangements locaux sont accompagnés d'un mouvement des extrémités intracellulaires des TM5 et TM6. Il y a notamment une rotation du

TM6, qui, en s'écartant du récepteur, ouvre ainsi une cavité dans laquelle l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité α de la protéine G vient s'arrimer. Le mouvement de l'hélice 6 est variable, allant de 5 Å dans le cas de la structure du récepteur de l'adénosine A2A lié à son agoniste, jusqu'à 14 Å pour la structure du β2-adrénergique lié à la protéine Gs. L'hélice α5 de la sous-unité alpha de la protéine Gs interagit avec le récepteur β2-adrénergique au niveau de l'arginine du motif conservé E/DRY du TM3. Cette interaction est stabilisée par une tyrosine appartenant au motif NPxxY du TM7. Ceci confirme l'importance de ces deux motifs conservés (E/DRY et NPxxY) pour le couplage des RCPG avec la protéine Gs (Deupi & Standfuss, 2011 ; Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

1.3.3. L'activation de la protéine G

La protéine G est un hétérotrimère constitué des trois sous-unités Gα, Gβ et Gγ (**Figure 8**). La sous-unité α comprend elle-même deux domaines appelés le domaine en hélice et le domaine GTPasique. La complexité et la spécificité de réponse dépendent en partie de la diversité des sous-unités des protéines G. De nombreuses sous-unités ont été clonées, dont 28 sous-unités α (produits de 16 gènes et variants d'épissage), 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ. Ces différentes isoformes peuvent s'assembler dans diverses combinaisons pour former une multitude de différents complexes trimériques Gαβγ. Classiquement, les protéines G sont réparties en quatre familles basées sur la similarité de leur sous-unité α : $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{s}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$. Les $G\alpha_{i/o}$ sont connues pour inhiber l'adénylate cyclase, tandis que les $G\alpha_{s}$ l'active, les $G\alpha_{q/11}$ sont connues pour activer la phospholipase C et les $G\alpha_{12/13}$ pour activer les facteurs d'échange de guanine GEFs (Pierce *et al.*, 2002).

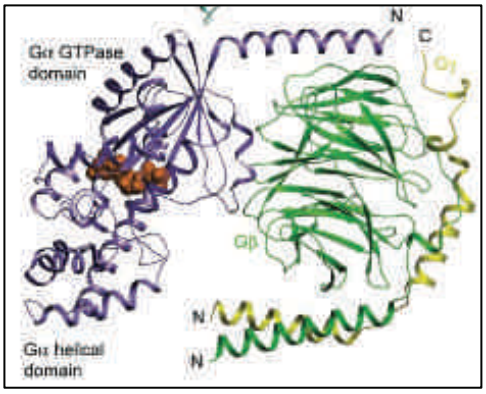


Figure 8 : Représentation de la structure d'une protéine G hétérotrimérique.

La protéine G est constituée de trois sous-unités : Gα (enviolet), Gβ (en vert) et Gγ (en jaune). La sous unité Gα est composée de deux domaines : le domaine GTPasique et le domaine en hélice. Une molécule de GDP est représentée en rouge en sphère de Van der Waals. Adapté de (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

Selon le model classique (**Figure 9**), l'activation d'un RCPG, suite à la fixation d'un ligand agoniste, induit des changements de conformation qui favorisent le couplage à une protéine G. A l'état inactif, celle-ci est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate) au niveau du domaine GTPasique de la sous-unité α. L'association du récepteur à la protéine G conduit à des

changements de conformation de celle-ci, notamment un déplacement du domaine en hélice de la sous-unité α, qui vont activer la protéine G. Cette activation se traduit par un échange du GDP, qui est relargué, au profit d'une molécule de GTP (guanosine triphosphate), en concentration supérieure dans le milieu cellulaire. Ceci engendre la dissociation du trimère en deux entités, la sous-unité α d'un côté et le dimère βγ de l'autre. Chacun de ces sous-ensembles va réguler positivement ou négativement une série d'effecteurs. Ensuite, l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α hydrolyse le GTP en GDP, permettant la réassociation du trimère αβγ et un retour à l'état initial inactif (Hermans, 2003). Toutefois, des études ont montré que l'hydrolyse du GTP par l'activité intrinsèque de la sous-unité α purifiée était trop lente pour rendre compte des vitesses de désactivation des effecteurs. Ceci suggérait qu'il devait exister des protéines qui accéléraient le processus. C'est ainsi que par la suite des protéines RGS pour « Regulator of G-protein Signaling », ont été identifiées (Milligan & Kostenis, 2006).

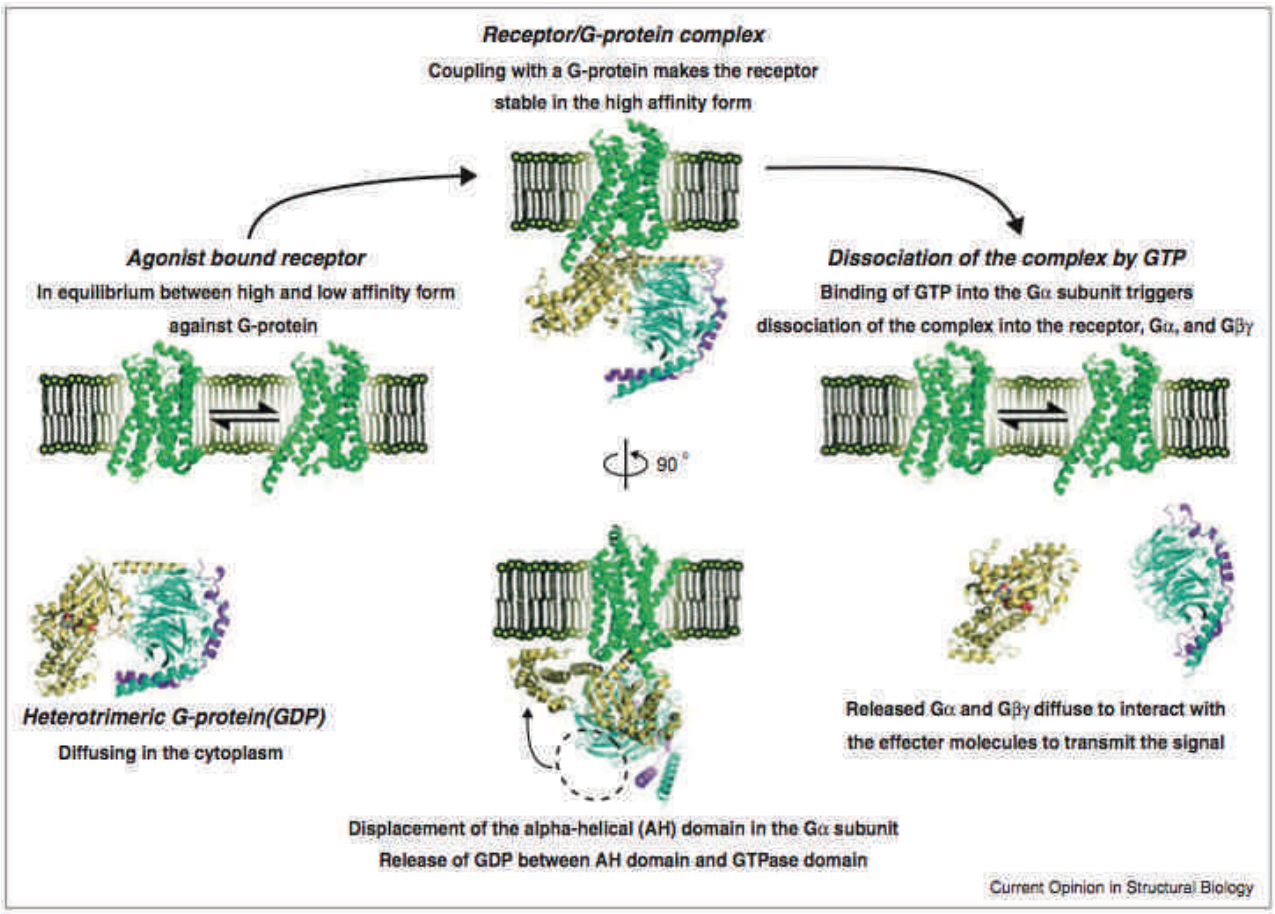


Figure 9 : Représentation de la séquence d'activation de la protéine G par un récepteur lié à un agoniste.

Représentation du changement de conformation global d'un RCPG suite à la fixation d'un agoniste, puis du couplage d'un RCPG à une protéine G avec la mise en évidence du déplacement de l'hélice α de la protéine G qui induit l'échange du GDP avec du GTP et finalement de la dissociation de la sous-unité α et du dimère βγ (Maeda & Schertler, 2013).

1.3.4. La transduction du signal

Au cours de ce cycle d'activation de la protéine G, la dissociation du trimère permet à la sous-unité α ainsi qu'au dimère βγ de réguler positivement ou négativement de nombreux effecteurs, tels que des phospholipases, des adénylate cyclases, des phosphodiestérases, des kinases ou encore des canaux ioniques. Ces effecteurs activent ou inhibent la production de second messagers, comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), le diacylglycérol (DAG), l'inositol triphosphate (IP_3), les acides arachidonique et phosphatidiques… Ces seconds messagers vont à leur tour induire d'autres cascades d'événement qui vont permettre la génération d'une réponse cellulaire appropriée.

Les deux voies de transduction les mieux caractérisées sont celle de l'adenylate cyclase et de la phospholipase C (**Figure 10**). L'adénylate cyclase catalyse la réaction de formation de l'AMPc à partir d'ATP (adénosine triphosphate). Cet AMPc est l'activateur de la protéine kinase A (PKA), capable de phosphoryler de nombreux substrats protéiques, modulant ainsi leur activité. La phospholipase C est une enzyme catalysant la réaction d'hydrolyse du PIP_2 (phosphatidyl inositol bis-phosphate) en IP_3 et DAG. L'IP_3 est un messager secondaire qui agit au niveau de récepteurs spécifiques, situés à la membrane de compartiments intracellulaires, entraînant un relargage des ions calcium (Ca^{2+}) contenus à l'intérieur. Le DAG quant à lui, active la protéine kinase C (PKC) qui, comme la protéine kinase A, est capable de phosphoryler des protéines, afin d'en moduler l'activité (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

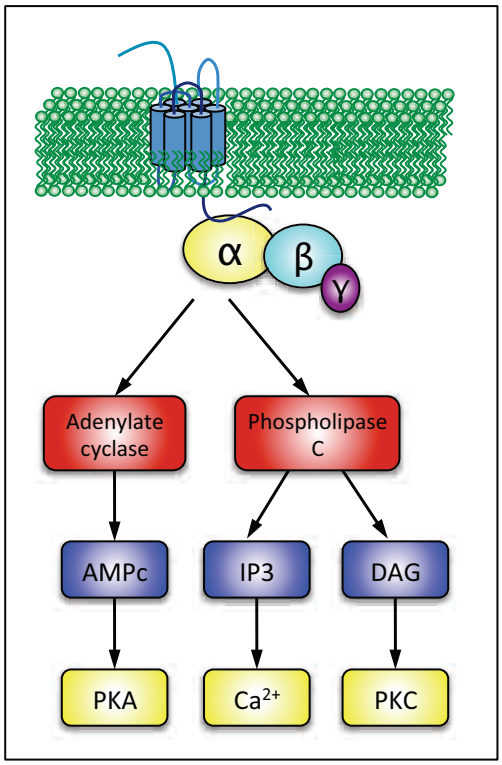


Figure 10 : Représentation schématique des deux principales voies de tranduction des protéines G.

Cependant, il existe de nombreuses autres voies de signalisation, médiées par les diverses protéines G, effecteurs et seconds messagers, qui permettent de générer une réponse cellulaire finement et spécifiquement adaptée. Mais la signalisation des RCPG s'avère être encore plus complexe. En effet, il a été mis en évidence que les RCPG peuvent non seulement engager plusieurs protéines G distinctes, mais aussi recruter des protéines partenaires, membranaires ou intracellulaires, appelées les GIPs pour GPCR-Interacting Protein. Ces protéines contiennent des domaines d'interaction structurelle, qui permettent la formation de grands complexes multi-protéiques fonctionnels impliqués dans la régulation des voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, il a été mis en évidence que la β-Arrestine, qui est une protéine soluble connue pour être impliquée dans la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs, est également impliquée dans la transduction du signal (Bockaert *et al.*, 2010). D'autre part, nous savons maintenant qu'un ligand peut être un agoniste pour une voie de signalisation, tout en étant un agoniste inverse pour une autre voie engagée par le même récepteur. Les RCPG peuvent donc adopter plusieurs conformations actives différentes, qui présentent plus ou moins d'affinité pour diverses voies de signalisation (Zheng *et al*., 2010). De plus, les RCPG peuvent également s'associer en dimères, voire oligomères, formant une nouvelle structure moléculaire, qui va influer sur l'efficacité de couplage ou favoriser une voie signalisation par rapport à une autre et induire une signalisation cellulaire différente et spécifique d'un contexte donné (Smith & Milligan, 2010). Ainsi, par la mise en œuvre de voies de signalisation préférentielles, les RCPG peuvent être responsables d'une sélectivité fonctionnelle, aussi appelée signalisation biaisée.

2. L'intérêt de l'étude des RCPG

2.1. Importance physiologique et thérapeutique des RCPG

Acteurs centraux dans l'élaboration des réponses cellulaires à de nombreux stimuli, les RCPG sont au cœur de processus physiologiques aussi variés que la vision, l'olfaction, le goût, le chimiotactisme, la prolifération et différenciation cellulaire, la neurotransmission, l'angiogenèse, la douleur, l'entrée cellulaire de certains virus et bactéries... Par conséquent, l'altération du fonctionnement des RCPG peut provoquer des dérèglements physiologiques et entrainer un certain nombre de maladies (**Tableau 1**) telles que la dépression, la schizophrénie, la psychose, la migraine, l'hypertension, l'obésité, les ulcères, les allergies, l'asthme ou encore le cancer (Bond & Ijzerman, 2006 ; Insel *et al.*, 2007 ; Markovic & Challiss, 2009).

Récepteur	Polymorphismes	Exemples de maladies associées
Récepteur adrénergique β_1	Arg389Gly	Insuffisance cardiaque
Récepteur adrénergique β_2	Multiple	Hypertension, Asthme
Récepteur adrénergique β_3	Trp64Arg	Obésité
Récepteur de chimiokine 2 (CCR2)	Val64Ile	Progression retardée du SIDA
Récepteur de chimiokine 5 (CCR5)	Multiple	Associé à la progression du SIDA
Récepteur dopaminergique 2 (D_2)	3'UTR52A/G	Associé à la dépression et l'anxiété
Récepteur dopaminergique 3 (D_3)	Ser9Gly, Promoteur SNPs	Haplotype associé à la schizophrénie
Récepteur muscarinique 3 (M_3)	Promoteur haplotype	Possible association à l'asthme et l'atopie
Récepteur de neuropeptide S (NPSR)	Haplotypes H1, H5, Asn107Ile	Sensibilité à l'asthme
Récepteur purinergique $P2Y_{12}$	CA délétion au codon 240	Associé à la diathèse hémorragique

Tableau 1 : Exemples de polymorphismes des RCPG associés à des maladies humaines.

Ce tableau présente des exemples de variants de séquences, identifiés dans les gènes de RCPG humains, associés à des maladies. Adapté de (Insel *et al*., 2007).

Il n'est donc pas surprenant que 30% des médicaments actuellement sur le marché ciblent des RCPG (Overington *et al.*, 2006). En effet, parmi les 100 médicaments les plus vendus, 25 d'entre eux ciblent la grande famille des RCPG, ce qui entraîne des ventes annuelles mondiales dépassant les 30 milliards de dollars en 2000 (**Tableau 2**). Cependant, seule une quarantaine de RCPG sont ciblés par ces médicaments. Compte tenu de la grande diversité des RCPG, il reste un énorme potentiel pour le développement de nouveaux médicaments. Ainsi, l'étude des RCPG n'a pas seulement un intérêt pour la biologie fondamentale, mais détient également un grand potentiel en terme de santé publique (Lagerstrom & Schioth, 2008).

Action	Nom commercial	Entité Moléculaire	Entreprise	Indication Thérapeutique	Ventes mondiales [$ millions]
antagoniste H_1	Allegra/ Telfast®	fexofénadine	Sanofi–Aventis	allergies	1792
antagoniste AT_1	Diovan®	valsartan	Novartis	hypertension	2214
antagoniste H_2	Gaster®	famotidine	Yamanouchi	ulcère gastrique	656
agoniste $5HT_{1D}$	Imigran®	sumatriptan	GlaxoSmithKline	migraine	1454
agoniste LH-RH	Leuplin/ Lupron®	leuproréline	Takeda/Abbott	cancer	904
agoniste $GABA_B$	Neurontin®	gabapentine	Pfizer	douleur neurologique	2480
antagoniste $P2Y_{12}$	Plavix®	clopidogrel	Bristol–Myers Squibb	AVC	5277
antagoniste $5HT_2/D_2$	Risperdal®	rispéridone	Johnson & Johnson	schizophrénie	371
agoniste β_1	Serevent®	salmétérol	GlaxoSmithKline	asthme	679
antagoniste $5HT_2/D_1/D_2$	Zyprexa®	olanzapine	Elli Lilly	schizophrénie	4905

Tableau 2 : Exemples de médicaments les plus vendus ciblant des RCPG.

Les médicaments ciblant les RCPG couvrent plusieurs indications thérapeutiques et représentent une part importante des médicaments commercialisés aujourd'hui. Ce tableau présente les ventes mondiales de certains médicaments pour l'année 2005. Adapté de (Jacoby *et al*., 2006).

2.2. La recherche pharmaceutique sur les RCPG

Les programmes de recherche de l'industrie pharmaceutique reposent principalement sur une combinaison de criblages à haut débit et d'essais cellulaires visant à explorer le fonctionnement des RCPG dans leur environnement cellulaire, à déterminer la fonction de récepteurs orphelins, ou encore à identifier de nouveaux ligands.

2.2.1. Le processus de découverte de médicament

Dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments ciblant les RCPG, l'objectif est d'identifier des molécules qui vont se lier de manière spécifique aux récepteurs. En fonction de leur effet, elles pourront être utilisées comme des molécules thérapeutiques pour activer, moduler ou simplement bloquer une voie de signalisation. Chronologiquement, après avoir identifié une cible thérapeutique pertinente, des chimiothèques constituées de petites molécules représentant une large diversité chimique sont criblées afin d'identifier des composés capables de se lier au récepteur ciblé (**Figure 11**). Le criblage primaire constitue l'étape clé dont dépend le succès de l'approche puisqu'il doit permettre, en un seul test, d'identifier des composés actifs au sens large, tout en restant suffisamment sélectif pour éviter un nombre trop élevé de composés (idéalement 1 à 5 % du nombre total de composés). À l'issue du criblage primaire, le nombre de composés d'intérêt est largement diminué, permettant cette fois de réaliser une exploration fonctionnelle plus fine pour éliminer les faux positifs et les composés non spécifiques du RCPG ciblé. Un travail de classement des composés, sur la base de leur structure chimique et de leurs propriétés *in vitro*, vise ensuite à identifier des ébauches de relations structure-fonction. Celui-ci est suivi par un travail de chimie médicinale, qui a pour objectif d'améliorer les paramètres de solubilité, de capacité à entrer dans la cellule, de puissance, de sélectivité, de pharmacocinétique, de toxicité et d'adressage à la cible. Des études précliniques approfondies *in vitro* et dans des modèles animaux sont ensuite effectuées pour tester l'innocuité et l'efficacité de ces composés optimisés pour sélectionner ceux qui peuvent entrer en essais cliniques (Silber, 2010).

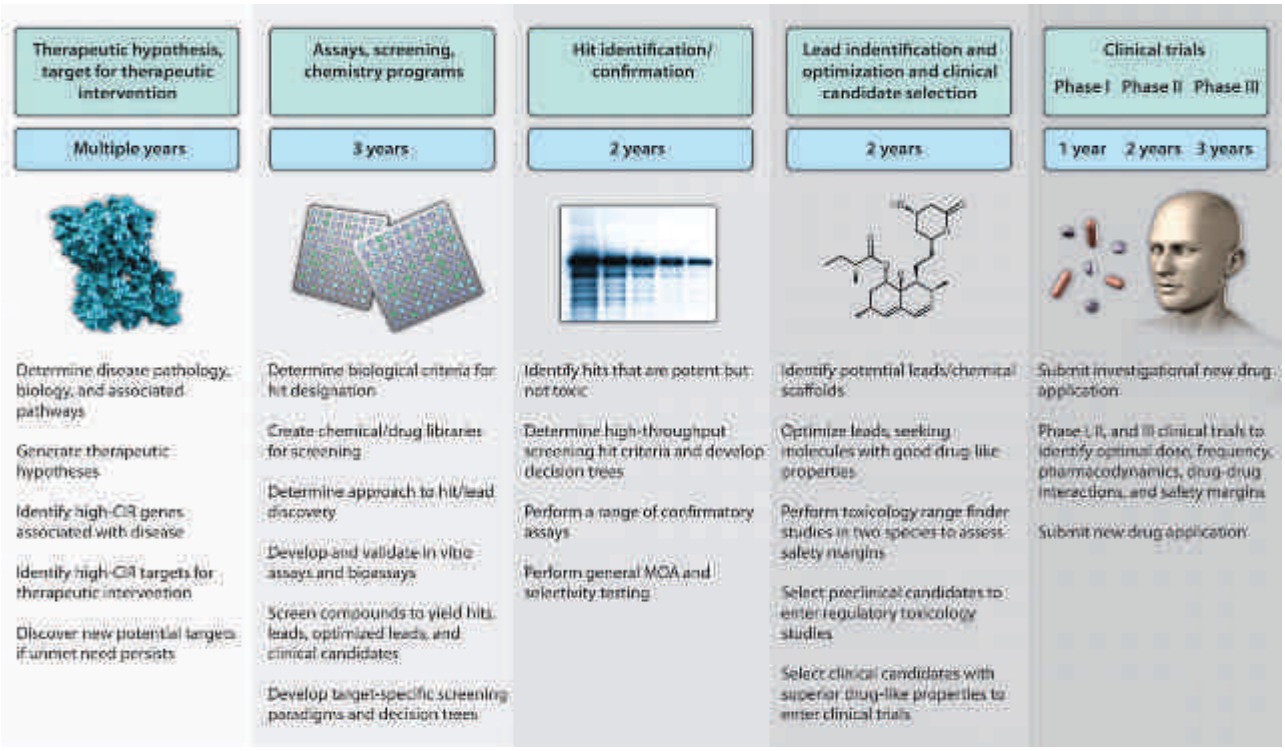


Figure 11 : Illustration du processus de découverte de médicament.

Cette illustration représente les différentes étapes du processus de la découverte de médicaments (Silber, 2010).

2.2.2. Les techniques de criblage des molécules

Pour la recherche de nouveaux ligands ciblant les RCPG, différents types d'essais peuvent être utilisés pour le criblage à haut débit. Parmi les plus courant, on retrouve les tests de fixation de ligand au récepteur, mis en évidence par le déplacement de molécules radiomarquées utilisant la séparation sur filtre ou la SPA (scintillation proximity assay). Il existe plusieurs tests fonctionnels basés sur l'activation de la protéine G, comme le test de fixation de GTPγS (radioactif ou fluorescent) qui mesurent l'échange du GDP avec du GTP, ou les dosages d'effecteurs secondaires comme l'AMPc, l'IP_3, le calcium, qui dépendent du type de protéine G couplée (Gs, Gi, Gq). D'autres tests fonctionnels sont indépendants de la protéine G, comme les expériences d'internalisation de récepteur ou de recrutement de la β-arrestine (Zhang & Xie, 2012).

En plus des stratégies classiques de criblages biochimiques et cellulaires, la recherche de molécules thérapeutiques est de plus en plus complétée par des méthodes de criblage virtuel (*in silico*). La combinaison de ces deux approches permet de diminuer le temps et le coût, en réduisant le nombre de composés à tester expérimentalement, et d'augmenter la probabilité d'identifier de nouveaux composés. Le criblage virtuel nécessite de connaitre les structures tridimensionnelles des ligands et des protéines, obtenues expérimentalement ou grâce à la modélisation par homologie, et utilise des modèles mathématiques pour simuler leur interaction. Ce type d'approche a déjà été

appliqué avec succès pour la découverte de nouvelles molécules agissant sur des RCPG (Shoichet & Kobilka, 2012).

Bien que des molécules thérapeutiques aient été développées avec succès par la recherche pharmaceutique, de nombreux médicaments ont des effets secondaires indésirables *in vivo*. Les phénomènes de sélectivité fonctionnelle offrent de nouvelles opportunités pour le développement de médicaments plus spécifiques, qui favoriserait une voie de signalisation associée à un effet thérapeutique tout en bloquant une voie de signalisation indésirable associée à des effets secondaires. Néanmoins, ce phénomène de sélectivité fonctionnelle pose de nouveaux défis pour la compréhension de la signalisation cellulaire (Zheng *et al*., 2010).

2.3. L'intérêt des études *in vitro*

Les études *in vitro*, basées sur l'utilisation de matériel protéique purifié, permettent de simplifier le système d'étude et d'apporter des informations complémentaires aux techniques de criblage traditionnellement utilisées par la recherche pharmaceutique. Elles ouvrent de nouvelles voies pour l'identification de partenaires d'interaction, la détermination du comportement des récepteurs dans différents environnements modèles mais aussi pour la découverte de médicaments et des applications de diagnostique.

2.3.1. Un environnement expérimental controlé

L'activité des RCPG étant modulée par de nombreux facteurs, à la fois extracellulaires, intracellulaires et membranaires, selon des interactions et des mécanismes complexes, il est souvent difficile d'interpréter clairement les résultats expérimentaux obtenus dans un contexte cellulaire (bruits de fond élevés, artefacts liés à des interactions peu ou non spécifiques, complexité des mécanismes de signalisation, variations en fonction des lignées cellulaires utilisées...). Une alternative particulièrement intéressante consiste à explorer des méthodes d'analyse biochimiques et biophysiques basées sur l'utilisation de matériel protéique purifié. En effet, les études *in vitro*, utilisant des protéines purifiées, permettent de travailler dans un environnement expérimental contrôlé, dans lequel on peut choisir d'ajouter, ou non, des partenaires d'interaction spécifiques. Ainsi, on peut simplifier le système d'étude et analyser des voies de signalisation indépendamment les unes des autres.

2.3.2. Des informations sur les RCPG eux-mêmes

Certaines méthodes biophysiques permettent d'obtenir des informations sur l'identité, l'homogénéité, le repliement, la dynamique et la structure des RCPG.

La spectrométrie de masse, par exemple, permet de détecter et identifier des molécules, y compris les protéines. Cette technique peut être utilisée pour vérifier l'identité des protéines purifiées, comme cela a été fait avec le récepteur de l'histamine H1 pour lequel plus de 80 % de la séquence a été couverte (Sansuk *et al*., 2008) ou le récepteur de canabinoïdes CB1 pour lequel le recouvrement de séquence était supérieur à 94% (Zvonok *et al*., 2010).

Des informations sur l'homogénéité, la taille et l'état d'oligomérisation des protéines peuvent être obtenues par la diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) (**Figure 12**) ou la microscopie électronique. Par exemple, le récepteur de la neurotensine NTS1 reconstitué en nanodisques a été analysé par DLS afin de vérifier que la préparation était homogène et que la taille des particules correspondait bien à celle attendue pour l'incorporation de monomère (Inagaki *et al.*, 2012). Une étude en DLS du récepteur purifié de l'α-facteur Ste2p de la levure *S. cerevisiae* a montré une augmentation de la taille et de la polydispersité des particules en présence de l'α-facteur, indiquant une probable oligomérisation induite par le ligand (Shi *et al.*, 2009). Une observation en microscopie électronique à coloration négative a montré que la Rhodopsine solubilisée en détergent DM (n-Decyl-β-D-Maltopyranoside) était présente sous forme de dimère de façon homogène (Suda *et al.*, 2004).

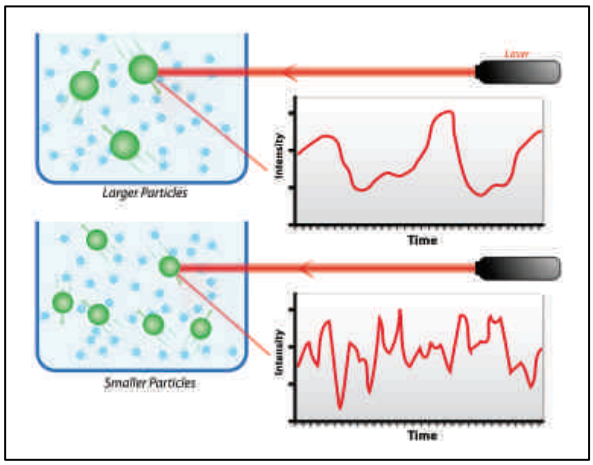


Figure 12 : Représentation schématique du principe de la diffusion dynamique de la lumière.

La lumière diffusée par les particules est mesurée au cours du temps. Pour les grosses particules peu mobiles l'intensité diffusée varie moins vite au cours du temps que pour les petites particules plus mobiles. Le traitement mathétique de ces données permet d'obtenir des informations sur la taile (rayon hydrodynamique) et la polydispersité des particules.

Le dichroïsme circulaire donne des informations sur le repliement des protéines par l'établissement d'un spectre de forme caractéristique pour les trois structures secondaires retrouvées dans les protéines : l'hélice, le feuillet et la forme aléatoire (**Figure 13**). On peut ainsi déterminer si la protéine est correctement repliée en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve. Une étude par dichroïsme circulaire du récepteur de l'adénosine A2A purifié a ainsi montré qu'en présence de détergent DDM (n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside) seul les protéines n'était pas correctement repliées tandis que la combinaison des détergents DDM et Chaps (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate) et d'un analogue du cholestérol

(cholesteryl hemisuccinate) permettait de maintenir le bon repliement de ces récepteurs (O'Malley *et al*., 2007).

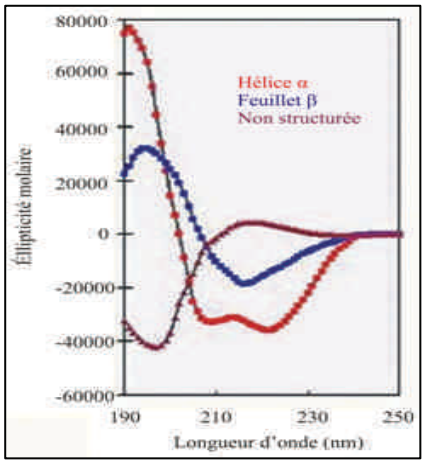


Figure 13 : Illustration des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des trois structures secondaires retrouvés dans les protéines.

Des études de stabilités thermiques permettent d'évaluer la stabilité des protéines soumises à des températures croissantes et de mesurer leur point de fusion (Tm), c'est-à-dire la température à laquelle 50 % de la protéine est dénaturée (**Figure 14**). La dénaturation des protéines peut-être suivie par dichroïsme circulaire, par mesure de la fluorescence intrinsèque ou à l'aide d'une sonde fluorescente. La sonde CPM (N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide) a été utilisée pour évaluer la stabilité du récepteur de l'apeline en fonction de l'environnement dans lequel il se trouvait (tampon, sels, pH, détergent, glycérol) (Alexandrov *et al*., 2008). Cette sonde, ainsi que la fluorescence intrinsèque, ont été employées pour observer l'effet de molécules, tels que des ligands ou des lipides, sur la stabilité du récepteur β2-adrénergique (Liu *et al*., 2010). Une autre étude a comparé les Tm mesurés par dichroïsme circulaire et par mesure de la fluorescence émise par la sonde CPM sur le récepteur A2A en absence ou en présence de ligands. Ceci a mis en évidence que la sonde CPM mesure des Tm globalement moins élevés, car elle mesure le dépliement des structures tertiaires, qui se produit avant la dénaturation des structures secondaires, mesurée par dichroïsme circulaire (O'Malley *et al*., 2010).

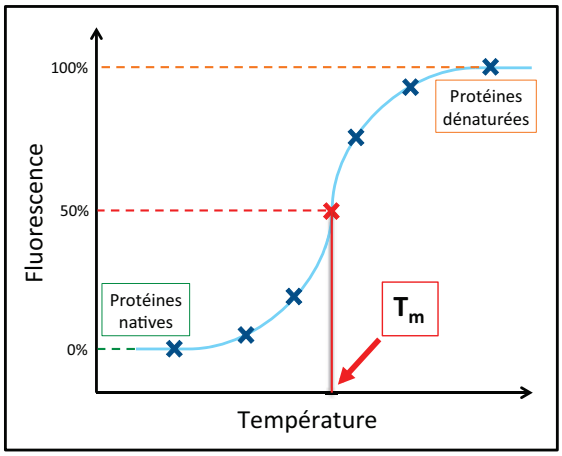


Figure 14 : Représentation schématique du principe des tests de thermostabilité basés sur la fluorescence.

L'augmentation de la température provoque une dénaturation progressive des protéines qui est suivie par la variation de la fluorescence. Ceci permet de déterminer le Tm des protéines, c'est à dire la température à laquelle 50% des protéines sont dénaturées. Plus le Tm mesuré des protéines est élevé plus elles sont stables.

La structure tridimensionnelle des protéines peut être obtenue grâce à des techniques, telles que la diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui donnent des informations à l'échelle moléculaire, voire atomique. Ainsi, les structures de 18 RCPG différents ont pu être résolues ces dernières années, dont 17 par diffraction des rayons X et une par RMN. L'analyse de ces structures a permis de déterminer l'organisation des différents domaines les uns par rapport aux autres, leurs rôles et les résidus impliqués. La comparaison des structures a permis de mettre en évidence des similitudes et des différences et ainsi d'identifier des signatures moléculaires (Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

2.3.3. L'identification de nouveaux partenaires d'interaction

Les RCPG interagissent avec une multitude de protéines qui peuvent être impliquées dans la signalisation intracellulaire, la désensibilisation, l'internalisation, le trafic ou encore la localisation subcellulaire des récepteurs. Ces protéines interagissent directement ou indirectement, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, avec la région intracellulaire des récepteurs pouvant former des complexes multi-protéiques. L'identification de ces protéines d'interaction est donc essentielle pour la compréhension du fonctionnement des RCPG. De plus, ces partenaires peuvent aussi être utilisés comme outils de stabilisation des récepteurs pour la cristallisation des protéines. En effet, les RCPG sont des protéines très flexibles et instables et l'interaction avec des partenaires, notamment au niveau des régions les plus flexibles, peut permettre d'immobiliser les récepteurs dans des complexes protéiques plus stables. Plusieurs approches *in vitro* peuvent être employées pour identifier les protéines d'interaction naturelles des RCPG.

Pendant longtemps, l'identification de nouveaux partenaires d'interaction n'utilisait que des sous-domaines solubles de RCPG, généralement l'extrémité C-terminale, pour contourner la difficulté de purifier des RCPG entiers. Par exemple, la technique de double-hybride (**Figure 15 A**), qui emploie ce type d'approche pour cribler des banques d'ADNc, a permis de détecter des partenaires d'interaction directs pour un grand nombre de RCPG (Diviani *et al.*, 2003 ; Simonin *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2006 ; Milojevic *et al.*, 2006 ; De Martelaere *et al.*, 2007 ; Guillaume *et al.*, 2008). Des puces à protéines (**Figure 15 C**) ont aussi été conçues pour détecter des protéines qui interagissent directement avec l'extrémité C-terminale de GPCR (Heydorn *et al.*, 2004 ; Fam *et al.*, 2005 ; Paquet *et al.*, 2006 ; Stiffler *et al.*, 2007). Des approches basées sur la chromatographie d'affinité d'extrémité C-terminale fusionnée à une étiquette (**Figure 15 B**) ont permis d'isoler des complexes d'interaction issus de lysat cellulaire. Ces complexes protéiques ont ensuite été séparés par électrophorèse bidimensionnelle et identifiés par spectrométrie de masse. Cette méthode a été employée avec succès avec une étiquette GST (glutathion-S-transférase) pour le récepteur de la

sérotonine 5HT2C (Becamel *et al.*, 2002) ou avec une étiquette 6-histidines pour les récepteur de la mélatonine MT1 et MT2 (Maurice *et al.*, 2008). Cependant, l'utilisation de sous-domaines solubles de RCPG présente des limitations. En effet, la liaison de protéines interagissant avec des RCPG peut dépendre de la présence de plusieurs sous-domaines ou de déterminants conformationnels qui ne sont pas fournis par un seul sous-domaine.

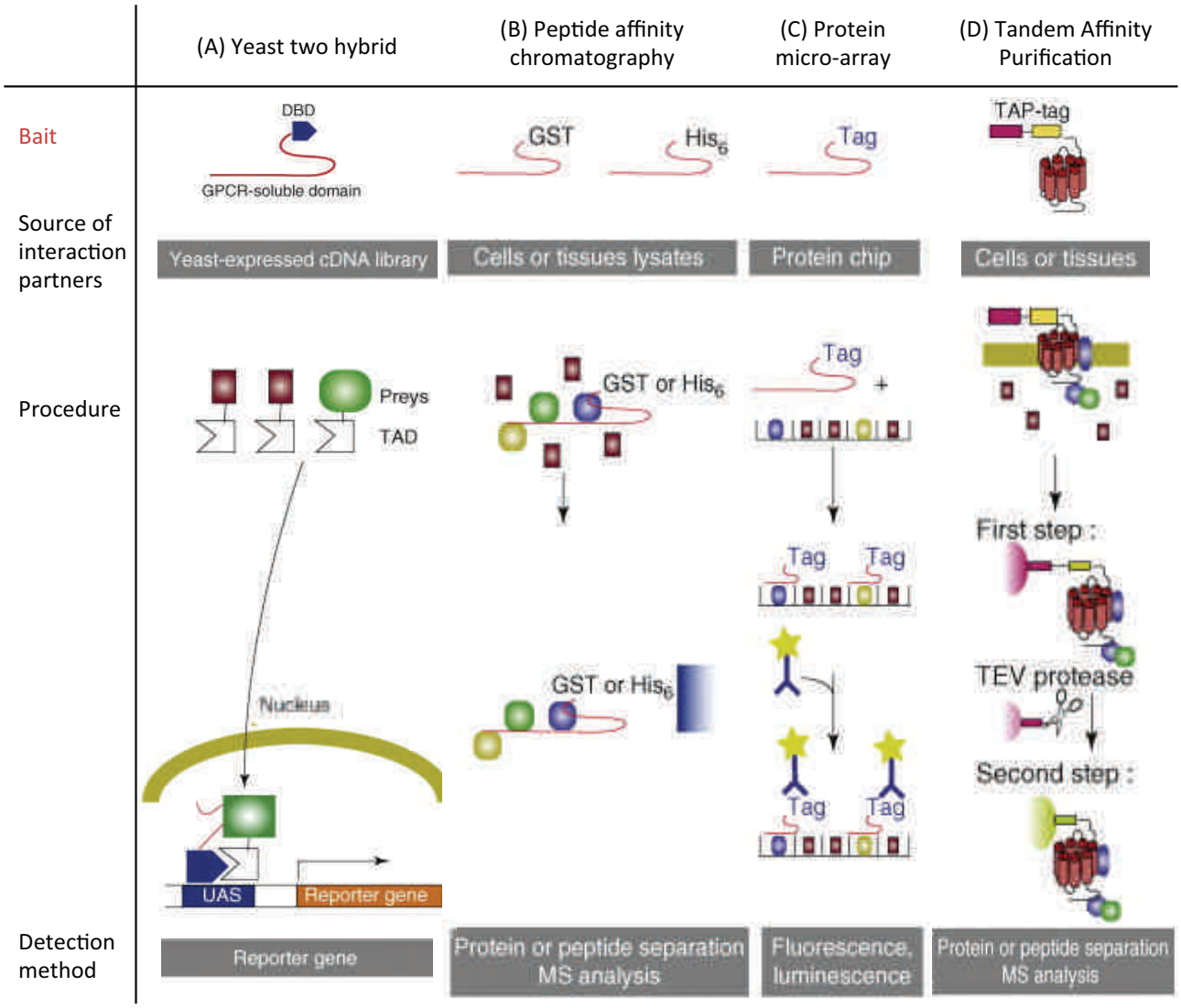


Figure 15 : Représentation schématique de différentes méthodes pour identifier des partenaires d'interaction.

Ce schéma compare quatre méthodes différentes d'identification de nouveaux partenaires au niveau de la cible utilisée, de la source de partenaires d'interaction, de la procédure d'isolement et de la méthode de détection. Les trois premières utilisent des sous-domaines solubles de RCPG : la technique de double-hybride (A), la chromatographie d'affinité de peptide fusionnée à une étiquette (B) et les puces à protéine (C), tandis que la quatrième emploie des RCPG entiers : la purification d'affinité en tandem (D). Adapté de (Daulat *et al.*, 2009).

Aujourd'hui, grâce aux progrès réalisés dans la production et la purification des RCPG, l'identification de nouveaux partenaires d'interaction peut être réalisée avec des récepteurs entiers. La technique de purification d'affinité en tandem (TAP pour Tandem Affinity Purification) a ainsi pu être appliquée aux RCPG (**Figure 15 D**). Cette méthode nécessite l'expression de la protéine

cible fusionnée à une étiquette TAP, constituée de deux domaines de liaison à l'immunoglobuline, d'un site de clivage à la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) et d'un domaine de liaison à la calmoduline. La protéine d'intérêt et ses complexes protéiques associés sont purifiés en deux étapes. La première consiste en une chromatographie d'affinité sur des billes de sépharose recouvertes d'immunoglobulines, puis après clivage par la protéase TEV, les complexes élués sont purifiés par affinité sur des billes recouvertes de calmoduline. Les complexes ainsi isolées sont ensuite analysés en spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines associées à la protéine cible. Cette technique été utilisée pour les récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 avec une étiquette TAP fusionnée à l'extrémité C-terminale et a permis l'identification de nouveaux partenaires d'interaction, dont certains étaient communs aux deux récepteurs et d'autres spécifiques à chacun (Daulat *et al.*, 2007). Par la suite, une méthode TAP modifiée a permis de d'identifier des protéines interagissant avec le récepteur α1D-adrénergique fusionné à l'extrémité N-terminale par une étiquette TAP (Lyssand *et al.*, 2008).

Par ailleurs, dans l'optique de développer des outils de détection et de stabilisation des RCPG, la découverte d'anticorps spécifiques est également un point important. L'approche la plus courante consiste à utiliser des peptides synthétiques issus de domaines de RCPG et à les fusionner à de grandes protéines hautement immunogènes telle que l'ovalbumine. Ces protéines chimériques sont ensuite injectées à des animaux afin que leur système immunitaire produise des anticorps contre le peptide cible (Mackrill, 2004). Plus récemment, des RCPG entiers purifiés et reconstitués *in vitro* ont été utilisés pour immuniser des animaux et ont permis l'identification de récepteurs conformationnels (Day *et al.*, 2007 ; Talmont *et al.*, 2012). Cependant, les approches basées sur l'immunisation présentent des limitations car les anticorps résultants ont une spécificité imprévisible. Un criblage extensif est donc nécessaire pour sélectionner un anticorps avec les propriétés souhaitées et malgré tout il n'est pas garanti qu'un tel anticorps soit produit. Pour contourner ces problèmes, de nouvelles stratégies sont en cours d'élaboration, basées la sélection *in vitro* dans des banques d'anticorps recombinants. De plus en plus, des bibliothèques d'anticorps naïfs, immunitaires ou synthétiques sont développées. Celles-ci peuvent être criblée par des méthodes de présentation *in vitro* (*in vitro* display methods) à l'aide de récepteurs purifiés, telles que la technique du phage display (**Figure 16**). Ces méthodes augmentent la probabilité de sélectionner des anticorps spécifiques, de hautes affinités avec des propriétés prédéfinies (Bradbury *et al.*, 2011 ; Webb *et al.*, 2013). En outre, les technologies recombinantes permettent l'utilisation d'autres classes de protéine que les anticorps. Par exemple, le développement d'une bibliothèque de protéine recombinante de répétition d'Ankirine (DARPins pour designed ankyrin repeat proteins) et le criblage par la technique de ribosome display, a permis de sélectionner des protéines qui lient

spécifiquement le récepteur de la neurotensine NTR1 comme protéine d'interaction pour la stabilisation du récepteur (Milovnik *et al.*, 2009).

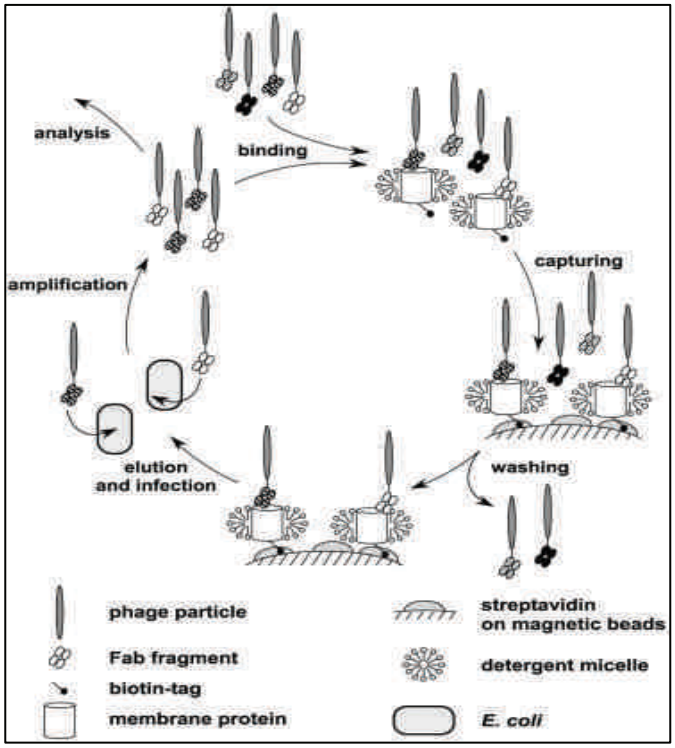


Figure 16 : Représentation schématique du cycle de criblage par phage display.

Ce schéma présente un exemple de cycle de criblage d'une bibliothèque de fragments d'anticorps par phage display à l'aide de protéines purifiées en détergent. La bibliothèque de fragments d'anticorps Fab affichée à la surface de particules de phage est exposée aux protéines membranaires purifiées en détergents. Les phages avec les spécificités désirées forment des complexes anticorps/antigène. Ces complexes peuvent être immobilisés sur un support solide grâce à une étiquette présente sur la protéine cible, ici une étiquette biotine. Les phages non liés sont éliminés par lavages, puis les phages restants sont élués. Ces phages sont utilisés pour infecter des bactéries afin d'être amplifiés. Ils constituent alors une sous-banque qui peut être utilisée pour un autre cycle de présentation de phages. Habituellement, après trois à cinq cycles, des clones individuels sont sélectionnés et analysés. Adapté de (Rothlisberger *et al.*, 2004).

2.3.4. La caratérisation des interactions

Après avoir identifié un partenaire, des études plus approfondies sont réalisées afin de caractériser l'interaction. Celles-ci ont pour objectif de déterminer l'ensemble des paramètres de la liaison (affinité, stoechiométrie, cinétique, énergie…), d'identifier les déterminants de cette interaction au niveau des différents partenaires, d'analyser les changements conformationnels résultants et d'évaluer l'incidence biologique. Différentes techniques peuvent être employées pour étudier des interactions, présentant chacune leurs avantages et inconvénients et apportant des informations différentes et complémentaires.

La radioactivité est très utilisée pour les études de liaison de ligand au récepteur mais relativement peu pour les interactions protéines-récepteur. Ses applications *in vitro* concernent principalement le criblage de nouveaux ligands, la détermination des propriétés des ligands (affinité, agoniste ou antagoniste) et les tests d'activité pour vérifier le repliement correct de RCPG purifiés en se basant sur leur capacité à lier un ligand. C'est une méthode extrêmement sensible avec une limite de détection très faible ce qui permet d'étudier des interactions dont les affinités sont très élevées. Cependant, certaines molécules sont difficiles à marquer et nécessitent des protocoles lourds avec des radioactivités élevées. De plus, cette méthode présente de fortes contraintes écologiques et économiques pour la production, le stockage, l'utilisation et le

retraitement des composés radioactifs. Pour pallier à cela, de nouvelles méthodes ont été développées, notamment des techniques biophysiques, utilisant d'autres signaux pour suivre l'interaction.

La fluorescence est une des alternatives à la radioactivité la plus couramment utilisée pour étudier les RCPG (Daly & McGrath, 2003). Les techniques de transfert d'énergie comme le FRET (pour Förster Resonance Energy Transfer) ou le BRET (pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer) sont principalement utilisées dans des systèmes cellulaires, pour étudier l'interaction des RCPG avec des ligands ou des protéines, leur localisation, leur trafic intracellulaire ou leur dimérisation (Ward & Milligan, 2013), mais elles peuvent également être employées *in vitro*. Ces méthodes nécessitent le marquage de l'un des partenaires avec une molécule fluorescente ou bioluminescente donneuse et de l'autre avec une molécule fluorescente acceptrice. Lorsque le donneur est excité, s'il y a interaction entre les deux partenaires, il va transmettre son énergie à l'accepteur qui va émettre de la fluorescence. Pour permettre de transfert d'énergie il est nécessaire que le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur (**Figure 17 A**) et que la distance entre les deux partenaires soit faible, généralement ≤ 10 nm (**Figure 17 B**). Ces techniques permettent d'étudier l'interaction entre un RCPG et un ligand. Par exemple, l'interaction entre le récepteur de la ghréline GHS-R1 marqué à l'extrémité N-terminale et le ligand peptidique ghréline marqué a été caractérisée par FRET (mesure de Kd), ainsi que l'interaction avec plusieurs autres ligands non marqués par compétition (mesure de Ki) (Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013). Des études d'interaction avec des protéines cytosoliques peuvent également être réalisées en marquant le RCPG à son extrémité C-terminale. Les techniques de transfert d'énergie avec un marquage intramoléculaire permettent aussi de visualiser un changement de conformation d'un RCPG suite à son activation. Par exemple, le récepteur β2-adrénergique a été marqué à l'extrémité cytoplasmique de l'hélice 6 et à l'extrémité C-terminale. L'analyse en FRET a permis de mesurer des variations de distance entre ces deux domaines du récepteur suite à l'activation par des ligands agonistes (Granier *et al.*, 2007). Le même type d'étude a été réalisé sur le récepteur de l'arginine-vasopressine de type 2 (V2R), complété par la mesure de la fluorescence intrinsèque de ce RCPG, pour mettre en évidence les changements de conformation induits par des ligands biaisés ou non et ainsi comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'efficacité des ligands et de la sélectivité fonctionnelle (Rahmeh *et al.*, 2012).

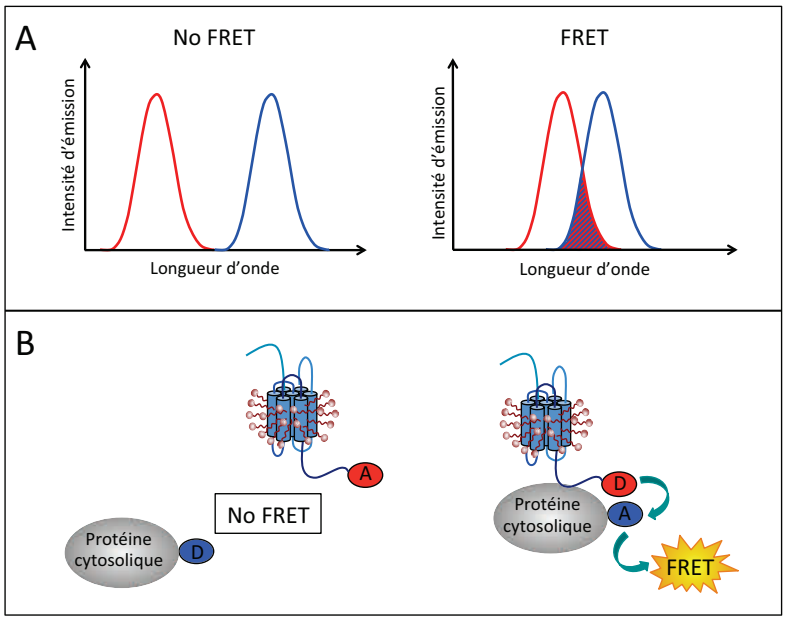


Figure 17 : Illustration schématique du principe de FRET.

A : Le spectre d'émission du donneur (en rouge) doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur (en bleu) pour que le FRET puisse se produire. **B** : Le donneur et l'accepteur doivent être suffisamment proche (distance ≤ 10 nm) de sorte que, lorsque le donneur est excité, il transfert son énergie à l'accepteur qui est à son tour excité et émet de la fluorescence traduisant l'interaction entre les deux protéines portant les molécules donneuse et acceptrice.

Une autre approche basée sur la fluorescence utilise un marquage unique avec la sonde Bimane, qui est sensible à la polarité de son environnement et dont les variations d'émission de fluorescence vont traduire des changements de conformation de la protéine marquée. Par exemple, le récepteur β2-adrénergique a été marqué sur la boucle ICL3 avec la sonde bimane afin de suivre les mouvements des extrémités cytoplasmiques des hélices 3, 5 et 6 induits lors de l'activation du RCPG. Ceci a permis d'étudier l'effet de différents types de ligands sur la conformation du récepteur et le couplage à la protéine G (Yao *et al.*, 2009). Autre exemple, le récepteur de la ghréline GHS-R1 a été marqué par la sonde Bimane à différentes positions (intra- ou extra-cellulaire) pour suivre les changements conformationnels lors de son interaction avec différents types de ligands mais aussi avec des partenaires cytosoliques tels que les protéines G, l'arrestine ou la sous-unité □ de la protéine adaptatrice AP2. Cette étude a permis d'analyser l'influence des ligands et des protéines de signalisation sur le paysage conformationnel que peut adopter un RCPG (Mary *et al.*, 2012). Inversement, dans d'autres études ce sont les protéines cytosoliques, comme l'arrestine ou □-AP2, qui ont été marquées au Bimane afin de mettre en évidence leur interaction avec un RCPG non marqué (Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013).

La résonnance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance) est une technique intéressante car elle très sensible, requiert peu de matériel purifié et ne nécessite pas de marquage. Un des partenaires est immobilisé sur une surface sensible et, lors de la fixation de l'autre partenaire, une variation de l'indice de réfraction de la lumière, due au changement de masse, est mesurée (**Figure 18**). Cette technique apporte, en plus des affinités de liaisons, des données sur la cinétique (constante d'association et dissociation) et la stoechiométrie de l'interaction. Elle permet d'étudier des interactions récepteur-protéine. Par exemple, la SPR a été utilisée pour caractériser la liaison de différents mutants de la glycoprotéine gp120 du VIH (virus

d'immunodéficience humaine) avec le récepteur de chimiokine CCR5 (Navratilova *et al.*, 2006a). Elle a également permis de mettre en évidence une interaction entre le domaine central de la protéine GASP-1 (GPCR Associated Sorting Protein 1) et différents RCPG (Bornert *et al.*, 2013). Cette technique permet également d'étudier des interactions ligand-récepteurs. Les cinétiques et stoechiométries d'interaction des récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR5 avec des ligands naturels et des petites molécules, dont 19 nouveaux inhibiteurs du CCR5, ont été déterminées par SPR (Navratilova *et al.*, 2006b). Cette technique a aussi été utilisée pour cribler les conditions de solubilisation de RCPG, en se basant sur la capacité des récepteurs à lier des ligands de référence (Navratilova *et al.*, 2005 ; Rich *et al.*, 2009). Elle a également permis de caractériser le profil pharmacologique de mutants thermostabilisés de RCPG avec différents ligands (Rich *et al.*, 2011 ; Robertson *et al.*, 2011). L'analyse en SPR de l'interaction d'un antagoniste de référence avec différents mutants du site de fixation de ligand du récepteur de l'adénosine A2A a permis de déduire des informations sur les acides-aminés impliqués dans la liaison (Zhukov *et al.*, 2011). La SPR est de plus en plus utilisée pour étudier les interactions avec les RCPG bien qu'elle présente tout de même quelques limitations. Tout d'abord, il est indispensable de pouvoir immobiliser un des deux partenaires et il peut y avoir des problèmes d'instabilité de cette immobilisation. De plus, il peut y avoir des liaisons non spécifiques mais aussi des faux positifs dus à la sensibilité de la surface aux solvants à haut indice de réfraction.

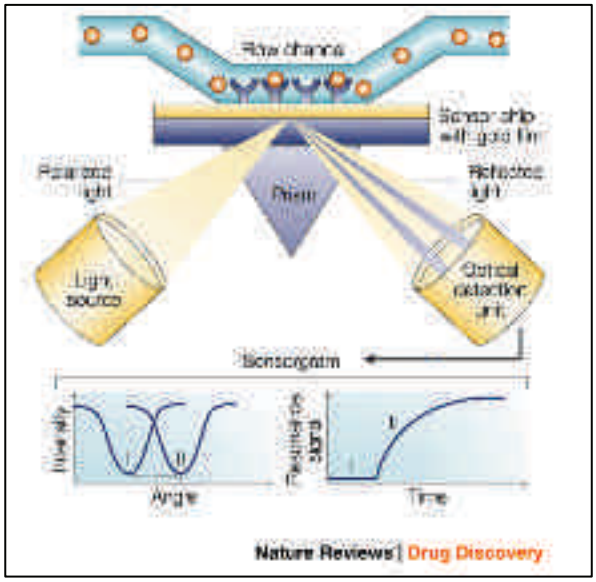


Figure 18 : Représentation schématique du principe de la résonance plasmonique de surface (SPR).

La SPR détecte les variations de l'indice de réfraction de la lumière au niveau d'une surface sensible recouverte d'un film en or. La lumière est réfléchie avec un angle qui varie en fonction de la masse sur la surface sensible. Si le partenaire immobilisé sur la puce fixe une molécule qui passe dans le canal, il y a une augmentation de la masse qui induit un changement de l'angle de résonance (de I à II dans le diagramme inférieur gauche). La mesure de cette modification de l'angle de résonance en temps réel permet de tracer un sensorgramme du signal de résonance en fonction du temps (graphique inférieur droit).

La titration calorique isotherme (ITC pour Isothermal Titration Calorimetry) est une technique qui ne nécessite ni marquage ni immobilisation sur un support. Elle est basée sur la mesure de variation de chaleur induite au cours d'une interaction moléculaire (**Figure 19**). Elle permet de mettre en évidence une interaction et de déterminer l'affinité et la stoechiométrie du système. De plus, elle donne des informations sur les paramètres thermodynamiques (énergie libre,

enthalpie, entropie) de l'interaction permettant de préciser la nature des forces contribuant à la formation des complexes (hydrophobe, électrostatique). L'étude approfondie de l'interaction de la chimiokine interleukine-8 (IL-8) avec le domaine N-terminal du récepteur de chimiokine CXCR1 par ITC a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques et de mettre en évidence que la liaison est enthalpique et médiée essentiellement par des interactions hydrophobes (Fernando *et al.*, 2007). L'ITC a également permis de caractériser l'interaction de l'hormone peptidique parathyroïde (PTH) avec le domaine extracellulaire purifié du récepteur PTH1R (Pioszak & Xu, 2008) puis avec le récepteur PTH1R purifié entier (Drechsler *et al.*, 2011). En utilisant des fragments et des mutants de l'hormone PTH, l'analyse par ITC a permis de définir la longueur minimale et les résidus essentiels pour l'interaction. Cette technique a également été utilisée comme test fonctionnel pour vérifier le bon repliement de RCPG purifiés en se basant sur leur capacité à lier un ligand (Nisius *et al.*, 2008 ; Watkins *et al.*, 2013). Bien qu'elle apporte des informations originales et intéressantes, l'ITC est assez peu employée pour l'étude des interactions avec des RCPG qui se limitent principalement à des études de liaison de ligands peptidiques. Les principaux inconvénients de cette méthode sont la grande quantité de protéine nécessaire, la difficulté de mesurer des interactions de très haute affinité et le bruit de fond lié à la sensibilité au changement d'enthalpie non spécifique dû à l'environnement, comme la mauvaise concordance du tampon, la dilution de ligand ou encore l'inadéquation de la concentration en détergent (Rajarathnam & Rosgen, 2013).

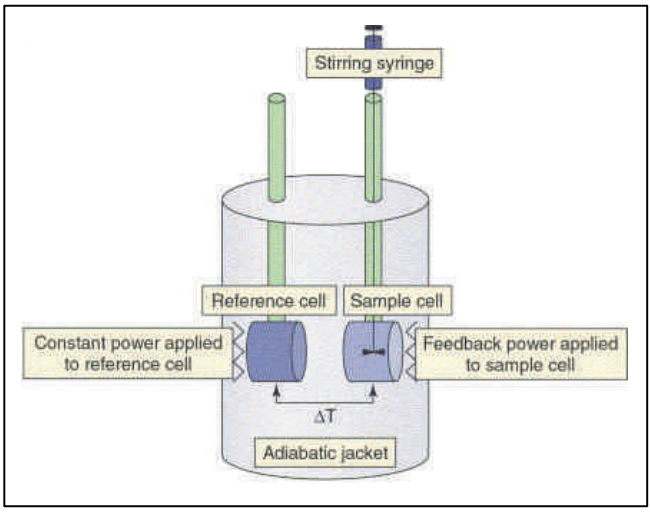


Figure 19 : Représentation schématique de la configuration de base d'un calorimètre de titration isotherme.

Un calorimètre de titration isotherme est constitué de deux cellules, une cellule échantillon et une cellule de référence, constitué d'un matériau conducteur thermique efficace, entouré par une enveloppe adiabatique. Une seringue est utilisée pour doser le ligand dans la cellule d'échantillon contenant la biomolécule. Une alimentation constante est appliquée à la cellule de référence, activant un circuit de rétroaction, qui applique une force variable à la cellule d'échantillon. Cela permet de conserver une différence de température très faible et contrôlée entre les cellules, pour maintenir des conditions isotherme ($\Delta T = 0$). Au cours du processus de titrage, on observe le changement de chaleur dans la cellule d'échantillon. La puissance de rétroaction nécessaire pour maintenir des conditions isothermes entre les deux cellules, est mesurée par un calorimètre. Les réactions exothermiques produisent de la chaleur, provoquant ainsi une diminution de la puissance de retour, tandis que les réactions endothermiques augmentent la puissance de rétroaction. Adapté de (Holdgate & Ward, 2005).

Avec la plupart des techniques d'analyse d'interaction protéine-ligand ou protéine-protéine, il est souvent nécessaire de générer des mutants de la protéine pour identifier les acides-aminés impliqués dans la liaison. En revanche, dans le cas de co-cristallisation d'un récepteur avec un ligand ou une protéine partenaire, la diffraction des rayons X permet d'identifier directement les déterminants de l'interaction au niveau des deux partenaires et d'obtenir des informations sur les acides-aminés et le type de liaison impliqués dans l'interaction. Pendant longtemps les particularités intrinsèques des RCPG ont limité leur analyse par la diffraction des rayons X. Depuis quelques années, d'énormes progrès ont été réalisés dans ce domaine. Ainsi, plusieurs structures de RCPG liés à différents types de ligand et même une structure en co-cristallisation avec une protéine G ont pu être obtenues. Ceci a permis d'étudier la diversité structurale des RCPG et d'approfondir les connaissances sur leur mécanisme d'activation et le couplage aux protéines G. Il faut cependant noter que la cristallographie est le reflet d'un système figé qui ne permet pas d'obtenir des informations dynamiques. En effet, les formes cristallines représentent un seul état de conformation non-dynamique, alors que les RCPG semblent passer par divers états de transition lors de leur interaction avec des partenaires (Millar & Newton, 2010). De plus, cette technique nécessite de disposer d'une grande quantité de protéines pures, homogènes et stables mais requiert également une étape supplémentaire de cristallisation, pour laquelle les conditions favorables à la cristallogenèse peuvent être spécifiques à chaque protéine.

Ainsi, les méthodes d'analyses biochimiques et biophysiques utilisant des protéines purifiées s'avèrent être des outils très complémentaires et utiles pour analyser de nombreux aspects de la biologie des RCPG dans un environnement expérimental contrôlé et amener des modèles qui peuvent ensuite être testés dans un contexte cellulaire.

3. Le challenge de l'étude de RCPG *in vitro*

Afin de pouvoir réaliser des études *in vitro* de RCPG, il est nécessaire de disposer de protéines purifiées en qualité et en quantité suffisantes et pour cela plusieurs obstacles majeurs doivent être surmontés. Tout d'abord, mise à part la Rhodopsine qui est abondante dans la rétine, les RCPG sont généralement produits en faible quantité et doivent donc être surexprimés dans un système d'expression recombinant. De plus, les RCPG doivent être extraits de leur environnement membranaire natif par solubilisation à l'aide de détergents. Le choix du détergent est essentiel pour trouver un équilibre entre l'efficacité de l'extraction et le maintien de l'activité, car les protéines membranaires sont souvent déstabilisées et dénaturés par les détergents. Ensuite, les récepteurs doivent être purifiés de façon homogène. Finalement, il est nécessaire d'identifier des conditions

permettant de stabiliser les récepteurs purifiés afin d'éviter ou de ralentir leur dénaturation progressive et leur perte de fonction. Malheureusement, il n'existe pas pour le moment d'approche universelle qui permette la production, la purification et la stabilisation de tout RCPG. En effet, chaque récepteur possède des caractéristiques physicochimiques qui lui sont propres et une préférence pour certains détergents. Chacun nécessite donc des conditions particulières pour sa solubilisation et sa purification. Cependant, les grandes avancées réalisées ces dernières années, concernant la surexpression, la purification et la stabilisation des RCPG, ouvrent des perspectives prometteuses pour l'étude structurale et l'analyse dynamique de ces protéines membranaires (Baneres & Mouillac, 2012 ; Zhao & Wu, 2012 ; Maeda & Schertler, 2013).

3.1. La surexpression des RCPG

La surexpression de telles protéines n'est pas une étape triviale car elle peut aboutir à de faibles rendements, des phénomènes d'agrégation, un mauvais repliement ou encore une toxicité cellulaire, l'ensemble de ces situations étant bien souvent liées entre elles. Malgré tout, de nombreux systèmes d'expression capables de produire des protéines recombinantes fonctionnelles avec des rendements élevés ont pu être développés. Aujourd'hui, il existe plusieurs systèmes adaptés à la production de RCPG, présentant chacun leurs avantages et inconvénients.

3.1.1. Les bactéries

Les bactéries constituent un système de production de protéines simple et peu coûteux. Elles ont un temps de génération court, peuvent être facilement manipulées génétiquement et cultivées en grand volume. La bactérie *Escherichia coli* (**Figure 20**) est le système le plus commun. Couramment utilisé pour la production de protéines solubles, son utilisation pour les protéines membranaires des eucaryotes supérieurs est plus restreinte. Il faut noter que ce système procaryote ne réalise pas de modifications post-traductionnelles, ce qui peut être un avantage pour l'homogénéité mais aussi un inconvénient si ces modifications sont indispensables à l'activité des protéines. De nombreuses optimisations de ce système (construction, souche, vecteur) ont permis l'expression de plusieurs RCPG. Cependant, les rendements d'expression peuvent être élevés pour certains, tandis que d'autres sont produits à des niveaux très faibles, voire pas du tout (Michalke *et al.*, 2009). Deux méthodes de production peuvent être employées, soit les RCPG sont adressés à la membrane interne comme le récepteur de la neurotensine NTS1 (White *et al.*, 2004 ; White & Grisshammer, 2007), soit ils sont produits en corps d'inclusion dans le cytoplasme puis manipulés en conditions dénaturantes pour être repliés ensuite sous forme native et fonctionnelle, comme les récepteurs BLT1 et BLT2 du leucotriène LTB4 (Baneres *et al.*, 2003a ; Baneres & Parello, 2003b ; Arcemisbehere *et al.*, 2010). Aujourd'hui, la production en système *E. coli* a conduit à la

détermination par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la structure tridimensionnelle du récepteur de chimiokine CXCR1 (Park *et al*., 2012) ainsi qu'à celle de deux ligands liés à des récepteurs purifiés, la neurotensine (Luca *et al*., 2003) et le leucotriène LTB4 (Catoire *et al*., 2010). Le système *E. coli* a également été utilisé pour le criblage primaire de la stabilité thermique de mutant de RCPG, du fait de ses capacités haut débit. Les mutants optimisés ont ensuite pu être transférés à d'autres systèmes d'expression pour la production à grande échelle (Sarkar *et al*., 2008 ; Serrano-Vega *et al*., 2008 ; Shibata *et al*., 2009 ; Lebon *et al*., 2011a).

Figure 20 : Image de microscopie électronique à balayage de la bactérie *Escherichia coli*.

3.1.2. Les levures

La levure, eucaryote unicellulaire, est un système d'expression intéressant car elle combine plusieurs avantages. Comme les bactéries, elle peut être manipulée aisément d'un point de vue génétique, possède un temps de génération court et peut facilement être cultivée en grand volume dans des milieux assez simples et peu couteux. De plus, elle possède toute la machinerie cellulaire des eucaryotes et peut effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles (Reilander & Weiss, 1998). Cependant, la composition et la quantité des glycosylations ainsi que la composition de la membrane plasmique chez les levures, diffèrent de celles des cellules de mammifères. Ceci peut avoir des conséquences si ces modifications ou un environnement lipidique particulier sont essentiels à l'expression fonctionnelle des récepteurs, comme c'est la cas du récepteur δ-opioïde (Lagane *et al*., 2000). De plus, les cellules de levure sont entourées d'une paroi cellulaire qui complique la lyse des cellules et l'isolement des membranes. Couramment utilisé pour l'expression de protéines membranaires, ce système a été un des premiers utilisé pour la production des RCPG. *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* sont les deux souches les plus utilisées. *P. pastoris* (**Figure 21**) présente l'avantage de pouvoir être cultivée à très haute densité et d'être capable d'utiliser le méthanol comme source de carbone permettant l'utilisation d'un promoteur fort et inductible au méthanol pour la production de niveaux élevés de protéines (Andre *et al*., 2006). Chez *P. pastoris*, de nombreuses optimisations peuvent être réalisées, au niveau de la séquence recombinante (Logez *et al*., 2012) et des paramètres expérimentaux (Bornert *et al*., 2012) afin

d'améliorer la qualité et la fonctionnalité des protéines produites. Les structures cristallographiques du récepteur de l'histamine H1 (Shimamura *et al*., 2011) et du récepteur de l'adénosine A2A (Hino *et al*., 2012) ont été résolues à partir de protéines exprimées chez *P. pastoris*.

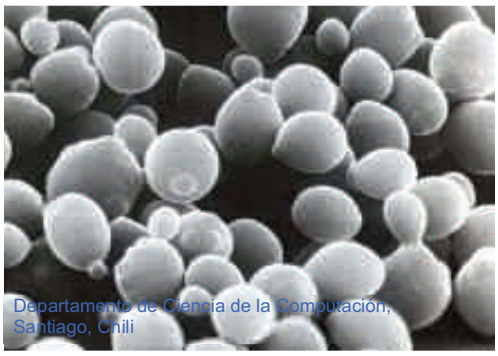


Figure 21 : Image de microscopie électronique de la levure *Pichia pastoris*.

3.1.3. Les cellules d'insectes

Le système de cellules d'insecte infectées par un baculovirus recombinant (**Figure 22**) est un des plus exploités aujourd'hui pour la surexpression des RCPG. Certes, la vitesse de croissance de ces cellules est plus faible et les milieux de culture plus coûteux que pour les bactéries ou les levures. Malgré tout, ces cellules peuvent être cultivées à de hautes densités cellulaires et sont plus adaptées à la production en masse que les cellules de mammifère (Sarramegna *et al*., 2003). De plus, ce système réalise la plupart des modifications post-traductionnelles, bien que la glycosylation des protéines recombinantes est limitée à l'addition de mannose. Par ailleurs, le taux de cholestérol dans la membrane plasmique de ces cellules est relativement faible. Les cellules les plus utilisées sont les Sf9 et Sf21 dérivées de *Spodoptera frugiperda* et les High Five dérivées de *Trichoplusia ni* (Akermoun *et al.*, 2005). Généralement, ce système donne des rendements de production élevés avec une fonctionnalité similaire à celle des récepteurs exprimés dans leur environnement cellulaire original. D'ailleurs, la production en cellules d'insecte a abouti à la résolution de plupart des structures tridimensionnelles de RCPG publiées ces dernières années, comme par exemple celles des récepteurs adrénergiques β1 et β2 (Rasmussen *et al.*, 2007 ; Warne *et al.*, 2008), du récepteur de l'adénosine A2A (Jaakola *et al.*, 2008) ou plus récemment des récepteurs des opioïdes □, δ et κ (Granier *et al.*, 2012 ; Manglik *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2012).

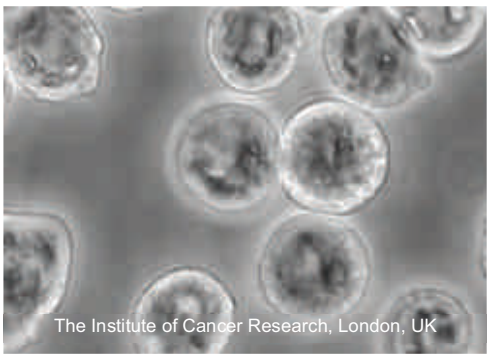


Figure 22: Image de microscopie électronique de cellules d'insectes *Sf9* infectées par bacculovirus.

3.1.4. Les cellules de mammifères

Les cellules de mammifère (**Figure 23**) constituent le système idéal pour l'expression des RCPG car c'est celui qui est le plus proche de l'environnement naturel des récepteurs. En effet, elles possèdent toute la machinerie de production et de modifications post-traductionnelle et la composition lipidique nécessaires au bon repliement des protéines eucaryotes. Cependant, les modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, peuvent être un avantage pour la fonctionnalité mais aussi un inconvénient en terme d'homogénéité. Par ailleurs, ces cellules ont un temps de génération assez long, nécessitent des milieux de culture coûteux et la mise en place d'incubateurs à atmosphère contrôlée, et poussent à faible densité cellulaire, ce qui rend difficile l'optimisation des cultures à grande échelle (Sarramegna *et al*., 2003). L'expression des RCPG en cellules de mammifères peut être réalisée par infection à l'aide de vecteurs viraux, par transfection transitoire, ou par sélection de clones recombinants stables. Par exemple, un système d'expression dans des cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney cell-21) infectées par le virus SFV (Semliki Forest Virus) a été testé pour la production d'une centaine de RCPG recombinants (Hassaine *et al*., 2006). Un système d'expression utilisant des lignées stables de cellules HEK293S (Human Embryonic Kidney 293) inductibles à la tétracycline a également été mis au point et utilisé avec succès pour l'expression de RCPG (Chelikani *et al*., 2006). Une autre lignée de HEK293S déficiente en N-acétylglucosaminyltransférase I (GnTI (-)) a été développée, avec l'avantage de réaliser des N-glycosylation homogènes (Chaudhary *et al*., 2012). L'expression en cellules de mammifère est efficace pour la production de RCPG fonctionnels mais l'obtention de récepteurs en grande quantité s'avère très onéreuse. C'est pourquoi ce système est plus souvent utilisé pour des études fonctionnelles que pour la surexpression.

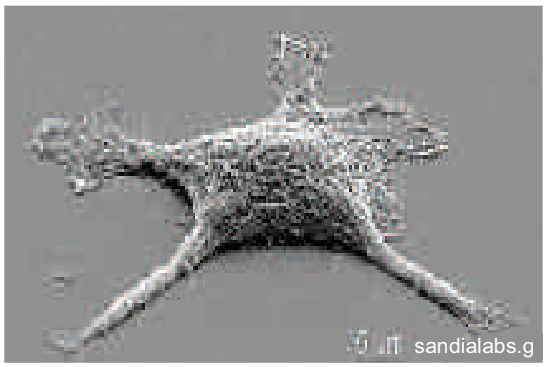


Figure 23: Image de microscopie électronique de cellules de mammifères.

3.1.5. Les systèmes acellulaires

La production peut aussi être réalisée *in vitro* dans des systèmes acellulaires. Cette approche réduit la complexité de production de protéine à partir d'organismes vivants et libère des contraintes du maintien en culture des cellules. La plupart des effets toxiques pour l'hôte d'expression sont

éliminés et la rapidité de production est très concurrentielle avec des réactions généralement de 10 à 20 heures. La caractéristique de ce système est sa nature ouverte (**Figure 24**) qui permet, à n'importe quel moment de la réaction, l'addition de composés bénéfiques au repliement et à la stabilité des récepteurs recombinants, tels que des inhibiteurs de protéase, des cofacteurs, des ligands, des surfactants (Klammt *et al*., 2007). Ces systèmes acellulaires contiennent en général des extraits de bactéries, de germe de blé ou de réticulocytes de lapin qui contient tout le système de transcription et traduction permettant la production des protéines. L'expression peut être réalisée en absence de surfactant, conduisant à la formation de précipité de protéines qui sont ensuite solubilisés (Sansuk *et al*., 2008), en présence de détergents qui permet la solubilisation instantanée des protéines pendant ou peu après la traduction et génère des protéomicelles (Wang *et al*., 2013), ou directement en présence de bicouches lipidiques, qui permettent la stabilisation des protéines mais pour lesquelles la translocation peut être une étape limitante (Yang *et al*., 2011). L'efficacité de cette approche acellulaire a été prouvée pour plusieurs RCPG, dont le récepteur de l'endothéline ETA (Junge *et al*., 2010).

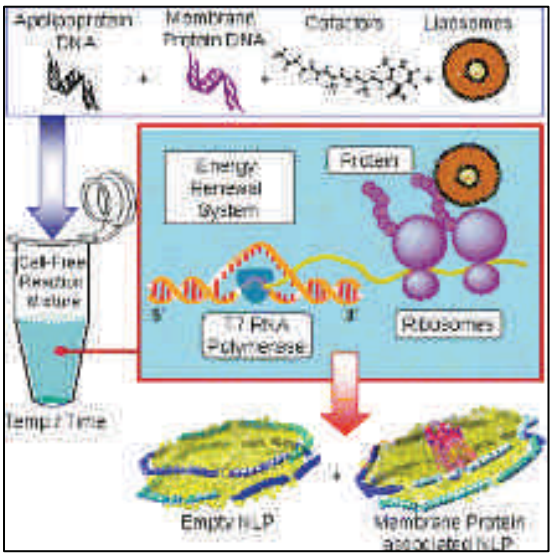


Figure 24 : Représentation schématique de l'expression acellulaire.

Exemple de synthèse *in vitro* de protéines membranaires directement intégrées dans des nanodisques. Les constituants (ADN, vésicules lipidiques, cofacteurs) sont mis dans un microtube avec le lysat cellulaire qui contient tout le système de transcription et traduction permettant la production des protéines. Celles-ci sont directement intégrées dans les nanodisques qui s'assemblent spotanément à partir des lipides et des apolipoprotéines. Une population mixte de nanodisques avec et sans protéine membranaire intégrée est obtenue (Cappuccio *et al*., 2008).

Il existe donc une large gamme de systèmes d'expression disponibles, chacun avec leurs propres avantages et inconvénients. Le choix d'un système plutôt qu'un autre sera en grande partie déterminée par la protéine qui doit être surexprimée. Quel que soit le système choisi, il doit offrir des rendements élevés de protéine fonctionnelle.

3.2. La purification des RCPG

Dans le cas des protéines membranaires comme les RCPG, la purification comprend généralement plusieurs étapes avec des objectifs différents. Tout d'abord, la préparation de membranes a pour but de séparer les protéines solubles des protéines membranaires suite à la lyse des cellules, puis la solubilisation permet d'extraire les protéines des membranes et de les maintenir en solution, finalement les techniques chromatographiques vont enrichir la préparation en protéines d'intérêt jusqu'à l'obtention d'un échantillon pur, homogène et fonctionnel.

3.2.1. La préparation de membranes

L'isolement des membranes plasmiques des cellules contenant les protéines d'intérêt, constitue la première étape dans la purification de protéines membranaires (sauf dans le cas d'expression en système acellulaire ou en corps d'inclusion). Cela consiste généralement en une lyse mécanique des cellules suivie par des centrifugations différentielles permettant de séparer les différents constituants des cellules. Il existe différents systèmes de lyse qui sont plus ou moins adaptés en fonction du système d'expression utilisé. Les homogénéisateurs type Ultra-Turrax, Potter ou Dounce sont souvent utilisés pour lyser les cellules de mammifères, la sonication est plutôt employée pour les bactéries, tandis que pour les levures le système le plus efficace est la lyse par mélange vigoureux en présence de microbilles de verre. Lors de la lyse des cellules, des protéases peuvent être libérées et conduire à la dégradation des protéines. Des inhibiteurs de protéases sont donc généralement ajoutés au tampon de lyse. Des centrifugations basses vitesses vont ensuite sédimenter les gros organites et les cellules non lysées. Puis des centrifugations à haute vitesse vont permettre de séparer les fragments de membranes qui se déposent au fond des tubes et les protéines solubles qui restent dans le surnagent. Ainsi la préparation de membrane permet d'éliminer les protéines solubles, y compris certaines protéases, et d'isoler les protéines membranaires constituant une première étape d'enrichissement en protéines d'intérêt.

3.2.2. La solubilisation

Une solubilisation des membranes plasmiques est nécessaire afin d'extraire les protéines membranaires de la bicouche lipidique. Ceci est réalisé à l'aide de détergents, qui désorganisent les membranes, remplacent les lipides en formant des micelles autour de la partie hydrophobe des protéines, et créent ainsi un environnement qui permet de maintenir les protéines membranaires en solution (**Figure 25**). Les détergents sont de petites molécules amphiphiles, qui possèdent une tête hydrophile connectée à un domaine hydrophobe. La nature de la tête hydrophile définit la classe de détergent : si la tête est chargée négativement les détergents sont anioniques tandis que si elle est chargée positivement ils sont cationiques, si la tête porte des charges positives et négatives les

détergents sont dits zwitterioniques et si elle n'est pas chargée ils sont non-ioniques (Seddon *et al.*, 2004).

Le type de détergent utilisé pour la solubilisation et la purification a un impact direct sur la fonctionnalité et la stabilité d'un RCPG (Tate, 2010). Certains détergents ioniques forts sont excellents pour déstabiliser les membranes mais ils peuvent éliminer des lipides essentiels à la fonction de la protéine, voire même conduire à sa dénaturation. D'autres détergents non dénaturants sont moins efficaces pour solubiliser les membranes, mais plus favorables au maintien et à la stabilisation des RCPG sous forme fonctionnelle. Le choix du type de détergent est donc crucial pour trouver un équilibre entre l'efficacité de l'extraction et le maintien de la fonctionnalité.

La concentration en détergent a aussi une influence sur la fonctionnalité et la stabilité des RCPG. La concentration à laquelle les monomères de détergent forment spontanément des micelles est connue sous le terme de concentration micellaire critique (CMC). Les membranes peuvent être facilement solubilisées en ajoutant des détergents à une concentration supérieure à leur CMC. Cependant, les récepteurs solubilisés ne se retrouvent généralement pas sous forme de protéines isolées mais plutôt sous forme de complexes associant des détergents et des lipides membranaires (**Figure 25**) (Grisshammer, 2009). La quantité de lipides associés au RCPG solubilisé va dépendre de la concentration en détergent. Une concentration trop élevée en détergent peut entrainer la délipidation des RCPG et la perte de fonctionnalité.

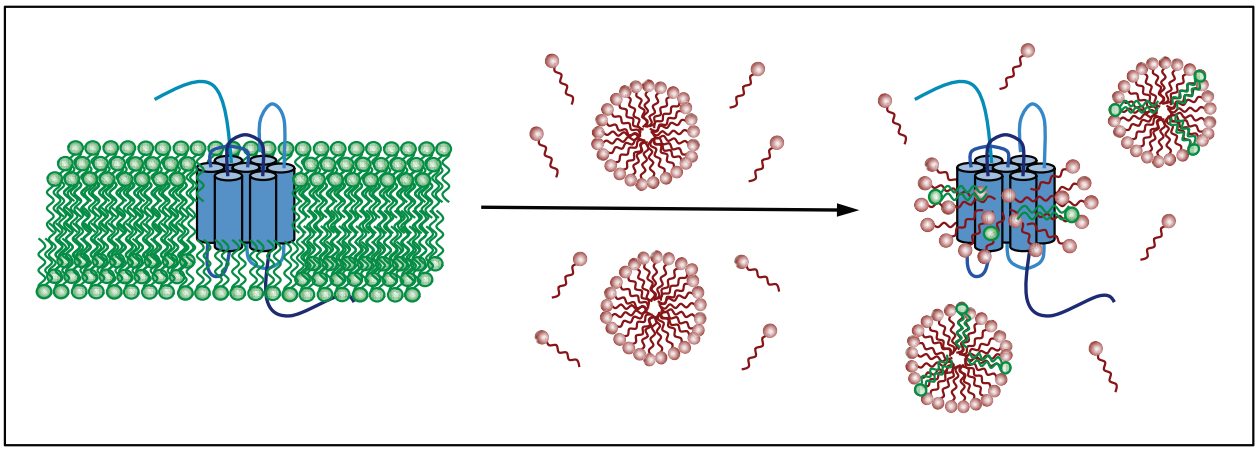


Figure 25 : Schéma représentant la solubilisation d'un RCPG par des détergents.

Le RCPG (en bleu) exprimé à la membrane plasmique de la celllule hôte (en vert) est extrait à l'aide de détergents (en bordeau) au cours de l'étape de solubilisation. A ce stade, les RCPG sont compléxés aux lipides et aux détergents.

3.2.3. La purification

Après la solubilisation, les protéines d'intérêt sont isolées des autres protéines membranaires par purification. L'objectif est d'obtenir un échantillon de récepteurs purs, homogènes, et

fonctionnels et pour cela différentes techniques chromatographiques peuvent être utilisées et souvent combinées. Pour éviter que les protéines membranaires ne précipitent, tous les tampons de purification doivent contenir une concentration en détergent supérieure à la CMC.

Grâce aux techniques de clonage recombinant, des séquences étiquettes peuvent être ajoutées aux extrémités amino- ou carboxy- terminales des récepteurs, permettant des purification par affinité. En effet, des anticorps spécifiques, développés contre ces séquences étiquettes, peuvent être greffés sur des résines affin de réaliser des chromatographies d'affinité rapides et efficaces. Par exemple, l'étiquette Flag (polypeptide de séquence DYKDDDDK) reconnue par les anticorps M1 et M2 a été utilisé pour la purification du β2-adrénergique (Kobilka, 1995) ou du récepteur des canabinoïdes CB1 (Kim *et al*., 2005). Les étiquettes 6-histidines ou 10-histidines peuvent être reconnues par un anticorps, mais plus généralement par des ions (nickel, cobalt ou zinc), on parle alors de chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Cette méthode, la plus employée aujourd'hui par les laboratoires, a été utilisée pour la purification de nombreux RCPG (Mazina *et al*., 1996 ; Weiss & Grisshammer, 2002 ; Ratnala *et al*., 2004 ; Sarramegna *et al*., 2005 ; Warne *et al*., 2008 ; Chien *et al*., 2010 ; Wu *et al*., 2010). Un des points critiques pour le succès d'une chromatographie d'affinité est l'accessibilité des étiquettes. Si elles ne sont pas correctement exposées et accessibles aux anticorps ou aux ions, cela peu affecter le rendement de purification de façon dramatique.

Après l'enrichissement par chromatographie d'affinité contre des étiquettes, une seconde étape de purification peut être nécessaire afin d'éliminer d'éventuels contaminants (bien que pour certains récepteurs une seul étape IMAC ait permis d'obtenir un très bon niveau de pureté et d'homogénéité). Cette seconde étape peut aussi avoir pour but de séparer les récepteurs fonctionnels des récepteurs inactifs par une chromatographie d'affinité de ligand, utilisant une résine sur laquelle a été greffé un ligand spécifique du récepteur cible. Par exemple, une résine avec le ligand antagoniste XAC (Xanthine Amine Congener) a été développée pour purifier les récepteurs de l'adénosine A2A fonctionnels (Weiss & Grisshammer, 2002), une résine avec le ligand alprénolol (antagoniste β-adrénergique) pour les récepteurs β2AR (Warne *et al.*, 2003), ou encore une résine avec l'agoniste neurotensine pour le récepteur NTS1 (White & Grisshammer, 2010).

Par ailleurs, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour Size Exclusion Chromatography) permet de séparer les protéines en fonction de leurs propriétés physicochimiques (diamètre, volume, masse). Cette approche est bien souvent utilisées en complément des

chromatographies d'affinité. Ce type de purification permet notamment d'éliminer des agrégats non fonctionnels (Warne *et al*., 2011 ; Lebon *et al*., 2011b).

Bien que plusieurs étapes de purification soient souvent nécessaires pour obtenir un échantillon pur, homogène et fonctionnel, le temps nécessaire pour la purification doit idéalement être réduit au minimum en raison de la dégradation possible par des protéases et de l'instabilité des récepteurs solubilisés pouvant aboutir à la dénaturation et/ou agrégation progressive au cours du temps.

3.3. La stabilisation des RCPG purifiés

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'instabilité des RCPG solubilisés. Tout d'abord, leur flexibilité intrinsèque fait que ces protéines peuvent adopter de multiples conformations. De plus, l'exposition prolongée au détergent peut aboutir à la dénaturation progressive des récepteurs car des lipides et co-facteurs peuvent être piégés dans des micelles libres de détergent et des contacts structurants de type protéine-lipide et/ou protéine-protéine peuvent être rompus. Enfin, la structure des micelles ne mime pas parfaitement l'environnement membranaire car il n'y a pas de pression latérale qui contribue au maintien de la structure tridimensionnelle des protéines. Afin d'améliorer la stabilité des RCPG purifiés diverses stratégies ont été développées, dont certaines consistent à modifier la séquence protéique des récepteurs, d'autres à ajouter des agents stabilisants ou encore à changer l'environnement de la protéine en solution.

3.3.1. La modification des RCPG

Différentes stratégies de modification des RCPG par fusion, mutation ou délétion ont été employées avec succès pour améliorer la stabilité de ces protéines.

Une première stratégie consiste à fusionner une protéine partenaire au RCPG afin de réduire sa flexibilité, d'améliorer sa stabilité et aussi d'augmenter la surface hydrophile pour la formation de cristaux. La première approche employée avec succès a consisté à fusionner la protéine du lysozyme T4 (LT4) à l'extrémité intracellulaire des hélices 5 and 6, en remplacement de la boucle ICL3 (Rosenbaum *et al*., 2007). Cette technique a permis de résoudre la structure à haute résolution du récepteur β2-adrénergique humain (**Figure 26**) dans un premier temps (Cherezov *et al*., 2007 ; Hanson *et al*., 2008 ; Wacker *et al*., 2010) puis a été transférée avec succès à dix autres RCPG. La fusion du LT4 au domaine N-terminal s'est révélée être également efficace pour la stabilisation des RCPG, élargissant les possibilités de stratégie de fusion (Thompson *et al*., 2012 ; Zou *et al*., 2012). Une exploration plus approfondie de nouveaux partenaires de fusion a conduit à l'identification du cytochrome b562RIL (BRIL) comme une alternative au LT4 (Chun *et al*., 2012). Cette construction

a donné la structure à la plus haute résolution de RCPG : 1,8 Å (Liu *et al.*, 2012). Bien qu'elle ait déjà prouvé son efficacité pour de nombreux RCPG, certains ne se prêtent pas à cette approche de fusion de protéine en raison des effets délétères sur l'expression ou la stabilité de la protéine chimérique. De plus, même si le remplacement de la boucle ICL3 n'a que peu d'effets sur la liaison de ligand, il abolit le couplage aux protéines G, probablement en raison de l'encombrement stérique sur le côté cytoplasmique du récepteur. C'est pourquoi le développement de nouvelles approches est encore nécessaire afin d'élargir le répertoire des outils permettant la stabilisation des RCPG.

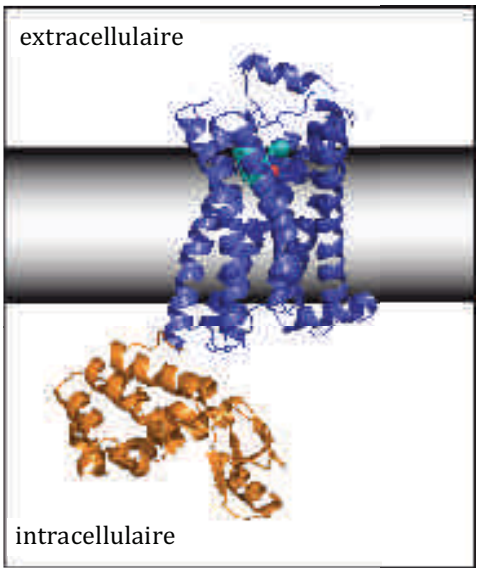


Figure 26 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en fusion avec le lysosyme T4.

Structure du récepteur β2-adrénergique (en bleu) fusionné à la protéine du lysosyme T4 (en orange) en remplacement de la boucle ICL 3 et en complexe avec l'antagoniste carazolol (en cyan) (PDB : 2RH1).

Une seconde stratégie consiste à introduire des mutations ponctuelles dans le but d'améliorer la stabilité des récepteurs solubilisés dans le temps. Une première approche de mutagénèse systématique couplée à des études de thermostabilité a été développée. Par le remplacement un par un de chaque acide aminé de la séquence, de nombreux mutants sont générés, dont la stabilité thermique est analysée par des tests de fixations de ligands après une incubation à des températures croissantes. Certaines mutations ponctuelles améliorent la stabilité thermique des RCPG et la combinaison de plusieurs d'entre elles peut avoir un effet synergique augmentant d'avantage cette thermostabilité (Tate, 2012). Des mutants thermostables ont ainsi été développés pour le récepteur β1-adrénergique (Serrano-Vega *et al.*, 2008 ; Miller & Tate, 2011), le récepteur de l'adénosine A2A (Magnani *et al.*, 2008 ; Lebon *et al.*, 2011a) et le récepteur de la neurotensine NTS1 (Shibata *et al.*, 2009). Cette approche a permis la résolution de la structure du récepteur de l'adénosine A2A (**Figure 27**) et du β1-adrénergique liés à des antagonistes dans un premier temps (Warne *et al.*, 2008 ; Dore *et al.*, 2011 ; Moukhametzianov *et al.*, 2011). Puis, la modification des conditions de sélection a permis d'identifier des mutants thermostables liés à des agonistes et d'en résoudre la structure (Warne *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011b ; White *et al.*, 2012). Une approche alternative de mutagénèse aléatoire a été développée dans le cadre d'une stratégie basée sur

l'évolution de séquence. Dans ce cas, l'isolement des récepteurs thermostabilisés consiste à exprimer des RCPG sous forme fonctionnelle dans *E. coli* et utiliser l'hypothèse que les protéines fortement exprimées sont susceptibles d'être plus thermostables (Dodevski & Pluckthun, 2011), même si l'expression et la thermostabilité ne semblent être que faiblement corrélés. Différentes bactéries, qui contiennent des niveaux élevés de récepteurs fonctionnels, sont sélectionnées grâce à un tri cellulaire par fluorescence activée (FACS), après une exposition des récepteurs à des ligands fluorescents. Grace à cette procédure de sélection sur une banque de mutants aléatoires, trois RCPG ont été thermostabilisés (Sarkar *et al.*, 2008). Cependant, une des conséquences de la thermostabilisation, qui ressort de l'analyse pharmacologique des mutants, est que les récepteurs sont verrouillés dans une seule conformation.

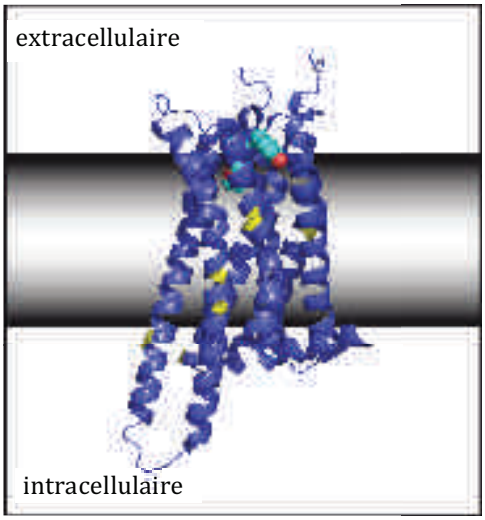


Figure 27 : Représentation de la structure du récepteur de l'adénosine A2A thermostabilisé

Structure du récepteur de l'adénosine A2A (en bleu) thermostabilisé par huit mutations (en jaune) et en complexe avec l'agoniste inverse ZM241385 (en cyan) (PDB : 3PWH).

En outre, il faut noter que, pour la plupart des RCPG cristallisés, les extrémités amino- et/ou carboxy- terminales ont été tronquées afin de réduire la flexibilité des protéines. De plus, quand cela n'a pas d'impact sur la fonctionnalité des récepteurs, les sites de glycosylation et/ou palmitoylation sont souvent mutés pour empêcher les modifications post-traductionnelles, sources d'hétérogénéité. Ces délétions et mutations sont bien souvent combinées aux stratégies de fusion de protéine (Cherezov *et al.*, 2007 ; Hanson *et al.*, 2008) ou de thermostabilisation (Warne *et al.*, 2009 ; Dore *et al.*, 2011), afin d'améliorer au maximum la stabilité des récepteurs. Récemment, la première structure d'un RCPG de la classe B, le CRF1 (corticotropin-releasing factor receptor type 1), a été résolue, en utilisant la combinaison de plusieurs stratégies de stabilisation. En effet, les extrémités amino- et carboxy- terminales ont été délétées, douze mutations thermostabilisantes ont été introduites et le lysosyme LT4 a été fusionné dans la deuxième boucle intracellulaire (ICL2) (Hollenstein *et al.*, 2013).

3.3.2. L'ajout d'agents stabilisants

L'ajout de certains composés ou partenaires protéiques peut avoir un effet sur la stabilité des RCPG. Ceci peut être réalisé dès l'expression, lors de la solubilisation ou encore une fois le récepteur purifié. Des études de thermostabilité ont mis en évidence que différents paramètres peuvent influer sur la stabilité des RCPG, tels que le pH, les lipides, les ligands (Liu *et al.*, 2010).

En effet, les ligands permettent non seulement, d'améliorer la fonctionnalité des RCPG produits lorsqu'ils sont ajoutés dans les milieux de culture dès l'expression (Andre *et al.*, 2006 ; Hassaine *et al.*, 2006), mais aussi d'augmenter la stabilité des récepteurs en détergent (Grisshammer, 2009). On peut remarquer que dans la grande majorité des protocoles décrits, des ligands sont ajoutés lors de la solubilisation et de la purification des RCPG afin de les stabiliser. Il faut noter que les ligands avec des efficacités différentes stabilisent différentes conformations de récepteur (Baneres *et al.*, 2005) et que les complexes avec des agonistes sont souvent moins stables que ceux avec des antagonistes ou agonistes inverses (Gether *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il est possible d'ajouter des lipides au détergent dans le but de rétablir les contacts protéine-lipide nécessaire au repliement correcte des récepteurs. Il se forme alors des micelles mixtes détergents-lipides, qui semblent avoir une structure discoïdale (**Figure 28**) composée d'une sorte de bicouche au centre stabilisée par une ceinture de détergent (Thompson *et al.*, 2011). Ainsi, il a été montré que l'addition de cholestérol ou de dérivé comme le cholestéryl hémisuccinate (CHS) augmente de façon notable la stabilité des RCPG purifiés (Gimpl & Fahrenholz, 2002 ; Weiss & Grisshammer, 2002 ; Hanson *et al.*, 2008). D'autres lipides peuvent également avoir un effet bénéfique pour le repliement, la fonctionnalité et la stabilité des RCPG, tel que l'asolectine, qui est un mélange complexe de différents lipides (Damian *et al.*, 2006), ou des lipides purifiés comme le DMPC (Baneres *et al.*, 2005).

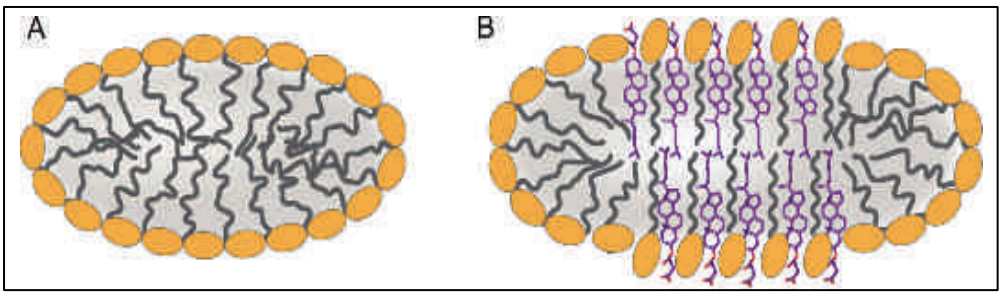


Figure 28 : Représentation schématique d'une micelle de DDM et d'une micelle mixte DDM/CHS

La modelisation d'une micelle de détergent DDM seul (A) et d'une micelle mixte de détergent DDM et de lipide CHS (B) montre la modification de la morphologie de la micelle lors de l'ajout de lipide (Thompson *et al*., 2011).

L'interaction avec une protéine partenaire peut également avoir un effet stabilisant sur les RCPG, notamment si elle implique des régions flexibles. Par exemple, l'utilisation d'anticorps est une méthode traditionnelle pour traiter les problèmes de flexibilité et d'instabilité des protéines. Dans le cas des RCPG, des anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique du récepteur, en particulier la boucle intracellulaire 3 (ICL3), permet de stabiliser cette région non structurée et flexible. Par exemple, le fragment d'anticorps Fab5, qui reconnaît la jonction entre l'ICL3 et l'hélice 5 et l'hélice 6 limitant ainsi le mouvement de ces deux hélices, a permis de stabiliser et de résoudre la première structure du récepteur β2-adrénergique dans une conformation inactive (Rasmussen *et al.*, 2007). Le récepteur de l'adénosine A2A a également été cristallisé, en complexe avec un fragment d'anticorps, le Fab2838, le stabilisant dans une conformation inactive (Hino *et al.*, 2012). Une autre structure du récepteur β2-adrénergique a été résolue en complexe cette fois avec le Nanobody Nb80 (**Figure 29**). Un Nanobody est un fragment d'anticorps de taille minimale correspondant au domaine de liaison d'antigène dérivé des anticorps de camélidés. Le Nb80 reconnaît également les extrémités intracellulaires des hélices 5 et 6, mais en plus sa boucle CDR3 est insérée dans une poche hydrophobe du récepteur, notamment entre les hélices 3 et 6. Ainsi le Nb80 mime la fixation de la protéine G et stabilise le récepteur dans une conformation active (Rasmussen *et al.*, 2011a). Cette méthode de stabilisation par des anticorps apparaît efficace, cependant elle n'est pas facile à appliquer car elle nécessite un gros travail de production et purification de RCPG et d'anticorps en amont.

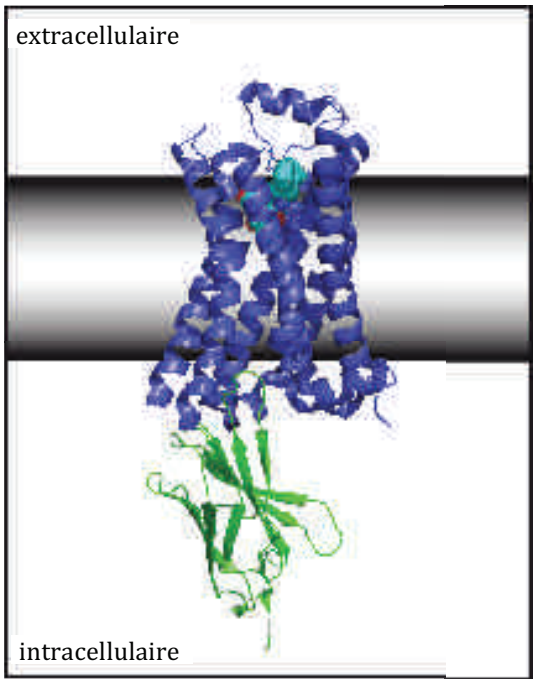


Figure 29 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en complexe avec le Nb80

Structure du récepteur β2-adrénergique fusioné à un fragment de LT4 (en bleu) lié à l'agoniste BI-167107 (en cyan) et en complexe avec le Nanobody Nb80 (en vert) (PDB : 3P0G).

Les partenaires protéiques qui interagissent naturellement avec les RCPG peuvent également aider à leur stabilisation. Par exemple, la structure du récepteur β2-adrénergique lié à la protéine G sous sa forme hétérotrimérique a ainsi été résolue dans une conformation active (**Figure 30**). Il faut noter que cette structure a été obtenue en combinant différentes stratégies de stabilisation. La protéine du lysozyme T4 (LT4) a été fusionnée à l'extrémité N-terminale du récepteur, lui-même lié à un agoniste, et le Nanobody Nb35 a permis de réduire la flexibilité de la sous-unité α de la protéine G (Rasmussen *et al*., 2011b). Le grand nombre de protéines d'interaction naturelles des RCPG offre un large panel d'outils de stabilisation potentiels.

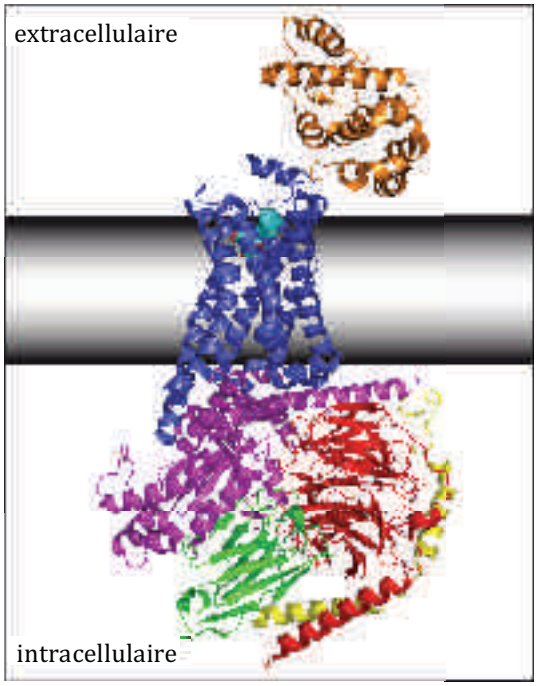


Figure 30 : Représentation de la structure du récepteur β2-adrénergique en complexe avec la prtéine G héterotrimérique

Structure du récepteur β2-adrénergique (en bleu) fusionné à la protéine du lysosyme LT4 à l'extrémité N-terminale (en orange) lié à l'agoniste BI-167107 (en cyan) et en complexe avec la protéine G héterotrimérique (α en rose, β en rouge, γ en jaune). La sous-unité α de la protéine G est stabilisée par le Nanobody Nb35 (en vert) (PDB : 3S6N).

3.3.3. Le changement de l'environnement hydrophobe

Une autre approche consiste à modifier l'environnement de la protéine. Il s'agit dans ce cas d'utiliser des surfactants originaux ou des systèmes de reconstitution lipidiques qui permettent de maintenir la structure native du récepteur mieux que ne le font les détergents classiques (Popot, 2010).

Une première catégorie regroupe les surfactants originaux basés sur les détergents. Ce sont des détergents modifiés ou des molécules similaires par leur taille et leur propriété physicochimique en solution, mais qui semblent plus à même de préserver le repliement tridimensionnel des RCPG. Par exemple, les MNG (maltose-néopentylglycol) sont des détergents modifiés avec notamment un carbone quaternaire central qui réduit la flexibilité de ces molécules. Ils permettent d'extraire les protéines de la membrane et de mieux les stabiliser en solution mieux que les détergents classiques

(Chae *et al*., 2010). Les MNG ont ainsi été utilisés pour stabiliser et cristalliser le récepteur β2-adrénergique (Rosenbaum *et al*., 2011 ; Rasmussen *et al*., 2011a ; Rasmussen *et al*., 2011b) et le -opioïde (Manglik *et al*., 2012). Des détergents à chaine ramifiée ont également été développés. Ils contiennent une courte chaine alkyle ramifiée à l'interface entre la tête polaire et la queue hydrophobe. Ils imitent ainsi une molécule de lipide avec une deuxième chaine aliphatique, ce qui réduit la pénétration de l'eau et augmente le caractère hydrophobe à l'intérieur de la micelle. Ces détergents à chaine ramifiée pourraient s'avérer plus efficaces pour la solubilisation, la stabilisation et la cristallisation des protéines membranaires (Hong *et al*., 2010). Les détergents fluorés et hémifluorés ont la particularité d'avoir des atomes de fluor dans leur chaîne hydrocarbonée. Les alcanes et alcanes perfluorés étant peu miscibles, ces composés ne piègent pas les lipides et cofacteurs, diminuant ainsi la dénaturation des protéines (Barthelemy *et al.*, 1999 ; Breyton *et al.*, 2010). Ces molécules ont montré un effet stabilisant sur plusieurs protéines membranaires intégrales (Chabaud *et al.*, 1998), mais elles ont encore été peu utilisées pour les RCPG.

Une autre catégorie de surfactants originaux est celle des amphipols. Ces polymères amphiphiles sont constitués d'une chaine hydrophile greffée avec de nombreuses chaines alkyles hydrophobes leurs permettant de s'associer à la surface transmembranaire des protéines par de multiples points de contact (Popot *et al.*, 2011). Les amphipols n'ont pas la capacité d'extraire les protéines membranaires des bicouches lipidiques mais peuvent être substitués aux détergents une fois les protéines solubilisées et les maintenir en solution en s'adsorbant sur leurs parties hydrophobes (**Figure 31**). Ils forment ainsi un complexe stable fournissant aux protéines un environnement plus doux et moins dénaturant que celui fourni par les détergents. Les raisons pour lesquelles les amphipols stabilisent les protéines membranaires sont multiples mais comprennent très certainement leur efficacité limitée à perturber les interactions protéine-protéine et protéines-lipides, dans l'hypothèse où le caractère dissociant des détergents est l'une des principales raisons de la dénaturation progressive (Breyton *et al.*, 2010). Plusieurs études ont en effet montré que les protéines membranaires étaient plus stables en amphipols qu'en détergents (Tribet *et al.*, 1996 ; Gohon *et al.*, 2008). Ces dernières années plusieurs types de polymères ont été développées en faisant varier leurs propriétés physicochimiques. Le prototype appelé A8-35 est de loin le plus étudié et le plus largement utilisé. La présence de groupes carboxylates le rend très soluble dans l'eau mais insoluble dans les solutions acides (Gohon *et al.*, 2004 ; Gohon *et al.*, 2006). Cette limitation a suscité le développement de structures chimiques alternatifs tels que les amphipols sulfonés (Picard *et al.*, 2006) et les amphipols non ioniques à base de glucose (Sharma *et al.*, 2008 ; Bazzacco *et al.*, 2009 ; Bazzacco *et al.*, 2012), qui sont tous deux insensible au pH. En plus de mieux stabiliser les protéines, les amphipols présentent l'avantage de former des complexes

protéine/amphipol très stables. Ainsi, la protéine stabilisée en amphipols se comporte pratiquement comme une protéine soluble, ce qui permet de travailler absence de tout surfactant dans les tampons et facilite les études fonctionnelles et structurales (Popot *et al.*, 2003 ; Zoonens *et al.*, 2005 ; Charvolin *et al.*, 2009). De plus, les amphipols ont également été utilisés avec succès pour la renaturation *in vitro* des RCPG, après expression en corps d'inclusion bactériens et purification en conditions dénaturantes (Pocanschi *et al.*, 2006 ; Dahmane *et al.*, 2009 ; Baneres *et al.*, 2011).

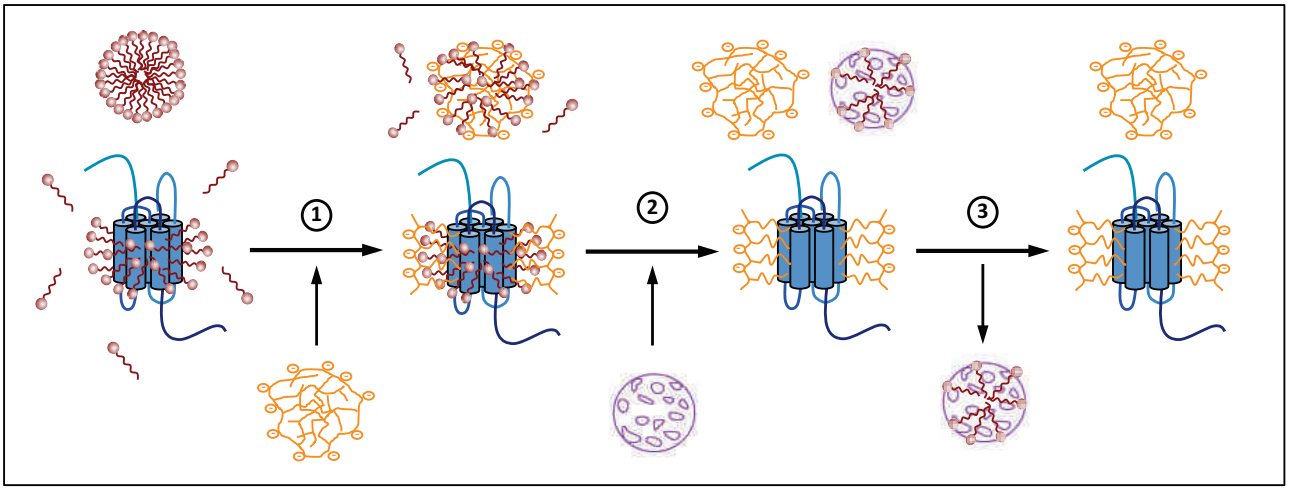


Figure 31 : Représentation schématique de l'échange des détergents par des amphipols.

(1) Les amphipols (en orange) sont ajoutés à l'échantillon contenant les RCPG (en bleu) solubilisés en détergent (en bordeau). Il se forme alors des complexes RCPG-détergents-amphipols et des complexes détergents-amphipols. **(2)** Des billes de polystyrène (en violet) sont ensuites ajoutées afin d'éliminer les détergents. Les RCPG sont maintenus en solution par les amphipols adsorbés sur les parties hydrophobes tandis que les détergents sont piégés par les billes de polystyrène. **(3)** Les billes de polystyrène chargées en détergents sont finalement éliminées par centrifugation. On obtient ainsi un échantillon de RCPG maintenus en solution par les amphipols en absence de détergent.

Une autre possibilité, pour stabiliser les récepteurs sous forme fonctionnelle, consiste recréer un environnement qui mime au plus près la membrane, en utilisant des systèmes de reconstitution lipidiques, tels que les liposomes ou les nanodisques. Les liposomes sont des vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques. Ils peuvent être composés d'une grande variété de lipide et avoir différentes tailles en fonction du processus de fabrication. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour la reconstitution des protéines membranaires dans des liposomes. Les protéines peuvent par exemple être directement synthétisées *in vitro* en présence de liposomes préformés. La méthode la plus utilisée consiste à solubiliser les lipides en détergents, auxquels les protéines purifiées en détergent sont ajoutées, puis provoquer la formation spontanée des protéoliposomes par l'élimination du détergent (**Figure 32**) (Rigaud & Levy, 2003). La reconstitution de RCPG dans des lipososmes a déjà été réalisée avec succès pour le récepteur de l'histamine H1 (Ratnala *et al.*, 2004) et aux canabinoïdes CB2 (Yeliseev *et al.*, 2005 ; Yeliseev *et al.*, 2007). Les protéoliposomes ont de multiples applications. Par exemple, le récepteur β2-adrénergique reconstitué dans des vésicules

phospholipidiques a été utilisé pour immuniser des souris et produire un anticorps monoclonal spécifique de ce récepteur, le Mab5 (Day *et al.*, 2007).

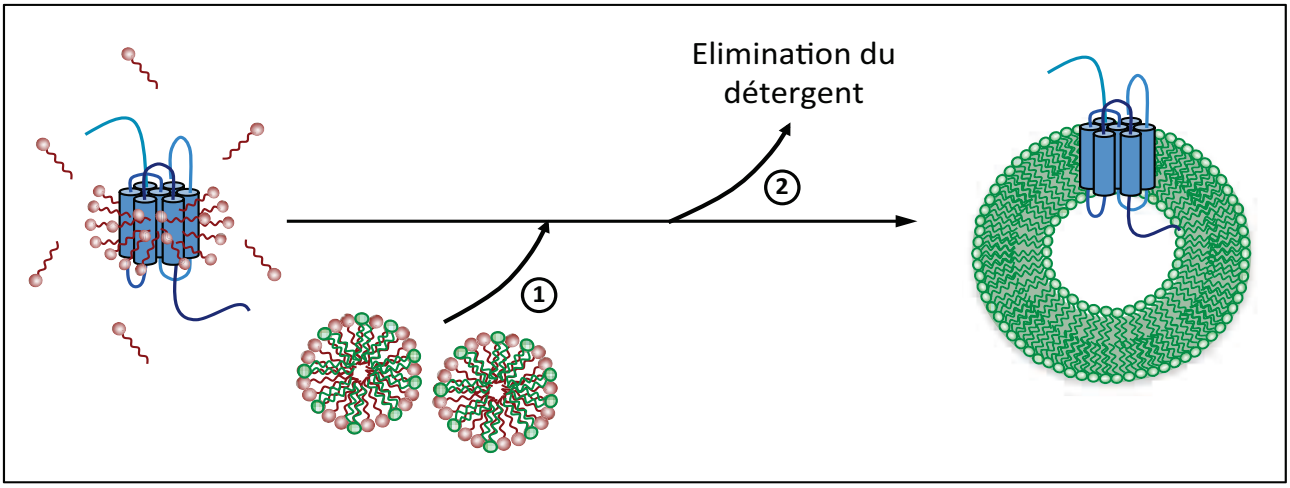


Figure 32 : Schéma représentant une méthode de reconstitution de RCPG en liposome.

(1) Des lipides (en vert) solubilisés en détergents (en bordeau) sont ajoutés à l'échantillon contenant les RCPG (en bleu) solubilisés en détergents (en bordeau). **(2)** Les détergents sont ensuite éliminés (par des billes de polystyrène, dialyse ou chromatographie d'exclusion…) permettant ainsi la formation spontannée de liposomes avec des RCPG intégrés dans la bicouche lipidique appelés protéoliposomes.

Les nanodisques sont de petits disques de bicouche lipidique dont la structure est stabilisée par des lipoprotéines hélicoïdales appelées MSP (membrane scaffolding protein). Des lipides solubilisés à l'aide de détergent mis en présence de MSP vont former spontanément des nanodisques par élimination des détergents (Bayburt & Sligar, 2010). Les nanodisques peuvent être utilisés pour la reconstitution de protéines membranaires dans un environnement lipidique. En effet, les protéines purifiées en détergent mises en présence des MSP et des lipides vont être incorporées simultanément lors de l'assemblage des nanodisques (**Figure 33**). Les nanodisques constituent alors un environnement phospholipidique proche de la membrane qui favorise le maintien de la fonctionnalité de la protéine insérée. Cette approche a été employée avec succès pour plusieurs RCPG, comme le β2-adrénergique (Leitz *et al.*, 2006 ; Whorton *et al.*, 2007 ; Yao *et al.*, 2009) ou le -opioïde (Kuszak *et al.*, 2009). La composition en lipide peut être défini et adaptée à la protéine que l'on souhaite reconstituer. De plus, il existe des MSP de tailles variables qui permettent la formation de disques de différents diamètres. Ceci permet d'adapter la taille du nanodisque à celle de la protéine et de contrôler l'état oligomérique lors de l'incorporation de celle-ci (Bayburt *et al.*, 2007). Les nanodisques sont stables et se comportent comme des particules solubles ce qui permet de travailler en absence de détergent ou lipide dans les tampons et facilite les études *in vitro* (Gluck *et al.*, 2011). Ce système offre des possibilités extrêmement intéressantes pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'activation des RCPG. De récents travaux réalisés sur le récepteur de

la ghréline reconstitué en nanodisque illustrent parfaitement les possibilités de cette approche (Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013).

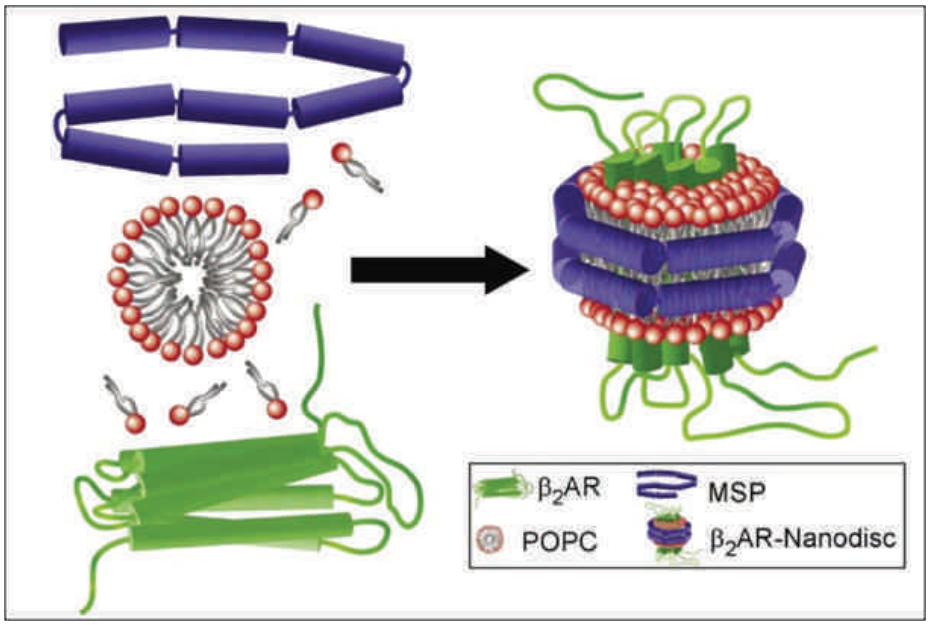


Figure 33 : Représentation schématique de la reconstitution d'un RCPG en nanodiques.

Dans cet exemple, le récepteur β2-adrénergique (β2-AR, en vert) est mis en présence de MSP (Membrane Scafolding Protein, en violet) et de lipides POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine, en rouge). L'élimination des détergents solubilisant les différents constituant de l'échantillon va initier l'assemblage spontanné des nanodisques et l'intégration simultannée du RCPG (Leitz *et al*., 2006).

Même s'il n'existe pas de méthode générale pour la production, la purification et la stabilisation de RCPG, le développement de ces nouveaux outils a permis de grandes avancées dans le domaine ces dernières années et ouvre des perspectives prometteuses pour l'étude structurale et l'analyse dynamique de ces protéines membranaires. Le choix d'une stratégie optimisée vis-à-vis d'un RCPG reste un défi qui doit tenir compte des particularités de chaque récepteur et des études que l'on souhaite réaliser.

4. Les RCPG étudiés dans ce projet

Cette étude a été menée en parallèle sur un récepteur d'intérêt, le récepteur de la mélatonine MT1, qui est très étudié par la société Servier et présente un intérêt thérapeutique important, et sur un RCPG de référence pour le développement et la validation de techniques biophysiques, le récepteur de l'adénosine A2A, pour lequel des études *in vitro* ont été décrites dans la littérature.

4.1. Le récepteur de la mélatonine MT1

4.1.1. La mélatonine

La mélatonine, ou N-acetyl-5-methoxytrypamine, est composée d'une fonction amine branchée sur un cycle indole (**Figure 34**), dont les deux groupes fonctionnels sont déterminant pour la spécificité de reconnaissance, mais aussi pour ses propriétés amphiphiles, lui permettant à la fois de circuler dans le sang et de traverser les membranes, et pour son oxydation chimique (Hardeland *et al.*, 2006). La mélatonine est une neurohormone synthétisée au cours de la nuit principalement par la glande pinéale (Arendt, 1998). Sa production est contrôlée par la photopériode (la succession des jours et des nuits) grâce au noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus. La lumière de l'environnement est captée par la rétine, qui transmet l'information au noyau suprachiasmatique qui la relaie jusqu'à la glande pinéale par une voie multi-synaptique (Reppert & Weaver, 2002). La mélatonine n'est pas stockée dans la glande pinéale, elle est directement sécrétée dans le sang pour être distribuée dans tout l'organisme (Pevet, 1998). Plusieurs études ont montré que la mélatonine était également produite dans d'autres organes comme le cerveau, la rétine, le tractus gastro-intestinal, la moelle osseuse, les lymphocytes, ou encore la peau (Bubenik, 2002 ; Pandi-Perumal *et al.*, 2008 ; Slominski *et al.*, 2008). Dans ces organes la mélatonine n'est pas sécrétée dans la circulation générale, elle agit localement en mode autocrine ou paracrine (Tan *et al.*, 2003 ; Slominski *et al.*, 2008).

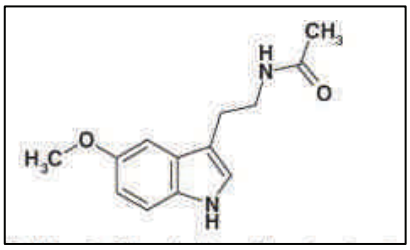


Figure 34 : Représentation de la structure de la mélatonine.

La mélatonine, ou N-acetyl-5-methoxytrypamine, est une molécule composée d'une fonction amine branchée sur un cycle indole (Hardeland *et al.*, 2006).

La synthèse de la mélatonine est réalisée en quatre étapes à partir du tryptophane, un acide-aminé essentiel (**Figure 35**). Tout d'abord, le tryptophane est hydroxylé en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane-5-hydroxylase (TPH). Puis, il est décarboxylé en 5-hydroxytryptamine (5HT, sérotonine) par une enzyme aromatique-L-amino acide décarboxylase (AAAD). Puis la sérotonine est acétylée en N-acétylsérotonine par l'enzyme arylalkylamine N-acétyl-transférase (AANAT). Finalement, elle est méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) pour donner la mélatonine. L'acétylation de la sérotonine par l'AANAT est l'étape limitante dans la voie de biosynthèse de la mélatonine, qui contrôle le taux de mélatonine produite (Huang *et al.*, 2013). Pour la dégradation de la mélatonine, il existe trois voies principales. La voie hépatique classique, où la mélatonine est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine par les cytochromes P450 mono-oxygénases hépatiques, qui est ensuite conjuguée à un sulfate ou un acide glucuronique pour être finalement

éliminé dans les urines. La voie kyrunique se produit essentiellement dans le cerveau, où le cycle pyrrole de la mélatonine est clivé par de multiples réactions enzymatiques, produisant deux kynuréramines, la N-acétyl-N-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK), transformée ensuite en N-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK) (Pandi-Perumal *et al.*, 2006a). La voie indolique est réalisée dans les tissus d'origine neuronale, comme la rétine et la glande pinéale, où la mélatonine est désacétylée en 5-méthoxy-tryptamine, puis désaminée en 5-méthoxyindole acétaldehyde et finalement soit oxydée en acide 5-méthoxyindoleacétique, soit une réduite en 5-méthoxytryptophol (Huang *et al.*, 2013).

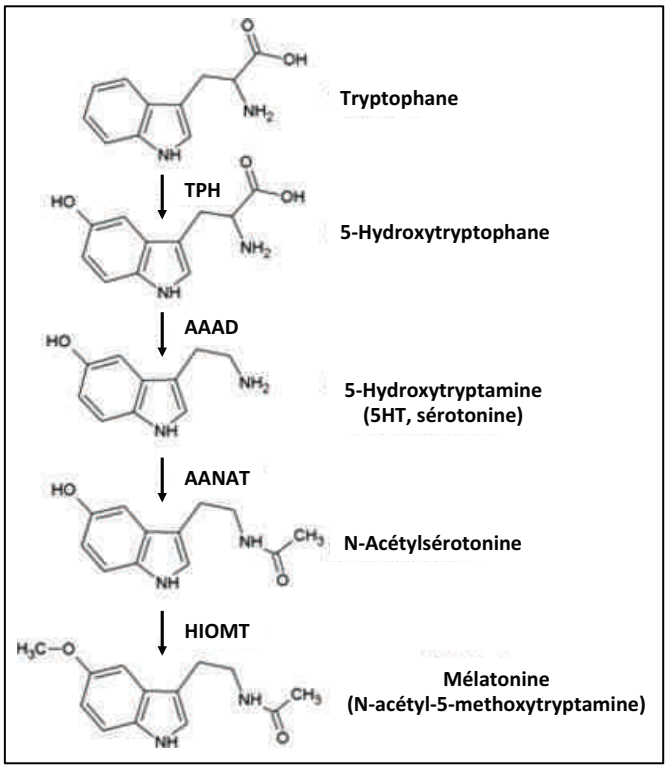


Figure 35 : Schéma de la voie de biosynthèse de la mélatonine.

La mélatonine est synthétisée à partir du tryptophane dans un processus en quatre étapes impliquant quatre enzymes différentes. TPH: tryptophane-5-hydroxylase, AAAD: aromatique-L-amino acide décarboxylase, AANAT: arylalkylamine N-acétyl-transférase, HIOMT: l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (adapté de (Slominski *et al*., 2012).

L'effet le plus connu de la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques aussi bien à l'échelle de la saison qu'à l'échelle de la journée avec le rythme circadien (Hardeland *et al.*, 2006). Néanmoins, elle possède également des rôles antimitotiques et antioxydants. La mélatonine peut piéger des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Gomez-Moreno *et al.*, 2010) et activer les enzymes cytoprotectrices (Rodriguez *et al.*, 2004) atténuant ou neutralisant ainsi le stress oxydatif et régulant le métabolisme cellulaire (Slominski *et al.*, 2005 ; Tan *et al.*, 2007 ; Slominski *et al.*, 2008 ; Korkmaz *et al.*, 2009). De plus, la mélatonine est également impliquée par son interaction avec des récepteurs dans les fonctions cérébrales, immunitaires, gastro-intestinales, cardiovasculaires, rénales, osseuses et endocriniennes (Pandi-Perumal *et al.*, 2008 ; Slominski *et al.*, 2008 ; Leja-Szpak *et al.*, 2010 ; Celinski *et al.*, 2011).

4.1.2. Les récepteurs de la mélatonine

Deux RCPG liant la mélatonine ont été identifiés et caractérisés, noté MT1 et MT2 (Dubocovich *et al.*, 2010). Un troisième site de fixation de la mélatonine a été identifié, nommé MT3, qui s'est avéré ne pas être un RCPG mais une enzyme cytosolique : la quinone réductase 2 (Nosjean *et al.*, 2000 ; Vincent *et al.*, 2010). De plus, il existe également des récepteurs nucléaires de la mélatonine (Acuna-Castroviejo *et al.*, 1994). Par ailleurs, un RCPG orphelin, appelé GPR50 ou MRR (pour Melatonin Related Receptor), possède 45% d'homologie avec les récepteurs de la mélatonine (Dufourny *et al.*, 2008). Cependant, malgré cette homologie, la mélatonine ne se lie pas à GPR50 et l'identité de son véritable ligand n'est pas connue (Reppert *et al.*, 1996). Toutefois, il est intéressant de noter que GPR50 peut s'hétérodimériser avec le récepteur MT1 et inhiber son activité (Levoye *et al.*, 2006 ; Levoye *et al.*, 2006a).

Les RCPG MT1 et MT2 possèdent environ 60% d'homologie de séquence (Reppert *et al.*, 1996). Tous deux présentent une haute affinité pour la mélatonine (Kd = 10 à 200 pM), mais sont discernables par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs (Sugden *et al.*, 1999 ; Nonno *et al.*, 2000 ; Audinot *et al.*, 2003).

Les récepteurs MT1 et MT2 sont exprimés individuellement ou ensemble dans divers tissus de l'organisme, aussi bien au niveau central que périphérique. Ils ont tous deux été retrouvés dans le cerveau (cervelet, hippocampe, hypothalamus, hypophyse, NSC), la rétine, le système cardiovasculaire (vaisseaux sanguins périphériques, aorte et cœur), le système immunitaire, les organes génitaux (testicules, ovaires), les glandes mammaires, les reins et la peau. MT1 a également été localisé dans le foie, la vésicule biliaire, le cortex surrénalien, le pancréas et la rate. MT2 lui a été détecté dans les tissus adipeux, les poumons, le tube digestif et le duodénum (Dubocovich & Markowska, 2005 ; Pandi-Perumal *et al.*, 2008 ; Slominski *et al.*, 2012).

Les récepteurs MT1 et MT2 sont tous deux majoritairement couplés aux protéines Gi qui inhibent l'adénylate cyclase et la formation d'AMPc. Dans une moindre mesure, ils sont également couplés à la protéine Gq/11 qui active la phospholipase C. Globalement, les voies de signalisation dépendante de la protéine G activées par les récepteurs MT1 et MT2 sont très similaires (Jockers *et al.*, 2008). Des différences spécifiques des sous-types n'ont été signalées que dans certains cas. Par exemple, dans les cellules HEK293 le récepteur MT2 inhibe la formation de GMPc par la voie de la guanylate cyclase, mais pas MT1 (Petit *et al.*, 1999 ; Brydon *et al.*, 1999a ; Brydon *et al.*, 1999b). De même, l'activation de la protéine kinase C dans le NSC ne se produit que par les récepteurs MT2 et pas MT1, en dépit de l'expression des deux sous-types de récepteurs (Hunt *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a été mis en évidence par des études de BRET que MT1 et MT2 peuvent tous deux former des homodimères et hétérodimères (Ayoub *et al.*, 2002). En outre, il a été démontré que les homodimères MT1 se produisent à peu près au même rythme que les hétérodimères MT1-MT2, tandis que les homodimères MT2 sont environ 3 à 4 fois moins abondants que les hétérodimères (Ayoub *et al.*, 2004). Cependant, on ignore encore si des propriétés pharmacologiques ou des effets physiologiques de la mélatonine sont dépendants de la formation de ces différentes espèces dimériques (Slominski *et al.*, 2012).

4.1.3. Effets et rôles

Un des effets les plus connus de l'activation des récepteurs MT1 et MT2 par la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques aussi bien à l'échelle de la saison qu'à l'échelle de la journée, avec des implications dans les troubles du sommeil ainsi que la dépression. Néanmoins, ils ont également des fonctions au niveau cognitif, oculaire et dans les systèmes cardiovasculaires, immunitaires ou encore endocriniens.

La mélatonine, dont la production est contrôlée par la photopériode, permet de synchroniser le rythme circadien et joue un rôle important dans la régulation du sommeil (Arendt & Skene, 2005). L'administration de mélatonine exogène permet de traiter des symptômes liés à un bouleversement du rythme circadien, comme par exemple, le décalage horaire (Herxheimer, 2005), le travail de nuit (Arendt & Skene, 2005), le syndrome de retard à l'endormissement (Dahlitz *et al.*, 1991 ; Nagtegaal *et al.*, 2000), ou encore les troubles du sommeil liés à une perturbation du rythme circadien chez les aveugles (Sack *et al.*, 2000) et les personnes âgées (Zisapel, 2007). Le développement d'agonistes non sélectifs des récepteurs MT1 et MT2, tels que le Rameltéon (Rozerem™) (Roth *et al.*, 2005 ; Pandi-Perumal *et al.*, 2007) ou l'Agomélatine (Valdoxan™) (Dubocovich, 2006 ; Pandi-Perumal *et al.*, 2006b), en plus d'une préparation de mélatonine à libération prolongée (Circadin™) (Garfinkel *et al.*, 1995 ; Leger *et al.*, 2004 ; Lemoine *et al.*, 2007 ; Wade *et al.*, 2007), a démontré que les récepteurs de la mélatonine joue un rôle important dans la régulation du sommeil. Des essais, sur des patients souffrant d'insomnie ou des personnes âgées, ont montré une amélioration considérable de la latence d'endormissement et de la qualité du sommeil par un traitement avec le Rameltéon (Roth *et al.*, 2005 ; Roth *et al.*, 2006), tout comme avec le Circadin (Garfinkel *et al.*, 1995 ; Lemoine *et al.*, 2007 ; Wade *et al.*, 2007). L'Agomélatine, qui est un agoniste des récepteurs MT1 et MT2, mais aussi un antagoniste des récepteurs à sérotonine 5-HT2C (Loo *et al.*, 2002 ; Millan, 2005 ; Delagrange & Boutin, 2006), possèdent également des effets sur la phase circadienne (Leproult *et al.*, 2005) et le sommeil, qui ont été décrits chez l'homme (Zupancic & Guilleminault, 2006).

De nombreuses études ont suggéré un lien entre la dépression et les anomalies du système circadien. En effet, près de 80% des patients déprimés présentent des troubles profonds du sommeil (Wehr & Goodwin, 1979 ; Armitage & Hoffmann, 2001). Cela semble se produire dans différents types de dépression, mais c'est particulièrement évident dans la dépression saisonnière (Wehr & Goodwin, 1979). La mélatonine semble impliquée dans les troubles de l'humeur, et notamment dans les troubles affectifs saisonniers (Srinivasan *et al.*, 2006a). Des études sur des souris ont indiqué que le manque de signalisation par MT1 contribue aux troubles du comportement et augmente la dépression (Weil *et al.*, 2006). Même si un lien entre la mélatonine et la dépression n'a pas été clairement démontré, l'administration de mélatonine a considérablement amélioré la qualité du sommeil (Leppamaki *et al.*, 2003) et l'humeur dépressive (Lewy *et al.*, 1998) chez les personnes présentant un trouble affectif saisonnier. De plus, il est intéressant de noter que l'Agomélatine, agoniste des récepteurs MT1 et MT2 et antagoniste des récepteurs 5-HT2C, possède des propriétés anxiolytiques (Millan, 2005) et antidépressives (Dubocovich, 2006 ; Pandi-Perumal *et al.*, 2006b).

Par ailleurs, la mélatonine semble être impliquée dans certains aspects de la mémoire. Des études suggèrent l'implication de l'horloge circadienne et de la mélatonine dans le traitement de la mémoire pendant la nuit chez l'homme (Gorfine & Zisapel, 2007). De plus, des études ont montré que chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la densité des récepteurs MT2 était diminuée, tandis que celle des récepteurs MT1 était augmentée, probablement en réponse à l'altération de la sécrétion de mélatonine (Savaskan *et al.*, 2002 ; Savaskan *et al.*, 2005). Ceci suggère que le récepteur MT2 pourrait être impliqué dans cette pathologie dont la caractéristique dominante est la déficience cognitive (Srinivasan *et al.*, 2006b).

L'expression généralisée des récepteurs de la mélatonine dans les tissus oculaires suggèrent que la mélatonine joue un rôle dans la régulation différentielle de la taille des yeux et de la réfraction (Rada & Wiechmann, 2006). Dans la rétine, la mélatonine régule l'activité des photorécepteurs. Durant la phase obscure, un fort taux de mélatonine intra-rétinien induit un allongement des cônes et une contraction des bâtonnets, ce qui permet l'adaptation de la rétine à la diminution de l'intensité lumineuse (Vanecek, 1998 ; Tosini, 2000). Les récepteurs de la mélatonine dans l'oeil jouent également un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'humeur aqueuse et de la pression intraoculaire (Osborne & Chidlow, 1994).

Dans le système cardiovasculaire, la mélatonine s'est avérée avoir un effet un vasodilatateur dans l'artère mésentérique et l'aorte (Girouard *et al.*, 2001), tandis que dans l'artère caudale, elle a un effet vasoconstricteur (Krause *et al.*, 1995 ; Ting *et al.*, 1997). Des études plus approfondies sur le rôle respectif de MT1 et MT2 dans l'activité vasculaire ont montré que MT1 est un médiateur de

la vasoconstriction, tandis que MT2 favorise la vasodilatation (Masana *et al.*, 2002). De plus, d'autres études ont mis en évidence que la mélatonine pouvait réduire la pression artérielle systolique chez les humains et avait donc une utilisation pharmacologique potentielle en tant qu'hypertenseur (Paulis *et al.*, 2010).

La mélatonine est également immunomodulateur chez les animaux et chez l'homme (Maestroni, 2001 ; Srinivasan *et al.*, 2005), dont le rôle est lié en partie à son action sur les récepteurs spécifiques de la mélatonine situés dans les cellules immunocompétentes (Maestroni *et al.*, 2002). Cependant des études ont montré, d'une part, que la stimulation de la production d'interleukines IL-2 et IL-6 par la mélatonine semblait plutôt passer via des récepteurs nucléaires (Garcia-Maurino *et al.*, 2000) et d'autre part, que l'amélioration de la fonction immunitaire cellulaire et humorale induite par la mélatonine semblait être médiée plutôt par les récepteurs MT2 (Drazen *et al.*, 2001 ; Drazen & Nelson, 2001).

La mélatonine semble aussi jouer un rôle clé dans la régulation du système endocrinien. Ces rôles incluent la régulation de la libération de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), la stimulation de la sécrétion d'ocytocine, la promotion de la synthèse de la progestérone, la régulation de la production de cortisol, et la promotion de la production d'androgènes (Schaeffer & Sirotkin, 1995 ; Balik *et al.*, 2004 ; Tamura *et al.*, 2008 ; Tamura *et al.*, 2009). Par exemple, il a été montré que la mélatonine réduit la libération de la GnRH et que l'inhibition des récepteurs de la mélatonine par l'antagoniste luzindole, atténue cet effet (Roy *et al.*, 2001). Dans une autre étude, il a été mis en évidence que le récepteur MT1 inhibe directement la production de cortisol par les glandes surrénale (Torres-Farfan *et al.*, 2003).

4.2. Le récepteur de l'adénosine A2A :

4.2.1. L'adénosine

L'adénosine est un nucléoside formé d'une base azotée adénine et d'un ribose liés par une liaison N-glucosidique (**Figure 36**). Elle peut être associée à des groupements phosphate, on parle alors d'adénosine monophosphate (AMP), d'adénosine diphosphate (ADP), ou d'adénosine triphosphate (ATP). L'adénosine participe à la formation des acides nucléiques (ADN et ARN). Elle joue également des rôles majeurs dans le métabolisme, tel que le transfert d'énergie, notamment par l'ATP qui est une molécule énergétique dont l'hydrolyse de la liaison phosphodiester libère de l'énergie, ou la transduction de signaux intracellulaires via l'AMP cyclique (AMPc) qui est un second messager.

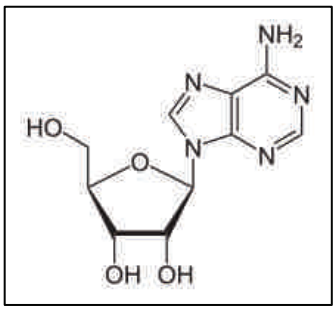


Figure 36 : Représentation de la structure de l'adénosine.

L'adénosine est un nucléoside formé d'une base azotée adénine et d'un ribose liés par une liaison N-glucosidique.

L'adénosine n'est pas un neurotransmetteur classique car elle n'est pas majoritairement produite et libérée par des vésicules en réponse à une décharge neuronale. La plupart des tissus et des cellules de l'organisme libèrent de l'adénosine dans le milieu extracellulaire. L'adénosine intracellulaire peut provenir de l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) ou des nucléotides ATP, ADP, AMP. Cependant, l'adénosine produite à l'intérieur de la cellule ne diffuse pas librement à travers la membrane, elle est transportée à l'extérieur par des transporteurs nucléosidiques ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) (King *et al.*, 2006). L'adénosine peut aussi être produite directement dans le milieu extracellulaire par l'hydrolyse de nucléotides extracellulaires ATP, ADP, AMP. La formation d'adénosine à partir des nucléotides est réalisée par une réaction enzymatique en deux étapes. Tout d'abord, l'ATP et l'ADP sont convertis en AMP par des enzymes ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase), puis l'ecto-5'-nucléotidase (NT5E, aussi connue sous le nom de CD73) hydrolyse l'AMP en adénosine (Zimmermann, 2000). L'adénosine extracellulaire est également soumise à la dégradation métabolique en inosine par l'adénosine désaminase et à la re-phosphorylation en AMP par l'adénosine kinase (**Figure 37**) (Jacobson, 2009).

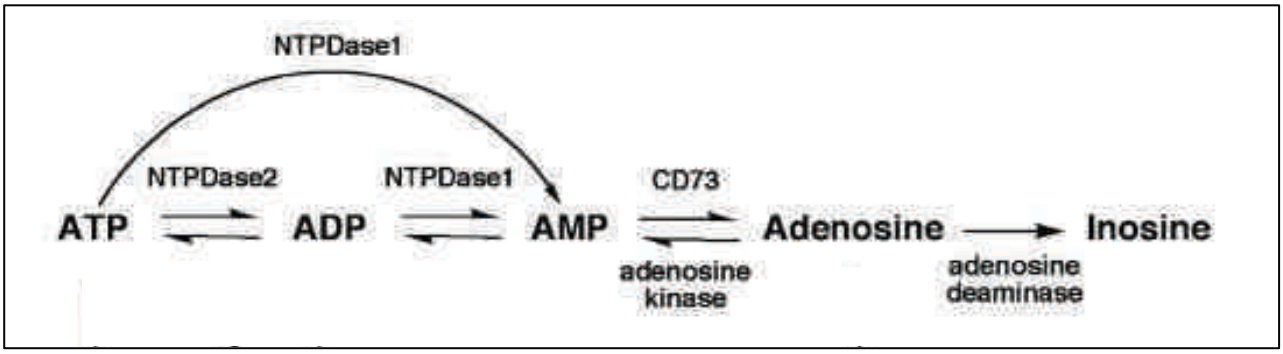


Figure 37 : Schéma des voies de synthèse et de dégradation de l'adénosine extracellulaire.

L'adénosine peut être produite directement dans le milieu extracellulaire par l'hydrolyse des nucléotides extracellulaires. L'ATP et l'ADP sont convertis en AMP par des NTPDase (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolases) puis l'AMP est hydrolysé en adénosine par CD73 (l'ecto-5'-nucléotidase). L'adénosine extracellulaire est également soumise à la dégradation métabolique en inosine par l'adénosine désaminase et à la re-phosphorylation en AMP par l'adénosine kinase. Adapté de (Jacobson, 2009).

Les niveaux de base de l'adénosine extracellulaire ont été estimés à environ 100 nM dans le cœur et 20 nM dans le cerveau. En condition de stress, comme lors d'anoxie ou d'ischémie, les niveaux peuvent rapidement s'élever à des concentrations micromolaires. L'adénosine extracellulaire agit comme un modulateur local avec une fonction généralement cyto-protectrice dans le corps. Elle est impliquée dans la protection et la réparation tissulaire par l'augmentation du taux d'oxygène fourni, le conditionnement des cellules pour les protéger contre les lésions ischémiques, le déclenchement des réponses anti-inflammatoires et la promotion de l'angiogenèse et de la vasodilatation (Linden, 2005).

4.2.2. Les récepteurs de l'adénosine

Il existe quatre sous-types de récepteur de l'adénosine notés A1, A2A, A2B et A3, dont chacun présente un profil pharmacologique, des propriétés de signalisation et une distribution tissulaire unique. Parmi les récepteurs humains, l'homologie de séquence est de 49% entre A1 et A3 et de 59% entre A2A et A2B. L'adénosine est un ligand agoniste pour les quatre récepteurs mais avec des affinités variables pour les différents sous-types, la plus faible (Ki > 1 µM) pour A2B, la plus élevée pour A1 et A2A (Ki compris entre 10 et 30 nM) et intermédiaire (Ki de l'ordre de 1 µM) pour A3 (Jacobson & Gao, 2006). Ces récepteurs sont également la cible principale de la caféine, une des molécules les plus consommées dans le monde, qui agit sur eux comme un antagoniste.

Les récepteurs de l'adénosine sont plutôt ubiquitaires. Les récepteurs A2B et A3, notamment, sont retrouvés dans la plupart des cellules et des tissus mais en faible abondance. Les récepteurs A1 sont largement exprimés dans tout l'organisme mais avec des niveaux d'expression plus élevés dans le cerveau. Les récepteurs A2A sont fortement exprimés dans le striatum du cerveau, les cellules immunitaires de la rate, le thymus, les leucocytes et les plaquettes sanguines, et de façon intermédiaire dans le cœur, les poumons et les vaisseaux sanguins (Chen *et al.*, 2013).

Les seconds messagers associés aux récepteurs de l'adénosine sont historiquement définis par rapport à leur action sur l'adénylate cyclase. Les récepteurs A1 et A3 inhibent l'adélynate cyclase par couplage à la protéine Gi. Les récepteurs A2A et A2B sont majoritairement couplés à la protéine Gs qui stimule l'adélynate cyclase et la synthèse d'AMPc. Cependant, il a été mis en évidence que les récepteurs A2B sont également couplés à la protéine Gq qui active la phospholipase C (Ryzhov *et al.*, 2006). Par ailleurs, les récepteurs A2A sont couplés à la protéine Gs dans les systèmes périphériques, mais dans le striatum, où leur densité est la plus élevée, il a été démontré qu'ils agissaient principalement via l'activation de la protéine Golf, qui stimule également l'adélynate cyclase (Kull *et al.*, 2000).

Le récepteur de l'adénosine A2A présente la particularité d'avoir une extrémité C-terminale longue de 122 acides-aminés, ce qui est beaucoup plus que chez la majorité des RCPG de la famille 1 ou A, qui ont une extrémité C-terminale généralement comprise entre 10 et 40 acides-aminés. De plus, l'extrémité C-terminale du récepteur A2A ne montre aucune similarité de séquence avec d'autre RCPG, mais elle est très conservée entre les espèces. Il semblerait qu'elle ne soit pas impliquée dans le couplage avec la protéine G mais qu'elle joue un rôle important dans le trafic et la signalisation indépendante de la protéine G (Olah, 1997 ; Moreau & Huber, 1999). Cette région, prédite comme très désordonnée, est capable d'interagir avec un large éventail de protéines adaptatrices (Fredholm *et al.*, 2007). Par exemple, il a été montré que l'extrémité C-terminale du récepteur A2A interagissait avec l'α-actinine qui est impliquée dans l'internalisation du récepteur (Burgueno *et al.*, 2003), avec la protéine USP4 qui joue un rôle important dans le maintien de la position du récepteur à la surface cellulaire (Milojevic *et al.*, 2006) ou encore la protéine Arno qui active la voie des MAP kinases (Gsandtner *et al.*, 2005).

4.2.3. Effets et rôles

L'adénosine et ses récepteurs étant présents dans tout l'organisme, ils exercent un large éventail de fonctions biologiques, physiologiques et donc pathologiques. Ils sont impliqués notamment dans le rythme cardiaque et la circulation (Eltzschig, 2009 ; Eltzschig *et al.*, 2012), la lipolyse (Johansson *et al.*, 2007), le flux sanguin rénal (Sun *et al.*, 2001 ; Grenz *et al.*, 2012), la fonction immunitaire (Rosenberger *et al.*, 2009), la régulation du sommeil (Huang *et al.*, 2005 ; Lazarus *et al.*, 2011), l'angiogenèse (Liu *et al.*, 2010), ainsi que dans des maladies inflammatoires (Hasko *et al.*, 2008 ; Eltzschig & Carmeliet, 2011), neuro-dégénératives (Fredholm, 2007) et l'ischémie-reperfusion (Eltzschig & Eckle, 2011).

Le récepteur de l'adénosine A2A en particulier, est impliqué dans certaines maladies cardiovasculaires, des désordres du système nerveux ainsi que des maladies inflammatoires.

Le récepteur A2A intervient, notamment, dans la vasodilatation de l'aorte et l'artère coronaire. Il a été suggéré que son activation avait un effet tachycarde via les récepteurs centraux mais un effet hypotenseur via les récepteurs périphériques (Schindler *et al.*, 2005). Un agoniste de ce récepteur a été testé cliniquement comme anti-hypertenseur, mais n'a finalement pas pu être exploité en raison du manque de sélectivité *in vivo*. Dans les plaquettes, un agoniste du récepteur A2A a aussi montré une inhibition de l'agrégation en augmentant les taux d'AMPc intracellulaires, ce qui suggère que les agonistes de l'adénosine pourraient avoir une utilité comme agents antithrombotiques (Varani *et al.*, 2000). Par ailleurs, un agoniste très sélectif du récepteur A2A a

passé les essais cliniques de phase III et semble être bien toléré comme vasodilatateur coronaire de courte durée et comme radiotraceur pour l'imagerie (Barrett *et al.*, 2005).

Le récepteur A2A est le principal médiateur des effets stimulant de la caféine et joue un rôle important dans la régulation du sommeil (Ledent *et al.*, 1997 ; Fredholm *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2005). La plupart des effets comportementaux de la caféine semblent résulter de son action antagoniste sur les récepteurs de l'adénosine dans le système nerveux. Ceci suggère que la modulation de ces récepteurs peut fournir des cibles thérapeutiques dans les troubles du système nerveux. En effet, l'inactivation du récepteur A2A dans le cerveau est associée à la protection contre les dommages au cerveau après l'ischémie (Chen *et al.*, 1999), l'excitotoxicité (Popoli *et al.*, 2002), les lésions cérébrales traumatiques (Li *et al.*, 2009 ; Dai *et al.*, 2010) et la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson (Chen *et al.*, 2001) et la maladie d'Alzheimer (Canas *et al.*, 2009). Dans certains cas, l'activation et l'inactivation du récepteur A2A ont été montrées pour avoir toutes deux un effet protecteur, y compris dans des modèles animaux de la maladie de Huntington (Blum *et al.*, 2003 ; Chou *et al.*, 2005) et des lésions de la moelle épinière (Li *et al.*, 2006).

L'activation du récepteur A2A, qui se trouve dans presque toutes les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Sitkovsky *et al.*, 2004), semble atténuer l'inflammation et les lésions de re-perfusion dans une grande variété de tissus. Par l'activation du récepteur A2A, l'adénosine peut inhiber l'activation des lymphocytes T, la prolifération et la production de cytokines inflammatoires, tout en améliorant la production de cytokines anti-inflammatoires (Erdmann *et al.*, 2005). Il a été mis en évidence que le récepteur A2A est crucial dans la limitation et l'arrêt de l'inflammation prolongée (Ohta & Sitkovsky, 2001). Un agoniste de ce récepteur présente ainsi un intérêt pour le traitement de la septicémie (Sullivan *et al.*, 2004) et de maladies intestinales inflammatoires (Odashima *et al.*, 2005). L'activation sélective du récepteur A2A permet également de réduire la pression de la peau, la formation d'ulcères et l'inflammation (Peirce *et al.*, 2001) et d'accélérer la cicatrisation (Montesinos *et al.*, 1997).

Objectifs du projet

Les récepteurs de la mélatonine sont impliqués dans diverses pathologies, notamment dans les troubles du sommeil et la dépression, pour lesquels des molécules sont déjà sur le marché pharmaceutique. Ces récepteurs présentent donc un intérêt thérapeutique important et sont très étudiés au sein de la société Servier. Plusieurs études, en contexte cellulaire ou membranaire, ont notamment permis la caractérisation pharmacologique de ces récepteurs et le développement de nouveaux ligands. Des recherches ont également été menées sur l'homo- et l'hétérodimérisation des récepteurs de la mélatonine. Par contre, très peu d'études *in vitro* ont été réalisées sur ces récepteurs entiers purifiés. En effet, aucune information n'est disponible sur la surexpression et la purification des récepteurs de la mélatonine en qualité et quantité compatibles avec des études *in vitro*. De ce fait, la caractérisation structurale, les études d'interaction par des approches biophysiques, le développement d'anticorps spécifique n'ont jamais été réalisés sur ces récepteurs. C'est précisément pour progresser sur ces aspects et apporter de nouvelles données structurales et fonctionnelles, que nous souhaitons étudier les récepteurs de la mélatonine, en commençant par le récepteur MT1 humain.

Pour atteindre ces objectifs, il fallait tout d'abord identifier les conditions d'obtention de récepteurs purs, actifs, homogènes, stables et en quantité suffisante, pour réaliser des études *in vitro*. Cependant, malgré les progrès réalisés dans ce domaine ces dernières années, l'obtention de ce type d'échantillon demeure encore aujourd'hui un exercice difficile, pour lequel il n'existe pas de méthode universelle, chaque RCPG possédant des propriétés particulières et spécifiques. De plus, nous avons fait le choix de ne pas modifier les récepteurs par fusion, mutation ou délétion pour les stabiliser, mais de travailler avec des récepteurs les plus natifs possibles afin de se rapprocher au mieux de la réalité biologique pour des études à visées pharmaceutiques. Dans un premier temps, il était donc nécessaire de mettre au point des conditions pour l'expression, la solubilisation, la purification et la stabilisation du récepteur MT1 natif. Ce travail a été réalisé, en grande partie, à l'UMR 7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire (BSC) de Strasbourg, au sein de l'équipe « GPCR et douleurs », qui possède un savoir-faire pour la production, la purification et l'analyse fonctionnelle de RCPG recombinants.

Parallèlement, nous souhaitions mettre en place des techniques d'analyse biochimiques et biophysiques pour caractériser les récepteurs purifiés et étudier leurs interactions avec des ligands. Ces méthodes, utilisées en routine pour les protéines solubles chez Servier, nécessitaient de la mise au point pour l'étude des RCPG, notamment en raison de la présence de détergent. Afin de

développer et valider rapidement ces approches, nous avons décidé de faire la mise au point sur un récepteur de référence, le récepteur de l'adénosine A2A humain, pour lequel la production, la purification et la caractérisation *in vitro* sont assez bien décrites dans la littérature. La majorité de ce travail a été réalisée à l'Institut de Recherche Servier (IdRS) de Croissy-sur-Seine, au sein du département « Biotechnologie, Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire » qui possède le matériel et les connaissances pour la caractérisation et l'analyse de protéines purifiées par des méthodes biophysiques.

Ce manuscrit présente les résultats majeurs obtenus au cours de ce projet. Le premier chapitre est centré sur le récepteur de l'adénosine A2A, pour lequel j'ai rapidement obtenu des échantillons compatibles avec des études *in vitro*. Il décrit les résultats de production et purification de ce récepteur, la caractérisation biochimique et biophysique des échantillons purifiés, les études d'interaction ligand/récepteur ainsi que les études de thermostabilité. Le second chapitre est consacré à la mise au point de la production et de la purification du récepteur de la mélatonine MT1. Il présente, sous la forme d'un article scientifique, l'évaluation de différentes constructions et sources de production, le criblage des conditions de solubilisation et purification et la caractérisation pharmacologique du récepteur purifié. Le troisième chapitre est axé sur les essais de stabilisation du récepteur MT1 par l'ajout de lipides, l'échange des détergents avec des polymères amphiphiles ainsi que la reconstitution des récepteurs en nanodisques.

Partie II : Matériels et méthodes

1. Les techniques préparatives

1.1. Expression des RCPG dans la levure *Pichia pastoris*

Le clone *Pichia pastoris* exprimant le récepteur A2A provient de la collection MePNet (Membrane Protein Network) et celui exprimant le récepteur MT1 a été transformé et sélectionné comme cela a été précédemment décrit (Andre *et al.*, 2006). Les stocks glycérol des levures recombinantes sont étalés sur des boites YPG agar (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) et incubées 24h à 30°C. Ces cellules sont utilisées pour inoculer 500 ml de milieu BMGY (1% extrait de levure, 2% peptone, 1,34% YNB, 1% glycérol, 0,1 M KPi pH 6) qui sont incubés sous agitation toute la nuit à 30°C. Cette préculture est ensuite diluée à une DO_{600nm} égale à 1 dans 500 ml de milieu BMGY frais et incubée sous agitation 4 à 6 h à 30°C pour atteindre une DO_{600nm} comprise entre 4 et 5. Les levures sont alors centrifugées à 3000 g pendant 10 minutes et le culot est resuspendu dans 500 ml de milieu d'induction BMMY complet (1% extrait de levure, 2% peptone, 1,34% YNB, 0,5% méthanol, 0,1 M KPi pH 6,3% DMSO, 0,4 mg/ml histidine, 0,00004% biotine) additionné d'un ligand antagoniste (0,1 µM ZM241385 (Tocris) pour le récepteur A2A et 1 µM D600 (Sigma) pour le récepteur MT1). Les cultures sont incubées sous agitation pendant 18h à 20°C. Les levures sont centrifugées 10 min à 3000 g, lavées plusieurs fois dans un tampon PBS, réparties par culot de 5 g dans des tubes 50 ml et conservées à -80°C ou utilisées directement pour la préparation de membranes.

1.2. Préparation des membranes de levure *Pichia pastoris*

Toute la procédure est réalisée dans la glace. Les culots de 5 g de levure sont resuspendus dans 20 ml de tampon de lyse froid (50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10% glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) puis 10 ml de microbilles de verre de 0,5 mm (Sigma) sont ajoutées. Les cellules sont ensuite lysées par 3 cycles de 60 s d'agitation vigoureuse et 60 s de refroidissement dans la glace à l'aide d'un appareil dédié FastPrep 24 (MP Biomedicals). Une centrifugation de 10 min à 3000 g à 4°C permet de récolter le lysat tandis que les cellules non lysées et débris cellulaires sont repris dans 10 ml de tampon de lyse pour un nouveau cycle de cassage. Généralement 3 cycles de cassages sont nécessaires pour lyser complétement les levures. Le lysat cellulaire est ensuite ultracentrifugé pendant 45 min à 100 000 g à 4°C. Les culots membranaires sont resuspendus par homogénéisation au potter dans un tampon de membrane froid (50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10% glycérol, 1 mM PMSF). La préparation est ultracentrifugée une seconde fois pendant 45 min à 100 000 g à 4°C. Finalement les membranes sont reprises et homogénéisées dans le même tampon de membrane et congelées à -80°C.

1.3. Purification des RCPG

La solubilisation et la purification des RCPG ont été réalisées à l'aide de micelles mixtes détergent/CHS dans un ratio [1:0,1] en présence de 1 µM de ligand antagoniste de plus faible affinité que les ligands utilisés pour les études d'interaction ligand/récepteur pratiquées par la suite, à savoir le DPCPX (Tocris) pour le récepteur A2A et le D600 (Sigma) pour le récepteur MT1. Par la suite, la solubilisation et la purification du récepteur A2A a également été réalisée en absence de ligand, notamment pour les études de thermostabilité, sans que cela ne change les résultats obtenus.

1.3.1. Solubilisation

Les protéines membranaires sont diluées à 2 mg/ml dans un tampon de solubilisation froid (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 25 mM imidazole, cocktail d'inhibiteur de protéase, ±1 µM de ligand antagoniste) supplémenté de 0,25% DDM/0,025% CHS (m/v) pour le récepteur A2A et de différents détergents à différentes concentrations pour le récepteur MT1 (comme indiqué dans l'article Partie III, chapitre 2). La suspension est incubée 5 minutes à température ambiante sous agitation puis ultracentrifugée 45 minutes à 100 000 g à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubilisées est ensuite filtré sur un filtre seringue GD/X (Whatman).

1.3.2. Chromatographie d'affinité sur nickel

Les récepteurs A2A sont purifiés sur une colonne de nickel (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare) montée en série sur un appareil de purification de type Äkta purifier (GE Healthcare) permettant de suivre la mesure de l'absorbance à 280 nm. Après l'équilibration de la colonne en tampon de purification (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 25 mM imidazole, 0,1% DDM, 0,01% CHS, ±1 µM DPCPX), les protéines solubilisées sont chargées sur la colonne avec un débit de 1 ml/mn. La colonne est ensuite lavée par 20 ml de tampon de purification. Les protéines sont finalement éluées par un gradient de 0 à 100% de tampon d'élution (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazole, 0,1% DDM, 0,01% CHS, ±1 µM DPCPX) étalé sur 20 ml. Des fractions de 0,5 ml sont récoltées à l'aide d'un collecteur automatique durant l'élution des protéines.

1.3.3. Chromatographie d'affinité sur résine anti-Flag

Les récepteurs MT1 sont purifiés par chromatographie d'affinité sur résine anti-Flag dans les conditions décrites dans l'article Partie III, chapitre 2.

1.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique

Les fractions d'intérêt de la première étape de purification par chromatographie d'affinité (nickel pour A2A ou anti-Flag pour MT1) sont regroupées et concentrées par ultrafiltration sur une

membrane avec un seuil de coupure à 30 kDa pour A2A et 50 kDa pour MT1 (Vivaspin, Satorius). Les échantillons concentrés sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) montée en série sur un appareil de purification de type Äkta purifier (GE Healthcare). La colonne est équilibrée en tampon de purification (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, ±1 µM ligand) avec 0,1% DDM / 0,01% CHS pour le récepteur A2A ou différents détergents à différentes concentrations pour le récepteur MT1 (comme indiqué dans l'article Partie III, chapitre 2). L'échantillon concentré est chargé sur la colonne et les protéines sont éluées dans le même tampon avec un débit de 0,3 ml/mn. Des fractions de 0,5 ml sont récoltées à l'aide d'un collecteur automatique durant l'élution des protéines.

1.4. Essais de stabilisation sur le récepteur MT1

Ces expériences ont été réalisées sur les récepteurs MT1 solubilisés et purifiés en présence du détergent Fos14 dans la condition 1 décrite dans l'article Partie III, chapitre 2.

1.4.1. Ajout de lipides

Les lipides DMPC, DOPC, DOPS et extrait de lipide de cerveau proviennent de Avanti Polar Lipids et l'Asolectine de Sigma. Les lipides lyophilisés sont repris dans du chloroforme à 25 mg/ml. Puis le chloroforme est évaporé sous un flux d'argon jusqu'à la formation d'un film lipidique. Ce film est ensuite resuspendu à 10 mg/ml dans une solution aqueuse contenant 1% de Fos14 et 0,1% de CHS (m/v) pour former des micelles mixtes lipides/détergents. Les lipides ainsi préparés sont ajoutés aux récepteurs MT1 purifiés dans un ratio de masse [protéine : lipide] de [1:1]. Les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation douce avant d'être analysés par test de fixation de radioligand à l'équilibre.

1.4.2. Echange des détergents avec des polymères amhiphiles

Les amphipols non ioniques, NAPols, nous ont été fourni par le professeur Ange Polidori de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de la faculté des sciences d'Avignon. Les NAPols sont resuspendus dans de l'eau à 100 mg/ml. Ils sont ensuite ajoutés aux récepteurs MT1 purifiés dans un ratio de masse [protéine : NAPols] de [1:10]. Les échantillons sont incubés 1h à 4°C sous agitation douce. Afin d'éliminer les détergents, des billes de polystyrène (biobeads, Biorad) sont ajoutées dans un ratio de masse [détergent : biobeads] de [1:10]. Les échantillons sont incubés la nuit à 4°C sous agitation douce. Une centrifugation basse vitesse permet de faire tomber les billes et de récolter le surnageant. Puis le surnageant est centrifugé 20 min à 65 000 g afin d'éliminer les éventuelles protéines non maintenues en solution par les NAPols qui auraient précipité lors de l'élimination des détergents. Les échantillons sont ensuite analysés par test de

fixation de radioligand à l'équilibre. Pour l'échange des détergents avec des NAPols en présence de lipides, les lipides sont ajoutés aux récepteurs MT1 purifiés et incubés 1h à 4°C sous agitation douce avant d'ajouter les NAPols et de suivre le même protocole.

1.4.3. Reconstitution du récepteur MT1 en nanodisques

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Pharmacologie Moléculaire de RCPG (PMR) du Dr Jean-Louis Banères à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier, qui nous a fourni les MSP1 E3 et le mélange de lipides (POPC/POPG) solubilisés en détergent cholate.

Les récepteurs MT1 purifiés sont mélangés avec les MSP et les lipides dans un ratio molaire [0,1 MT1 : 1 MSP : 90 lipides]. Le mélange est incubé 45 min à 4°C. Des billes de polystyrènes (biobeads, Biorad) sont ajoutées à raison de 0,5 g pour 1 ml d'échantillon et le tout est incubé la nuit à 4°C sur un agitateur rotatif afin d'éliminer les détergents et permettre l'assemblage des nanodisques. L'échantillon contenant les nanodisques est récupéré par aspiration à l'aide d'une pipette.

Les nanodisques ayant intégré un récepteur MT1 portant une étiquette 10-histidines sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare) montée en série sur un appareil de purification de type Äkta purifier (GE Healthcare). Après avoir équilibré la colonne en tampon de purification (25 mM Tris pH 8, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazole), l'échantillon de nanodisque est chargé sur la colonne avec un débit de 1 ml/mn. La colonne est ensuite lavée par 10 ml de tampon de purification. Finalement, les protéines sont éluées en deux étapes avec 40% puis 100% de tampon d'élution (25 mM Tris pH 8, 0,3 M NaCl, 500 mM imidazole). Des fractions de 0,5 ml sont récoltées à l'aide d'un collecteur automatique. Les échantillons de la purification sont analysés sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les fractions d'intérêt sont regroupées et dialysées la nuit à 4°C sous agitation dans un tampon (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl) afin d'éliminer l'imidazole. L'échantillon dialysé est concentré par ultrafiltration sur une membrane avec un seuil de coupure de 10 kDa (Amicon, Millipore). L'absorbance à 280 nm de l'échantillon concentré est mesurée afin de calculer sa concentration.

2. Les techniques d'analyses biochimiques

2.1. Dosage protéique

La concentration protéique des préparations de membrane ainsi que des échantillons de RCPG solubilisés et purifiés est déterminée par un dosage colorimétrique avec un kit BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Les protéines sont diluées 5 ou 10 fois dans un volume final de 50 µl avec de l'eau. Un blanc est réalisé avec le même volume de tampon que de protéine dilué dans un volume final de 50 µl d'eau. Parallèlement une gamme étalon est réalisée avec de la BSA diluée dans l'eau à différentes concentrations (1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,032 ; 0,016 mg/ml). 1 ml du mélange de réactif est ajouté aux 50 µl d'échantillon et le tout est incubé 30 min à 37°C au bain-marie. Puis l'absorbance à 265 nm est mesurée. La concentration des échantillons est calculée par rapport à la gamme étalon de BSA.

Pour les échantillons de nanodisques la concentration protéique a été déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm grâce à la loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon * l * C$, où A est l'absorbance à 280 nm, ε est le coefficient d'extinction molaire en $l.mol^{-1}.cm^{-1}$, l est la longueur de la cuve en cm et C la concentration molaire en en $mol.l^{-1}$.

2.2. SDS-PAGE et immunodétection

Les échantillons protéiques sont mélangés à du tampon Laemmli avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE 10%. La séparation est effectuée à l'aide un courant électrique de 100 V pendant 1 à 2 heures. Les protéines du gel sont ensuite soit colorées au bleu de Coomassie soit transférées sur une membrane de nitrocellulose pour être révélées par immunodétection. Le transfert des protéines du gel sur la membrane est effectué sous un voltage de 100 V pendant une heure. La membrane est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante dans un tampon TBST (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween) contenant 5% de lait afin de bloquer les sites d'interactions non spécifiques de la membrane. Puis elle est incubée 2h à température ambiante avec l'anticorps primaire M2 anti-Flag de souris (Sigma) dilué au 1/8000ème dans le TBST avec 1 % de lait. Après 3 lavages de 5 min dans du TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti-souris dilué au 1/10000ème dans le TBST avec 1 % de lait, qui est soit couplé à la peroxydase IgG-HRP, GE Healthcare) soit couplé à un chromophore (IRDye 800 CW, ScienceTec). La membrane est à nouveau lavée 3 fois 5 min dans du TBST. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont révélés par chimioluminescence avec un kit (ECL Select western blot detection reagent, GE Healthcare), selon le protocole du fournisseur. Les anticorps secondaires couplés à un chromophore sont détectés par un appareil de lecture Odyssey LI-COR Biosciences (ScienceTec). Pour

l'immunodétection anti-biotine, une protéine streptavidine directement couplée à une peroxydase (ExtrAvidine, Sigma) qui a une haute pour la biotine a été utilisé. Dans ce cas, après le blocage, la membrane est incubée avec l'ExtrAvidine diluée au 1/2000ème dans du TBST avec 1 % de lait pendant 2 h à température ambiante et après 3 lavage de 5 min dans du TBST, la streptavidine couplée à une peroxydase est révélée par chimioluminescence.

2.3. Digestion enzymatique par PNGase et TEV

2.3.1. Digestion par la PNGase

Les fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique ont été soumises à une déglycosylation par la PNGase F (New England Biolabs) en condition native. Pour cela, la PNGase est ajoutée aux protéines directement dans le tampon de purification à raison de 50 U/mg de protéine et le mélange est incubé 2h à 30°C sous agitation douce.

2.3.2. Digestion par la TEV

Les fractions d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique ont été soumises à une digestion par la protéase TEV (AcTEV protease Invitrogen) en condition native. Pour cela, la protéase TEV est ajoutée aux protéines directement dans le tampon de purification à raison de 500 U/mg de protéine et le mélange est incubé 2h à 30°C sous agitation douce.

2.4. Test de fixation de radioligand à l'équilibre

2.4.1. Mise au point d'un test adapté aux protéines purifées

La mise au point d'un test de fixation de radioligand à l'équilibre adapté aux protéines purifiées a été réalisée sur le récepteur A2A et a consisté à comparer différentes méthodes de séparation des radioligands libres et fixés : (1) la filtration classique sur filtre GF/B, (2) la séparation sur mini-colonne de chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et (3) la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) en mélange avec de la γ-globuline avant la filtration sur filtre GF/B.

Pour cela 0,1 µg de protéines purifiées, diluées dans le tampon de réaction (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,01% DDM, 0,001% CHS), sont mises en présence de 50 nM de radioligand [^{3}H]ZM241385 (Hartmann Analytical) pour déterminer la liaison totale et additionnées de 20 µM de ligand froid ZM241385 (Tocris) pour déterminer la liaison non spécifique. Les échantillons, d'un volume final de 100 µl, sont incubés 1h à température ambiante sous agitation puis les radioligands libres et fixés sont séparés. Les échantillons sont réalisés en triplet pour chacune des conditions testées.

(1) Pour la filtration classique, les échantillons sont filtrés sur un filtre GF/B (Whatman) pré-incubé dans 0,5% de polyethyleneimine (PEI, Sigma) à l'aide d'un appareil de filtration Brandel relié à une pompe à vide. Après 3 lavages de 2 ml avec du tampon de lavage froid (50 mM Tris pH 7,4), les filtres sont incubés avec 3 ml de liquide de scintillation (Ultima Gold MV, Perkin Elmer) dans des fioles à scintillation.

(2) Pour la séparation sur mini-colonne SEC, les échantillons sont déposés sur une colonne Micro Bio-Spin P30 (Biorad) équilibrée dans le tampon de réaction puis centrifugés 4 min à 1000 g. Les échantillons passés à travers les colonnes sont transférés dans des fioles à scintillation et incubés avec 3 ml de liquide de scintillation.

(3) Pour la précipitation au PEG avant filtration, les échantillons sont additionnés de 200 µl de PEG 6000 (Sigma) à 25% dans un tampon froid (50 mM Tris pH 7,4) et de 200 µl de γ-globuline bovine (Sigma) à 0,1% dans un tampon froid (50 mM Tris pH 7,4). Les échantillons sont mélangés et incubés 15 min à température ambiante avant d'être filtrés sur un filtre GF/B comme décrit précédemment. Après 3 lavages de 2 ml avec du tampon de lavage froid (50 mM Tris pH 7,4, 8% PEG 6000), les filtres sont incubés avec 3 ml de liquide de scintillation dans des fioles.

Après une heure d'incubation à l'obscurité avec le cocktail de scintillation, la radioactivité est mesurée pour tous les échantillons par un compteur à scintillation Tri-Carb (Packard).

2.4.2. Courbe de saturation

Pour les courbes de saturation réalisées sur le récepteur A2A, une gamme de concentration de [^{3}H]ZM241385 de 0,25 à 150 nM est réalisée et une concentration de 20 µM de ligand froid ZM241385 est utilisée pour mesurer la liaison non spécifique. Les échantillons sont préparés dans un volume final de 100 µl avec 10 µg de préparation membranaire diluée dans un tampon de réaction (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) ou 0,01 µg de protéines purifiées diluées dans le tampon de réaction additionné de 0,01% DDM/0,001% CHS. Les échantillons sont réalisés en triplet en plaque 96 puits et sont ensuite incubés 1h à 25°C. Les protéines sont filtrées sur GF/B en plaque 96 puits (96-well UniFilter GF/B plates, Perkin Elmer) pré-incubé dans 0,5% PEI puis le filtre est lavé 3 fois avec 1 ml de tampon de lavage froid (50 mM Tris pH 7,4) à l'aide d'un appareil de filtration (Filtermate Harvester, Packard). Pour les protéines purifiées, une étape supplémentaire de précipitation des protéines est réalisée par l'ajout de 200 µl de γ-globuline bovine à 0,1% et 200 µl de PEG 6000 à 25% (m/v) avec une incubation de 15 min avant la filtration sur GF/B et le tampon de lavage froid est additionné de 8% de PEG 6000. Finalement, 30 µl de cocktail de scintillation (Microscint 20, Perkin Elmer) sont ajoutés par puits et, après 1h

d'incubation à l'obscurité, la radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation TopCount (Perkin Elmer). Les données sont analysées par le logiciel PRISM (GraphPad) et les valeurs du nombre total de site de liaison (Bmax) et de la constante de dissociation du radioligand (Kd) sont calculées selon la méthode de Scatchard.

Pour les courbes de saturation réalisées sur le récepteur MT1, un protocole similaire a été employé dans les conditions décrites dans l'article Partie III, chapitre 2.

2.4.3. Courbes de déplacement

Des courbes de déplacement de radioligand par 28 composés différents sur les récepteurs MT1 en membrane CHO, en membrane *Pichia pastoris* ou purifiés en mélange de détergent Fos14 et CHAPS ont été réalisées dans les conditions décrites dans l'article Partie III, chapitre 2.

2.5. Test d'activation de la protéine G

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Pharmacologie Moléculaire de RCPG (PMR) du Dr Jean-Louis Banères, qui nous a fourni les sous-unités α_i, α_s, β et γ purifiées des protéines G. Le test d'activation de la protéine G a été réalisé avec du GTPγS couplé au fluorophore Bodipy (BODIPY FL GTP-γ-S, Invitrogen) sur les récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques comme décrit dans la partie 1.4.3 de cette partie matériels et méthodes. Pour cela 20 nM de nanodisques MT1 sont additionnés de 100 nM de sous-unités α_i ou α_s de la protéine G, 200 nM de sous unités βγ et 10 nM de $MgCl_2$, en présence ou en absence de 1 µM de ligand agoniste mélatonine dans un volume finale de 50 µl avec du tampon de dialyse (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl). Les échantillons sont incubés 15 min à 15°C puis 100 nM de GTP-γ-S-Bodipy sont ajoutés et l'émission de fluorescence est mesurée immédiatement (T0) sur un spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse. Puis les échantillons sont incubés à 15°C pendant 40 min et l'émission de fluorescence est à nouveau mesurée (T40).

3. Les techniques d'analyses biophysiques

3.1. Spetrométrie de masse

Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, puis les bandes ont été découpées et envoyées à la société Proteodynamics pour analyse en spectrométrie de masse. Les bandes découpées ont été traitées selon un protocole établi par cette société et analysées en MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation). Les protéines sont réduites par 10 mM de

dithiothréitol (DTT) pendant 60 min à 57°C et alkylées par 55 mM d'iodoacétamide pendant 30 min à l'obscurité. Elles sont ensuite digérées par la trypsine bovine (Roche # 11 418 025 001) pendant 3 heures. Les peptides sont extraits par une solution acide composée d'acétonitrile (ACN) à 70 % et d'acide trifluoroacétique (TFA) à 5%. Les peptides sont ensuite, soit directement déposés sur la plaque MALDI, soit préalablement purifiés sur ZipTip C18 avant le dépôt. Sur la plaque MALDI, les échantillons sont mélangés à une matrice CHCA (α-Cyano-4-Hydroxy-Cinnamic Acid) à 10 mg/ml dans 50% ACN/H2O et 0.1% TFA. Les cartes peptidiques sont acquises par MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry), soit mode réflectron avec les paramètres Grid 20kV, 70%, 0.002% et delay time 175 nsec, soit en mode linéaire avec les paramétres Grid 25kV, 93%, 0.1% et delay time 650 nsec. Les spectres en mode réflectron sont calibrés avec le calibrant externe C104 de Laser BioLabs. Les spectres en mode linéaire sont calibrés avec des standards internes. Les peptides sont identifiés par comparaison avec des masses théoriques des peptides trypsiques de la séquence de la protéine d'intérêt. La séquence de certains peptides a été vérifiée par fragmentation MALDI-PSD-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Post Source Decay-Mass Spectrometry) avec des conditions Grid 20kV, 80%, 0.02%, et delay time 125 ns.

3.2. SEC-MALS

Le SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering) est une technique de chromatographie d'exclusion stérique couplée à la détection de la diffusion de lumière. L'installation se compose d'un appareil de purification Äkta Explorer (GE Healthcare) piloté par le logiciel Unicorn, en ligne avec un détecteur de diffusion de lumière multi-angle Dawn-Eos et un réfractomètre Optilab rEX (Wyatt Technology) pilotés par le logiciel Astra. Une colonne analytique de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare) est connectée sur l'appareil de purification Äkta Explorer et équilibrée en tampon de purification (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS, 1 μM DPCPX). Un échantillon de 20 μl du récepteur A2A purifiés, soit environ 10 à 15 μg de protéines, est injecté sur la colonne et les protéines sont éluées dans le même tampon avec un débit de 0,2 ml/mn. Les protéines sont séparées sur la colonne en fonction de leur propriété stérique et passent dans les différents détecteurs permettant de mesurer l'absorbance à 280 nm, la diffusion de la lumière et l'indice de réfraction. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Astra qui permet de déterminer le poids moléculaire moyen et la proportion des différentes espèces en solution.

3.3. Microscopie électronique

Les échantillons purifiés ont été envoyés pour analyse à la plate-forme « contrôle qualité par microscopie électronique » de l'IBS (Institut de Biologie Structurale) de Grenoble, où les expériences ont été réalisées par les docteurs Daphna Fenel et Guy Schoehn. Les échantillons ont été observés en microscopie électronique par coloration négative au sodium silicotungstate (pH 7,4) en utilisant la technique de flottaison de mica. Pour cela un carré de 5x5 mm de mica recouvert d'une fine couche de carbone est utilisé. Les échantillons protéiques, dilués à environ 50 µg/ml dans le tampon de purification, sont introduits par capillarité entre le carbone et le mica. Après environ 30 secondes, le carré de mica-carbone est plongé avec un angle de 45° dans un puits contenant 300 µl de colorant sodium silicotungstate à 2%. Le carbone flotte à la surface du colorant alors que le mica tombe au fond du puits. Une grille de cuivre est placée sur le carbone flottant à la surface et l'ensemble grille-carbone-échantillon est récupéré avec une pince. L'excès de liquide est enlevé avec du papier-filtre Wattman n°4. Les échantillons sont ensuite observés avec un microscope électronique en transmission Phillips CM 120 équipé d'un filament LaB6 (hexaborure de lanthane) sous une tension de 120 kV. Les images sont enregistrées à un grossissement de 45 000 fois avec une caméra CCD Gatan OriusTM.

3.4. Résonance plasmonique de surface

Les études par résonance plasmonique de surface ont été réalisées sur un Biacore T200 (GE Healthcare) équilibré à 25°C.

3.4.1. Capture du récepteur A2A purifié sur une puce SPR

Les récepteurs A2A purifiés ont été captés sur une puce streptavidine (SA Chip, GE Healthcare) à l'aide d'une méthode prédéfinie dans le logiciel qui pilote l'instrument. Cette méthode comprend une étape de préparation de la surface avec une solution de 1M NaCl/50 mM NaOH, suivie d'une étape de capture des protéines biotinylées par l'injection d'un échantillon de récepteur A2A purifiés à 100 µg/ml pendant 180 sec à 10 µl/mn. La même procédure est appliquée en parallèle dans la piste de référence en remplaçant l'échantillon protéique par du tampon de purification ne contenant pas de protéine. L'expérience est réalisée avec un tampon de course composé de 50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS.

3.4.2. Test d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR

Les expériences d'interaction ont été effectuées par l'injection de différentes concentrations de ligand ZM241385 en parallèle sur la piste de référence et la piste active où les récepteurs A2A sont captés. Le stock de ligand ZM241385 étant à 10 mM dans 100% DMSO, les différentes

concentrations de ligand (0 - 6,25 - 12,5 - 50 - 100 et 200 nM) sont préparées en maintenant une concentration constante de DMSO à 0,002%. Le tampon de course, constitué de 50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS, est additionné de 0,002% DMSO, afin de limiter les artefacts liés à l'indice de réfraction élevé du DMSO. Chaque cycle d'injection de ligand est réalisé avec un temps de contact de 120 sec et un temps de dissociation de 600 sec à un débit de 30 µl/mn. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare). Les courbes de SPR sont corrigées par soustraction des signaux observés dans la piste de référence et ajustées par rapport au point de référence de la ligne de base.

3.4.3. Etude cinétique en un seul cycle de l'interaction ligand/récepteur par SPR

Cette expérience a été réalisée par l'injection successive de concentrations croissantes de ligand ZM241385 en un seul cycle sur la piste de référence et la piste où les récepteurs AA2A sont captés. Le stock de ligand ZM241385 étant à 10 mM dans 100% DMSO, une gamme de concentration de 0 - 6,25 - 12,5 - 50 et 100 nM de ligand est réalisée en maintenant une concentration constante de 0,002% de DMSO et le tampon de course, constitué de 50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS, est additionné de 0,002% DMSO, afin de limiter les artefacts liés à l'indice de réfraction élevé du DMSO. Des concentrations croissantes de ligand sont injectées successivement en un seul cycle à un débit de 30 µl/mn avec un temps de contact de 400 sec et un temps de dissociation de 600 sec. Deux blancs sont préalablement réalisés par l'injection de tampon de course à la place des ligands selon le même cycle. L'ensemble de l'expérience est réalisé en double. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare). Les courbes de SPR sont corrigées par la soustraction des blancs et des signaux de la piste de référence et sont ajustées par rapport au point de référence de la ligne de base. Des analyses d'affinité et de cinétiques sont réalisées par corrélation avec des courbes modèles afin de déterminer les constantes d'interaction.

3.5. Etude de thermostabilité

Ces expériences ont été réalisées sur le récepteur A2A solubilisé et purifié en absence de l'antagoniste de faible affinité DPCPX et ont pour objectif de déterminer la température de fusion des protéines appelée Tm, qui correspond à la température à laquelle 50 % des protéines sont dénaturées.

3.5.1. Détermination du Tm du récepteur A2A avec le kit Proteostat™

Cette expérience a été réalisée avec le kit Proteostat™ (Proteostat™ Thermal Shift Stability Assay Kit, Enzo Life Science). Un échantillon, contenant la sonde fluorescente à 1X et le récepteur

A2A purifié à 0,5 mg/ml, est préparé dans un volume final de 100 µl de tampon (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS). Parallèlement un blanc est réalisé avec la sonde fluorescente à 1X dans 100 µl final de tampon en absence de protéine. Puis 25 µl d'échantillon sont déposés en triplet dans une plaque 384 puits. La plaque est installée dans un appareil de PCR quantitative (CFX384 Biorad) qui permet de soumettre les échantillons à une rampe de température de 20 à 90°C et de mesurer la fluorescence émise tous les 0,5°C. Les valeurs de fluorescence sont analysées à l'aide du logiciel PRISM (GraphPad). Tout d'abord les valeurs de fluorescence du tampon seul sont soustraites aux valeurs de fluorescence émise en présence de protéines. La dérivée première des valeurs obtenues est ensuite calculée. Puis un graphique exprimant la dérivée première des valeurs de fluorescence (d(RFU)/dT) en fonction de la température en °C est tracé. Ceci permet de déterminer le Tm qui est la température correspondant au sommet du pic de la courbe. La même expérience a été réalisée cinq fois et la moyenne et l'écart type des Tm mesurés ont été calculés.

3.5.2. Détermination du Tm du récepteur A2A par l'appareil Optim® 1000

Cette expérience a été réalisée par la société Avacta sur un appareil Optim® 1000. Les récepteurs A2A purifiés sont dilués à 0,1 mg/ml dans le tampon de purification (50 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS). Parallèlement un blanc est réalisé avec le tampon de purification seul. Puis 9 µl d'échantillons sont déposés en six réplicats dans une rangée de micro-cuvettes MCA (Micro Cuvette Array). La MCA est placé dans l'appareil Optim® 1000 qui permet de soumettre les échantillons à une rampe de température de 20 à 90°C par pallier de 1°C et de mesurer les spectres d'émission de fluorescence intrinsèque des protéines. Les données sont analysées par le logiciel Optim® 1000 (Optim® 1000 software) qui réalise une analyse primaire et secondaire automatisée. L'analyse primaire extrait des paramètres spectraux à partir des données brutes d'émission de fluorescence et utilise des fonctions mathématiques pour calculer la moyenne barycentrique d'émission de fluorescence BCM (Barycentric mean). Cette valeur est similaire à la longueur d'onde d'émission moyenne mais cette approche permet de lisser le bruit de fond des données spectrales. A partir des données de l'analyse primaire, l'analyse secondaire exprime la moyenne barycentrique d'émission de fluorescence (BCM) en fonction de la température en °C et calcule le Tm qui est la température correspondant à 50% entre le maximum et le minimum des valeurs de BCM des courbes.

3.5.3. Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de ligand par l'appareil Optim® 1000

Cette expérience a été réalisée par la société Avacta sur par l'appareil Optim® 1000. Les récepteurs A2A purifiés sont dilués à 0,1 mg/ml dans le tampon de purification (50 mM Hepes pH

7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% DDM, 0,01% CHS) en absence ou en présence de différentes concentrations en ligand ZM241385 (0,1 - 0,316 - 1 - 3,16 et 10 µM). Puis 9 µl de chacun des échantillons sont déposés en six réplicats dans une rangée de micro-cuvettes MCA (Micro Cuvette Array). La MCA est placé dans l'appareil Optim® 1000 qui permet de soumettre les échantillons à une rampe de température de 20 à 90°C par pallier de 1°C et de mesurer les spectres d'émission de fluorescence intrinsèque des protéines. Les données sont analysées par le logiciel Optim® 1000 (Optim® 1000 software) qui réalise une analyse primaire et secondaire automatisée comme décrit dans le paragraphe précédent. Ces analyses permettent au final de déterminer le Tm des récepteurs A2A dans les différentes conditions testées. La comparaison des Tm mesurés en absence ou en présence de concentrations croissantes en ligand ZM241385 permettra d'évaluer si le ligand augmente le Tm suggérant un effet stabilisateur.

Partie III : Résultats et discussions

1. Production, purification et caractérisation du récepteur de l'adénosine A2A

1.1. Introduction

Afin de réaliser des études *in vitro*, il est nécessaire de disposer de RCPG purs, actifs, homogènes et stables, en quantité suffisante. Ceci n'est pas une tâche facile au vu, notamment, de la faible abondance naturelle de ces protéines et de leur instabilité en détergent. A ce jour, il n'existe pas d'approche universelle permettant la surexpression, la purification et la stabilisation des RCPG. Chacun de ces récepteurs possède des caractéristiques physicochimiques uniques et des préférences particulières pour les conditions d'expression, solubilisation et purification. De ce fait, un important travail de mise au point doit être réalisé afin d'identifier les conditions optimales pour chaque récepteur étudié. Ceci a été le cas pour notre récepteur d'intérêt, le récepteur de la mélatonine MT1 (travaux présentés dans le chapitre suivant).

Par conséquent, c'est un RCPG de référence, le récepteur de l'adénosine A2A humain, que nous avons utilisé pour le développement des techniques biophysiques. En effet, ce récepteur a été produit et purifié avec succès dans plusieurs systèmes d'expression : la bactérie *E.coli* (Weiss & Grisshammer, 2002 ; Magnani *et al.*, 2008), la levure *S. cerevisiae* (O'Malley *et al.*, 2007 ; O'Malley *et al.*, 2010), la levure *P. pastoris* (Hino *et al.*, 2012), les cellules d'insectes *Sf9* (Jaakola *et al.*, 2008 ; Dore *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011b) et les cellules de mammifères *HEK* (Robertson *et al.*, 2011). De plus, il a été caractérisé par différentes méthodes biophysiques telles que la spectrométrie de masse (Jaakola *et al.*, 2008), le dichroïsime circulaire et la fluorescence intrinsèque (O'Malley *et al.*, 2007 ; O'Malley *et al.*, 2010), des études de thermostabilité (Magnani *et al.*, 2008 ; O'Malley *et al.*, 2010 ; Lebon *et al.*, 2011a). Son interaction avec des ligands a également été étudiée par des tests de liaison radioactifs (Weiss & Grisshammer, 2002 ; O'Malley *et al.*, 2007 ; Magnani *et al.*, 2008 ; Robertson *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011a), mais aussi par SPR (Rich *et al.*, 2011 ; Robertson *et al.*, 2011 ; Zhukov *et al.*, 2011). Finalement, sa structure cristallographique a été résolue (Jaakola *et al.*, 2008 ; Dore *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011b ; Hino *et al.*, 2012).

Ainsi, en m'inspirant de ce qui a été décrit dans la littérature, j'ai rapidement pu identifier des conditions de production et purification du récepteur A2A, permettant d'obtenir des échantillons compatibles avec des études *in vitro*. Ceci nous a permis de mettre au point des techniques biochimiques et biophysiques pour la caractérisation des récepteurs purifiés et l'étude de leur interaction avec des ligands.

1.2. Production et purification du récepteur A2A

1.2.1. Production du récepteur A2A dans la levure *Pichia pastoris*

Parmi les différents systèmes d'expression existants, notre choix s'est porté sur la levure *P. pastoris* pour laquelle nous avons une très bonne expertise au laboratoire (**cf publications 1, 2 et 3 en annexes**). De plus, cette levure a déjà montré sa capacité à exprimer correctement tout un panel de RCPG, dont le récepteur de l'adénosine A2A. En effet, dans le cadre du projet MePNet (Membrane Protein Network) une collection de clones de *P. pastoris* exprimant une centaine de RCPG différents a été générée. Les paramètres d'expression ont été optimisés pour une vingtaine d'entre eux, dont le récepteur A2A qui était l'un de ceux qui présentaient le meilleur niveau d'expression de protéine fonctionnelle (Andre *et al.*, 2006). C'est précisément ce clone qui a été utilisé pour mon projet de thèse. La construction comprend des étiquettes Flag et 10-histidines du côté 5' et une séquence de biotinylation à l'extrémité 3', permettant de faciliter les étapes d'immunodétection et de purification (**Figure 38**). Une séquence signal de sécrétion de l'α-facteur de *S. cerevisiae*, qui est clivée au cours de la maturation, est ajoutée à l'extrémité N-terminale pour favoriser un bon adressage. Finalement, un site de clivage par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus), de chaque côté de la séquence du récepteur, permet l'élimination des étiquettes en fin de purification. Cette construction a été clonée dans le vecteur pPIC9K, sous le contrôle du promoteur fort pAOX1 inductible au méthanol, qui a ensuite été intégré dans le génome de la levure de façon stable.

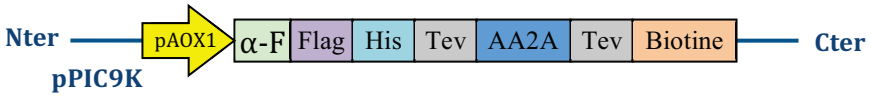


Figure 38 : Représentation schématique de la construction plasmidique pour l'expression du RCPG A2A

pPIC9K : vecteur d'expression de la levure *P. pastoris*, pAOX1 : promoteur de l'Alcool Oxidase 1 inductible au méthanol, α-F : séquence signal α-facteur, Flag : étiquette Flag, His : étiquette 10-histidines, Tev : séquence de clivage par la protéase TEV, AA2A : séquence codant le récepteur de l'adénosine A2A humain, Biotine : séquence de biotinylation.

J'ai réalisé l'expression du récepteur A2A à l'aide de ce clone dans des conditions optimisées pour l'expression de protéines fonctionnelles, incluant notamment une diminution de la température à 20°C et l'addition de ligand, d'histidine et de DMSO dans le milieu d'induction. Après 18h d'induction, les cellules sont récoltées et lysées et les membranes isolées. A partir d'un litre de culture, j'ai pu récolter environ 15 g de cellules permettant d'isoler en moyenne 300 mg de protéines membranaires. J'ai ensuite analysé les préparations de membranes par immunodétection avec un anticorps M2 anti-Flag afin de vérifier l'expression du récepteur A2A dans les membranes de *P. pastoris*. L'immunodétection (**Figure 39 A**) confirme la présence de l'A2A mais sous

différentes formes. On observe une bande à environ 55 kDa, ce qui est assez proche de la taille attendue pour cette construction de 59 kDa (il est en effet courant que les protéines ne migrent pas exactement à la taille attendue). On observe également une bande à environ 40 kDa, qui est vraisemblablement une forme tronquée du récepteur, ainsi qu'une bande à environ 75 kDa, qui est sans doute une forme glycosylée ou dimérique (sur lesquelles nous reviendrons dans la partie caractérisation). Les bandes de très haut poids moléculaires correspondent probablement à des oligomères ou des agrégats résistants à la dénaturation en SDS-PAGE. J'ai également réalisé des tests de fixation de radioligand à l'équilibre, utilisant l'antagoniste tritié [^{3}H]ZM241385, afin d'évaluer la qualité des récepteurs, basée sur leur capacité à fixer un ligand. Une courbe de saturation (**Figure 39 B**) m'a permis de mesurer l'affinité de liaison de l'antagoniste [^{3}H]ZM241385 pour ces récepteurs recombinants (Kd = 10,55 ± 0,8 nM) et un nombre total de site de liaison (Bmax) de l'ordre de 74,58 ± 1,5 pmol/mg (pmol de récepteurs AA2A capables de fixer un ligand par mg de protéines membranaires totales). Ces résultats montrent que les conditions utilisées pour la production du récepteur A2A donnent un très bon niveau d'expression de protéine fonctionnelle, avec un Bmax similaire à celui qui avait été précédemment publié (Andre *et al.*, 2006), bien qu'on note une affinité mesurée significativement plus faible (Kd de l'ordre de 10 nM au lieu de 1 nM). Cependant, une autre étude, réalisée sur le récepteur de l'adénosine A2A exprimé dans la levure *Pichia pastoris* avec une construction très proche de la notre, indique une affinité de 9 ± 0,2 nM du radioligand [^{3}H]ZM241385 pour ce récepteur (Singh *et al.*, 2012). En fonction de la construction, du système d'expression et des conditions du test de fixation de radioligand à l'équilibre, l'affinité du radioligand [^{3}H]ZM241385 pour le récepteur A2A varie de 0,65 nM (Weiss & Grisshammer, 2002) à 12 nM (Magnani *et al.*, 2008). L'affinité que nous mesurons est donc dans un ordre de grandeur en adéquation avec ce qui est décrit dans la littérature.

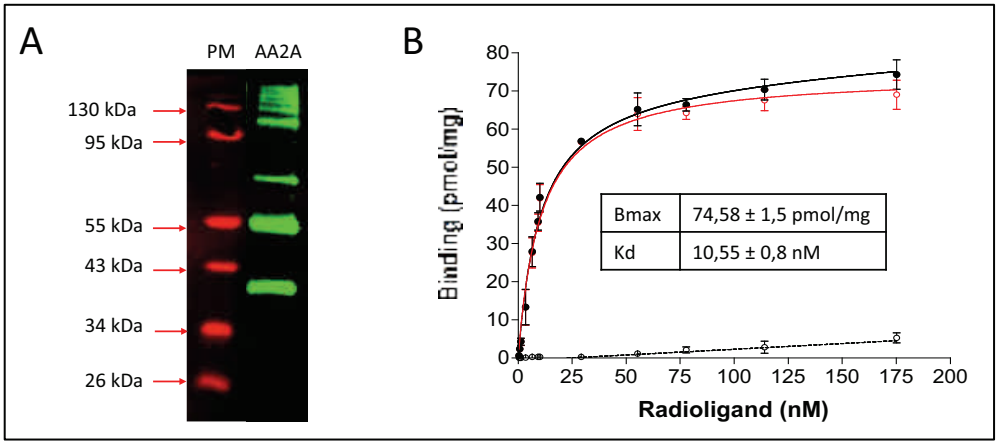


Figure 39 : Analyse des membranes exprimant l'A2A par western blot et test de fixation de radioligand

A : Immunodétection avec un anticorps anti-Flag sur les protéines membranaires totales (A2A) ; PM : marqueur de poids moléculaire. **B** : Courbe de saturation sur la préparation de membrane avec une gamme de radioligand [3H]ZM241385. La courbe noire représente la liaison totale, celle en pointillés la liaison non spécifique et celle en rouge la liaison spécifique.

1.2.2. Solubilisation et purification du récepteur A2A

Avant de purifier les RCPG, une première étape de solubilisation par des détergents est nécessaire afin d'extraire les protéines de leur environnement membranaire natif. Les protéines membranaires étant souvent déstabilisées et dénaturées par les détergents, le choix des conditions de solubilisation est essentiel pour trouver un équilibre entre l'efficacité de l'extraction et le maintien de la conformation active des récepteurs. Pour le récepteur A2A, les conditions de solubilisation qui ont été décrites utilisent le plus souvent le détergent DM (Rich *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011b) ou DDM (Weiss & Grisshammer, 2002 ; Jaakola *et al.*, 2008) parfois en mélange avec du CHAPS (O'Malley *et al.*, 2007 ; O'Malley *et al.*, 2010), additionné de cholesteryl hemisuccinate (CHS) (Xu *et al.*, 2011 ; Hino *et al.*, 2012) ou non (Magnani *et al.*, 2008 ; Dore *et al.*, 2011) et en présence de ligand (Weiss & Grisshammer, 2002 ; Lebon *et al.*, 2011b ; Hino *et al.*, 2012) ou en absence (Magnani *et al.*, 2008 ; O'Malley *et al.*, 2010). Le détergent DDM a été utilisé avec succès pour la solubilisation et la purification de nombreux RCPG, dont le récepteur de l'adénosine A2A. Par ailleurs, il a été montré que l'adition de lipides aux détergents, tels que le CHS dérivé du cholestérol, améliore de façon considérable la stabilité des RCPG. De plus, l'ajout de ligand lors de la solubilisation et la purification aide également à la stabilisation des récepteurs, sachant que les complexes avec des antagonistes ou agonistes inverses sont généralement plus stables que ceux avec des agonistes. Au vu de ces données, nous avons choisi de solubiliser le récepteur A2A à l'aide de micelles mixtes DDM/CHS en présence de ligand antagoniste. Notons que nous avons choisi l'antagoniste DPCPX car il présente une affinité inférieure au ZM241385 qui est utilisé pour les tests de fixation de ligand réalisés par la suite. Ceci permet de nous affranchir du risque de sous estimer la liaison de ligand faute de libération du site de fixation.

J'ai ensuite purifié les récepteurs A2A selon un protocole en deux étapes : une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel utilisant l'étiquette 10-histidines, suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique permettant de séparer les protéines en fonction de leurs propriétés physicochimiques (diamètre, volume, masse). Tout au long de la purification, la présence de DDM, CHS et DPCPX a été maintenue dans les différents tampons. Dans un premier temps, j'ai chargé les protéines solubilisées sur une colonne de nickel puis je les ai éluées par un gradient d'imidazole et récoltées par fraction de 500 µl. Le profil d'élution (**Figure 40 A**), correspondant à la mesure de l'absorbance à 280 nm, indique un premier pic d'élution (fractions 5 à 8) suivi d'un second pic (fractions 10 à 13) avec un épaulement (fractions 14 à 20). Des fractions représentatives de ces pics ont été analysées par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 40 B**) et par immunodétection avec un anti-Flag (**Figure 40 C**). Ces analyses révèlent que le premier pic contient essentiellement des protéines contaminantes, étant donné que les bandes majoritaires sur le

gel coloré au bleu de Coomassie ne sont pas révélées en immunodétection. Par contre, le second pic et l'épaulement comportent une grande quantité de récepteurs A2A, puisque les bandes qui apparaissent au bleu de Coomassie sont également révélées en immunodétection. On visualise nettement deux bandes majoritaires et résolutives, indiquées par un astérisque rouge, à environ 55 kDa et 40 kDa. On retrouve les bandes de plus haut poids moléculaire, mais on observe également des bandes moins définies et moins intenses, de taille inférieure à 40 kDa, indiquant certainement une dégradation.

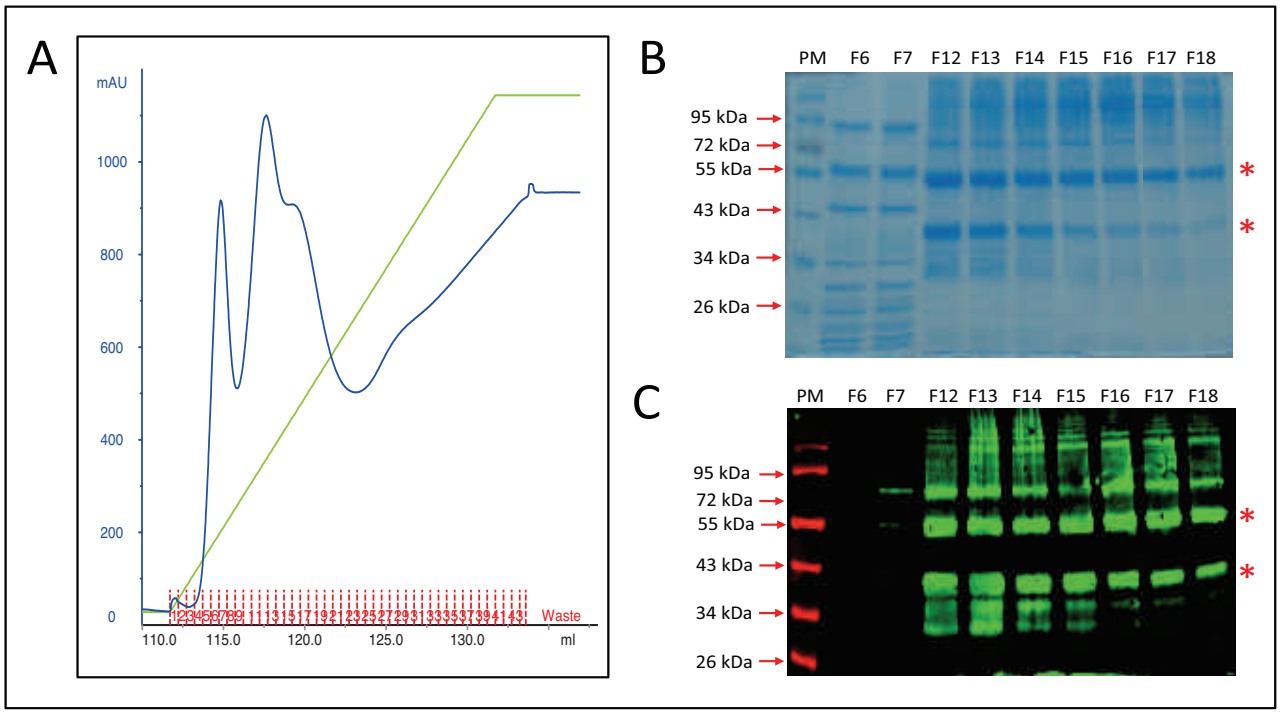


Figure 40 : Résultats de la purification de l'A2A sur colonne de nickel

A : Profil d'élution de la colonne de nickel, **B** : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et **C** : Immunodétection avec un anticorps anti-Flag sur diférentes fractions d'élution de la colonne de nickel.

Pour la deuxième étape de purification, nous avons retenus les fractions 10 à 13 du second pic d'élution, qui d'après le bleu de Coomassie semblent contenir moins de formes de hauts poids moléculaires que les fractions plus tardives. J'ai donc regroupé et concentré ces fractions, afin de les charger sur une colonne de chromatographie d'exclusion Superdex 200, dont j'ai récolté les protéines éluées par fractions de 500 l. Le suivi de l'absorbance à 280 nm (**Figure 41 A**) révèle un premier pic d'élution sortant à 8 ml (fractions 16 et 17), qui est le volume mort de la colonne, avec un épaulement entre 9 et 11 ml (fractions 18 à 22), correspondant à des protéines de très haut poids moléculaire. On observe ensuite une succession de deux pics, entre 11 et 13 ml, correspondant à un volume d'élution de protéines monomériques, le premier comprenant les fractions 23 et 24 et le second les fractions 25 et 26. J'ai analysé des fractions représentatives de ce profil d'élution par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 41 B**) et par immunodétection anti-Flag (**figure**

41 C). Cette analyse révèle que les fractions 17 à 21 contiennent des récepteurs A2A sous des formes oligomériques ou agrégées, puisqu'on voit des bandes de très haut poids moléculaire sur le bleu de Coomassie et l'immunodétection, contrairement aux fractions 23 à 26 du second pic d'élution, dans lesquelles ces formes ne sont plus observées. Dans ces fractions 23 à 26, on retrouve les deux bandes principales à 55 kDa et 40 kDa, indiquées par un astérisque rouge, la première diminuant graduellement et la seconde apparaissant progressivement. On note également la présence de la bande à 75 kDa dans les fractions 23 et 24 et l'apparition de bandes de protéines dégradées de taille inférieure à 40 kDa dans les fractions 25 et 26.

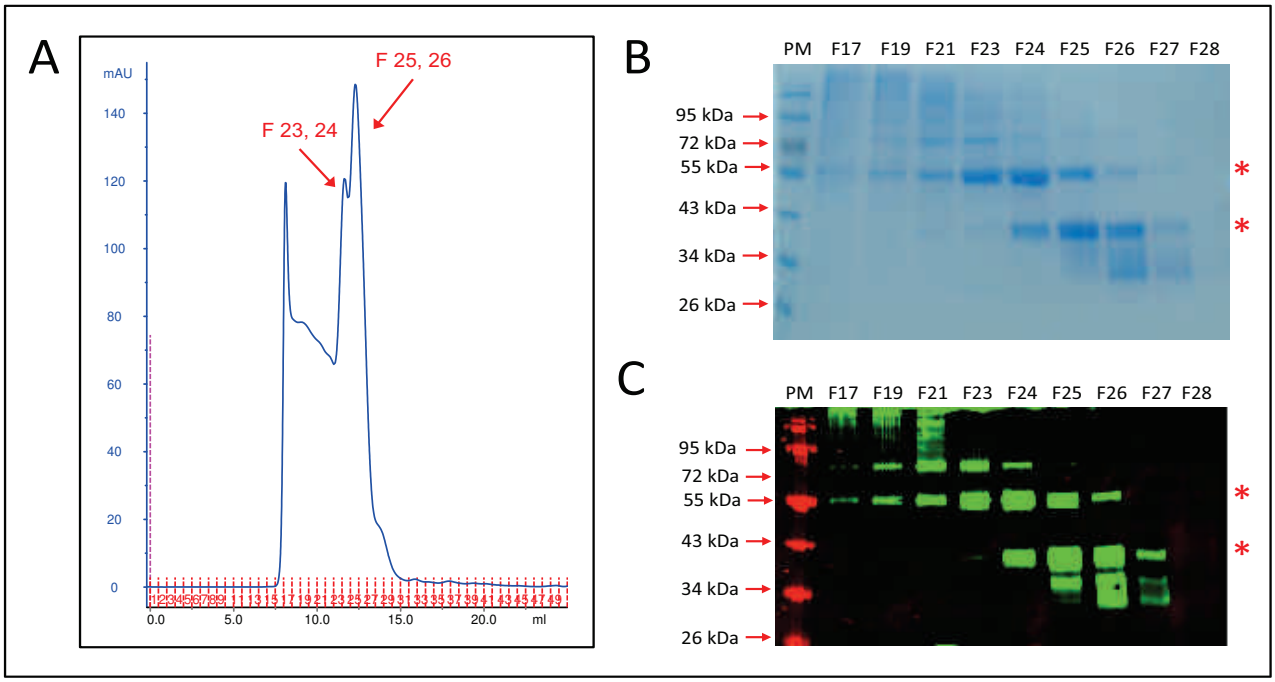


Figure 41 : Résultats de la purification de l'A2A sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique

A : Profil d'élution de la colonne de chromatographie d'exclusion Superdex 200, **B** : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et **C** : Immunodétection avec un anticorps anti-Flag sur diférentes fractions d'élution de la colonne de chromatographie d'exclusion stérique.

Les fractions les plus intéressantes pour la suite de l'étude sont les fractions 23 à 26 du second pic d'élution, qui renferment une grande quantité de récepteurs monomériques. J'ai déterminé la concentration protéique des échantillons par dosage BCA. Les quatre fractions d'intérêt de 0,5 ml ont une concentration moyenne de 0,25 mg/ml. Cette purification permet donc d'obtenir en moyenne 0,5 mg de protéines à partir de 150 mg de préparation membranaire correspondant à 0,5 L de culture. On a donc un rendement de purification de l'ordre de 1 mg de protéine par litre de culture. Ainsi, ces deux étapes de purification m'ont permis d'isoler le récepteur A2A des autres protéines membranaires, puis de séparer les protéines multimériques ou agrégées des protéines monomériques sous deux formes majoritaires, nous permettant d'obtenir un échantillon final avec un niveau de pureté estimé à plus de 80%.

1.3. Caractérisation biochimique et biophysique des récepteurs A2A purifiés

1.3.1. Etude de la nature des différentes formes purifiées

Le récepteur A2A a été produit et purifié sous deux formes majoritaires qui migrent à environ 55 kDa et 40 kDa ainsi qu'une troisième forme minoritaire migrant à environ 75 kDa. Dans le but de déterminer la nature de ces différentes formes, plusieurs approches ont été employées.

1.3.1.1. Etude de la glycosylation du récepteur A2A purifiés

Sachant qu'il existe un site de N-glycosylation potentiel sur l'asparagine 154 de la séquence native du récepteur de l'adénosine A2A (Lebon *et al.*, 2011b), et que la levure *P. pastoris* réalise des N-glycosylation qui peuvent être de taille importante (Hamilton & Gerngross, 2007), nous avons voulu vérifier si la glycosylation pouvait contribuer à ces différences de poids moléculaire. Pour cela, j'ai soumis les fractions 23 et 24, qui contiennent principalement la bande à 55 kDa mais aussi les bandes à 75 et/ou 40 kDa, à une déglycosylation par l'endoglycosidase PNGase F. Puis, je les ai analysées sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 42 A**) et par immunodétection avec un anticorps anti-Flag (**Figure 42 B**). Comme on peut le voir sur la figure 42, le traitement à la PNGase ne modifie pas de façon significative le profil de migration sur gel. La bande à 75 kDa est légèrement décalée vers le bas, indiquant probablement une glycosylation de cette forme. Cependant, on retrouve les trois formes purifiées du récepteur A2A après une déglycosylation par la PNGase F, ce qui suggère que ces différences de tailles sont certainement dues à d'autres événements que la glycosylation.

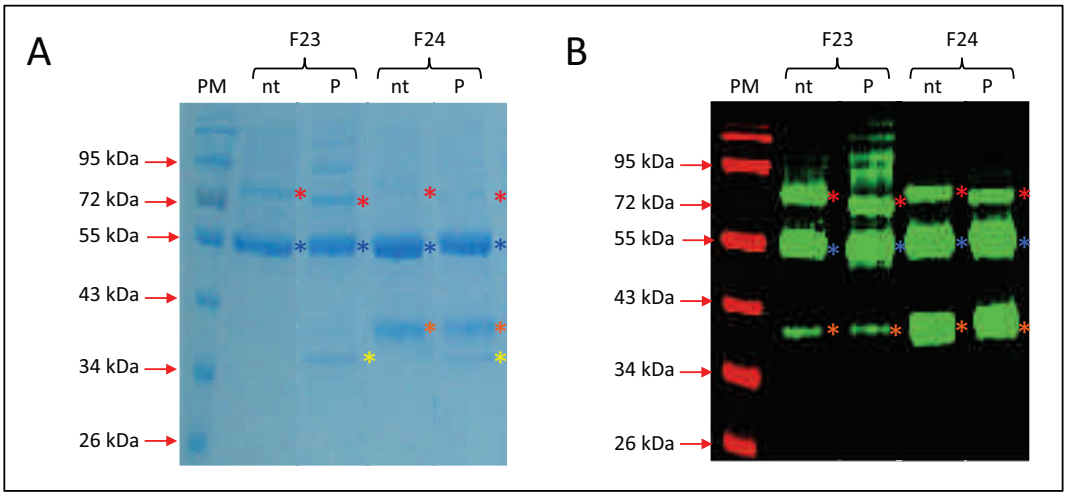


Figure 42 : Analyse de la déglycosylation par PNGase F

A : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et **B** : Immunodétection avec un anticorps anti-Flag sur diférentes fractions digérées (P) ou non (nt) par la PNGase F. Les bandes d'intérêt sont indiquées par des astériques rouge (75 kDa), bleu (55 kDa), orange (40 kDa) et la PNGase par un astérique jaune.

1.3.1.2. Mise en évidence d'une troncation C-terminale par des méthodes biochimiques

D'autre part, afin de mettre en évidence si une délétion du côté C-terminal pouvait être responsable de ces différences de poids moléculaire, j'ai réalisé une détection de la biotine, présente à l'extrémité C-terminale de la construction, grâce à une streptavidine couplée à une peroxydase. L'absence de biotinylation seule ne suffirait pas à expliquer de telles différences, puisque la biotine ne représente que 0,244 kDa, mais pourrait révéler une perte de l'étiquette de biotinylation, qui fait environ 10 kDa. J'ai donc analysé les fractions 24 et 26, qui contiennent les bandes à 40 et 55 kDa ainsi que la bande à 75 kDa pour la 24, par une détection de la biotine, permettant de révéler l'extrémité C-terminale, et en parallèle par une immunodétection anti-Flag, permettant de révéler l'extrémité N-terminale. La **figure 43 A** montre que les trois bandes sont révélées avec l'anticorps anti-Flag, tandis que seules les bandes à 55 et 75 kDa sont révélées par la détection de la biotine. Ceci semble indiquer que les formes à 75 et 55 kDa sont entières tandis que celle à 40 kDa correspondrait à une forme tronquée de la construction, qui a perdu l'étiquette de biotinylation côté C-terminal. Par ailleurs, si la différence de poids moléculaire entre les bandes à 55 et 40 kDa est due uniquement à la perte de l'étiquette biotine, après le clivage de toutes les étiquettes, on devrait observer une seule bande. Grâce aux sites de clivage de part et d'autre de la séquence du récepteur, une digestion enzymatique par la protéase TEV permet d'éliminer toutes les étiquettes. J'ai donc soumis la fraction 25, qui contient les deux bandes majoritaires à 55 et 40 kDa, à une digestion par la TEV et analysé sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Comme on peut le voir sur la **figure 43 B**, après la digestion par la TEV, on observe toujours deux bandes, cette fois à environ 40 et 35 kDa. Cette différence d'environ 5 kDa, après le clivage des étiquettes, semble indiquer que la différence de poids moléculaire n'est pas due uniquement à la perte de l'étiquette de biotinylation, mais aussi à une délétion d'une partie de l'extrémité C-terminale du récepteur lui-même.

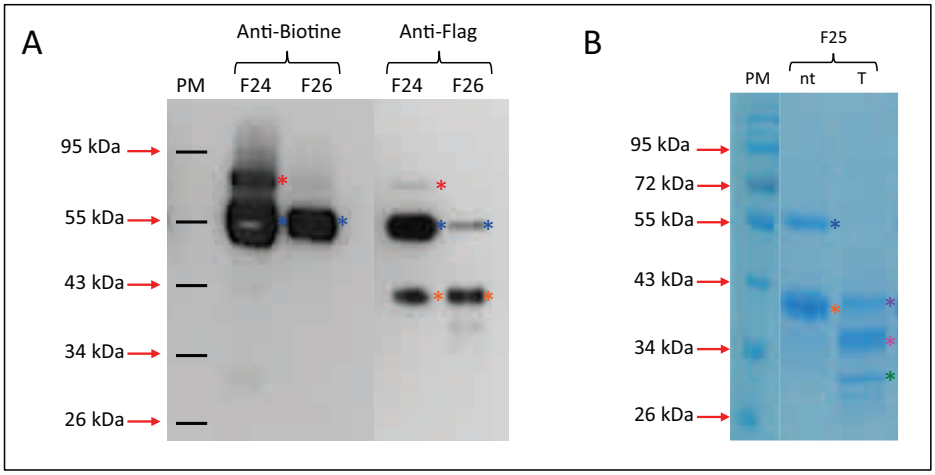


Figure 43 : Mise en évidence d'une probable délétion par des méthodes biochimiques

A : Détection de la biotine (à gauche) et du Flag (à droite), **B** : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie sur une fraction digérée (T) ou non (nt) par la TEV. Les bandes d'intérêt sont indiquées par des astériques rouge (75 kDa), bleu (55 kDa), orange (40 kDa) sans traitement, violet (40 kDa) et rose (35 kDa) après traitement et vert pour la TEV.

1.3.1.3. Analyse par spectrométrie de masse

Afin de confirmer les données précédentes, les bandes à 40, 55 et 75 kDa ont été découpées et envoyées à la société Proteodynamics pour analyse par spectrométrie de masse. Les protéines ont été digérées à la trypsine dans le gel, puis les peptides ont été extrait du gel et analysés par MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry). Les peptides ont été identifiés par comparaison avec des masses théoriques des peptides trypsiques de la séquence du récepteur A2A et la séquence de certains peptides a été vérifiée par fragmentation. Cette étude a tout d'abord permis de confirmer que toutes les bandes examinées correspondent au récepteur A2A. Cependant, cette analyse protéomique n'a pas permis de vérifier la région N-terminale des protéines (aucun peptide identifié) et un peptide à la position [23-133], trop grand pour être extrait efficacement du gel, n'est pas visible. Par contre, les peptides de la région C-terminale sont correctement analysables (**Figure 44**). Ceci a permis de confirmer que les bandes à 75 et 55 kDa ont une extrémité C-terminale intacte tandis que la bande à 40 kDa possède une délétion C-terminale située après la lysine 422. En effet, pour cette bande le dernier site de coupure intact de la trypsine est à la position 422, les peptides aux positions [423-475], [476-491] et [535-545] étant absents. Par ailleurs, la carte peptidique de la protéine à 75 kDa n'a pas permis de montrer la présence d'un complexe avec une autre protéine ou de peptides supplémentaires indiquant des modifications post-traductionnelles. Cependant, ces résultats n'excluent pas de façon indiscutable ces possibilités. Cette étude n'a donc pas permis d'expliquer l'origine de cette augmentation de masse apparente.

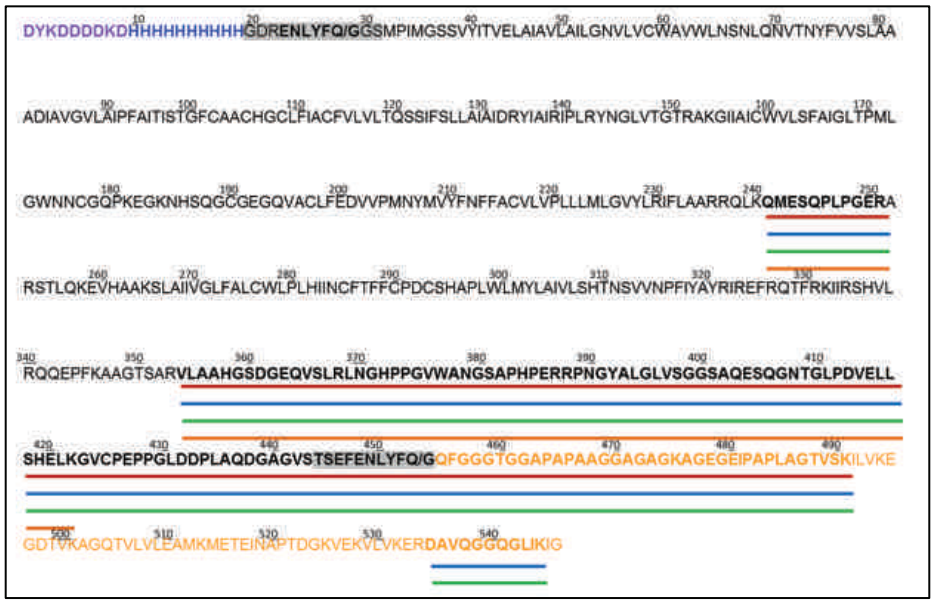


Figure 44 : Illustration du recouvrement de séquence des peptides analysés par spectrométrie de masse

La séquence du récepteur A2A est représentée en code à une lettre avec les étiquettes Flag (en violet), 10-histines (en bleu), séquence de biotinylation (en orange) et 2 sites de clivages par la Tev (surlignés en gris). Les peptides identifiés sont représentés en gras. Les régions couvertes par les peptides identifiés sont indiquées par des lignes : les bandes à 75 kDa (rouge) et 55 kDa (bleue) de la fraction 23 et les bandes à 55 kDa (verte) et 40 kDa (orange) de la fraction 24.

Ainsi ces différentes approches ont permis de mettre en évidence que la forme à 55 kDa semble être la protéine complète tandis que celle à 40 kDa correspondrait à une forme avec une délétion C-terminale. Cette forme tronquée, qui est déjà présente dans les préparations de membranes, peut être le résultat d'une dégradation protéique lors de la lyse des cellules, bien que des inhibiteurs de protéase aient été utilisés, ou d'un arrêt spontané de la traduction lors de la production des protéines. Concernant la forme à environ 75 kDa, elle semble correspondre à une protéine complète avec une variation qui augmente la masse apparente. Les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure sur l'origine exacte de cette augmentation de masse, mais l'hypothèse la plus vraisemblable est sans doute celle d'une dimérisation formant un complexe résistant à la dénaturation au SDS-PAGE.

1.3.2. Analyse de l'homogénéité et de l'état d'oligomérisation

L'homogénéité et l'état d'oligomérisation du récepteur A2A purifié ont été analysés par deux techniques différentes : le SEC-MALS et la microscopie électronique.

1.3.2.1. Analyse en SEC-MALS

J'ai réalisé une analyse en SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering) sur un échantillon purifié du A2A (fractions 23 et 24 regroupées et concentrées à 0,65 mg/ml). Le chromatogramme (**Figure 45**) révèle un pic majoritaire de protéines précédé d'un léger épaulement de protéines sous un autre état oligomérique. Cette expérience a permis de déterminer le poids moléculaire moyen des espèces en solution. L'épaulement comprend des protéines de poids moléculaires variables compris entre 0,3 et 3 MDa correspondant à des formes multimériques ou agrégées. Les protéines du pic majoritaire ont un poids moléculaire moyen d'environ 130 kDa et correspondent très certainement à des protéines monomériques. En effet, le poids moléculaire théorique du récepteur A2A étant de 59 kDa et celui des micelles de DDM étant d'environ 70 kDa, le récepteur A2A en micelle de DDM est attendu à un poids moléculaire proche de 129 kDa. Cette technique permet aussi de déterminer la proportion de chacune des espèces en solution. L'analyse révèle que l'échantillon contient environ 90 % de protéines monomériques et seulement 10 % de protéines sous formes multimériques ou agrégées.

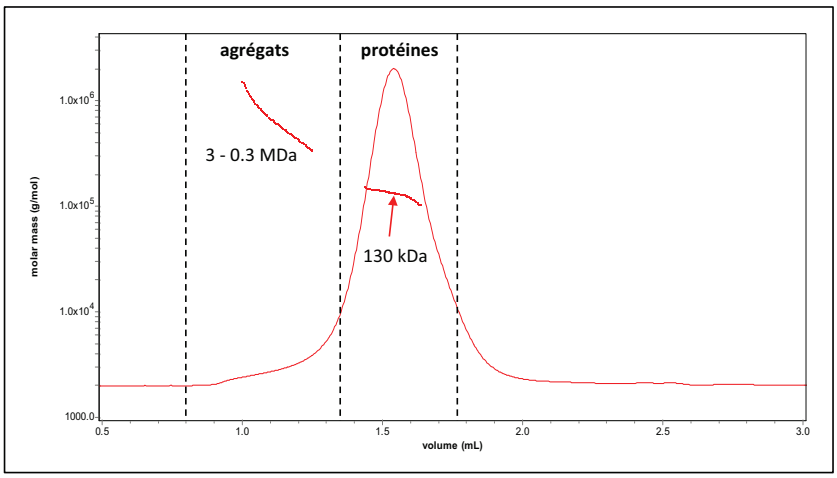


Figure 45 : Spectre de SEC-MALS obtenu pour le récepteur A2A purifé

Chromatogramme de l'absorbance à 280 nm en focntion du volume d'élution (tracé rouge fin) et détermination de masse moléculaire (trait rouge épais).

1.3.2.2. Analyse en microscopie électronique

Un échantillon purifié du récepteur A2A (fraction 23 diluée à 0,06 mg/ml) a été envoyé pour analyse à la plate-forme « contrôle qualité par microscopie électronique » de l'IBS (Institut de Biologie Structurale) de Grenoble, où les expériences ont été réalisées par les docteurs Daphna Fenel et Guy Schoehn. L'observation en microscopie électronique à coloration négative de cet échantillon montre que la préparation est assez homogène (**Figure 46**). On observe de nombreuses particules isolées (certaines sont repérées par des cercles sur la figure), dont la taille semble correspondre à des monomères en comparaison à une protéine témoin de 60 kDa. On remarque seulement quelques rares agrégats (repérés par des carrés sur la figure). Bien que cette technique soit plutôt qualitative et non quantitative, on peut estimer que l'échantillon contient plus de 60 % de particules isolées.

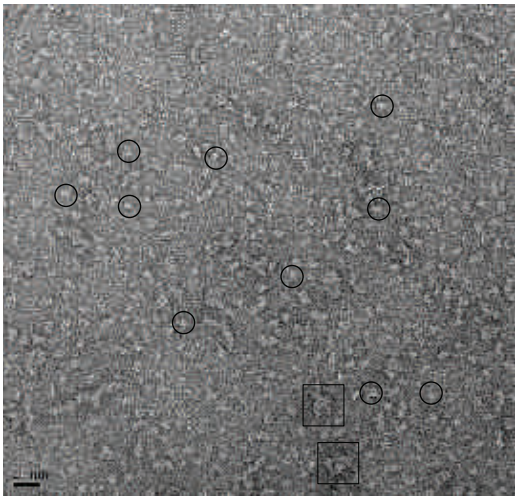


Figure 46 : Image de microscopie électronique à coloration négative du récepteur A2A purifé

La fraction 23 du récepteur A2A purifié sur chromatographie d'exclusion a été diluée à 0,06 mg/ml et observée après coloration au sodium silicotungstate (pH 7,4). Les particules entourées par des cercles représentent vraisemblablement des protéines monomériques et celles repérées par des carrés seraient plutôt des agrégats.

Ainsi les techniques de SEC-MALS et de microscopie électronique donnent des résultats qui sont en bonne adéquation. Toutes deux montrent que l'échantillon purifié du récepteur A2A est plutôt homogène, avec une grande majorité de protéines vraisemblablement sous forme monomérique et une très faible proportion de protéines sous forme multimérique ou agrégée.

1.4. Etude d'interactions ligand/récepteur purifié

L'activité de liaison de ligand du récepteur A2A purifié a été évaluée par deux méthodes permettant les études d'interaction protéine/ligand : les tests de fixation de ligand radioactif à l'équilibre et la résonance plasmonique de surface (SPR).

1.4.1. Etude par des tests de fixation de radioligand à l'équilibre

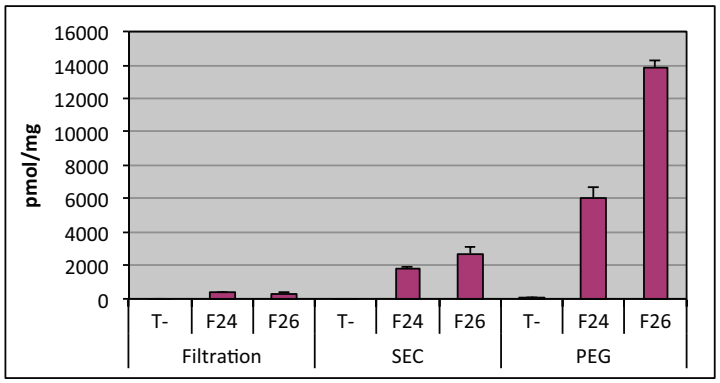
Pour les tests de fixation de radioligand à l'équilibre, nous avons utilisé l'antagoniste tritié [^{3}H]ZM241385 comme ligand traceur pour mesurer la liaison totale. Après incubation avec les récepteurs, les radioligands libres en solution sont éliminés par lavage, afin de mesurer la quantité totale de radioligands fixés. Dans un test parallèle, le même mélange est additionné d'un large excès de ligand froid ZM241385, pour déterminer la liaison non spécifique. La différence entre les deux mesures permet de mesurer la quantité de radioligands fixés de façon spécifique, reflétant le nombre de récepteurs actifs. Le signal mesuré en coup par minute (cpm) est converti en picomole de récepteurs ayant fixé un radioligand par milligramme de protéine totale (pmol/mg).

1.4.1.1. Mise au point d'un test adapté aux protéines purifiées

La séparation des radioligands libres et fixés est classiquement réalisée par filtration sur filtre GF/B, où les radioligands liés aux récepteurs sont retenus sur le filtre tandis que les radioligands libres passent à travers. Cependant, différentes expériences ont suggéré que cette méthode, très efficace pour les préparations membranaires, avait tendance à sous-estimer l'activité des récepteurs purifiés, qui pourraient passer à travers le filtre compte tenu de leur taille. Afin de s'affranchir des problèmes de porosité du filtre, j'ai testé deux méthodes alternatives pour la séparation : la séparation sur mini-colonne de chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) en mélange avec de la γ-globuline avant la filtration sur filtre GF/B. Les mini-colonnes SEC permettent de séparer les radioligands fixés sur les récepteurs, qui forment des complexes de grosse taille et sortent rapidement de la colonne, alors que les radioligands libres de petite taille sont retenus dans les micropores de la résine et éluent plus tard. La précipitation avant filtration a pour objectif de faire précipiter les récepteurs avec leurs radioligands fixés dans un amas de PEG et γ-globuline, augmentant artificiellement la taille des récepteurs, empêchant ainsi leurs passages à travers le filtre GF/B. J'ai réalisé un certain nombre de tests préliminaires et contrôles négatifs, afin de vérifier la spécificité de la séparation et d'optimiser les conditions expérimentales. Puis, j'ai effectué des tests de fixation de radioligand à l'équilibre, à une concentration de 50 nM de [^{3}H]ZM241385, sur des échantillons purifiés du récepteur A2A (fractions 24 et 26), en utilisant comparativement les trois méthodes de séparation (**Figure 47**). On note que dans les témoins négatifs de tampon contenant du radioligand, il n'y a pas de radioactivité

spécifique mesurée en absence de récepteur, démontrant que le radioligand libre est bien éliminé par les trois techniques de séparation (il n'est pas resté sur le filtre, sorti de la colonne SEC ou piégé dans le complexe γ-globuline/PEG). De plus, ces résultats mettent en évidence que, dans les conditions testées, la filtration classique sous-estime effectivement l'activité de liaison par rapport aux techniques alternatives. Ils révèlent également que la séparation sur mini-colonne SEC permet de mesurer une liaison plus élevée, mais que la précipitation au PEG avant filtration montre la plus haute activité spécifique. C'est donc cette dernière méthode qui a été retenue pour la suite du projet.

A



B

		pmol/mg
Filtration	T-	ns
	F24	396 ± 4
	F26	328 ± 58
SEC	T-	ns
	F24	1861 ± 89
	F26	2721 ± 371
PEG	T-	84 ± 33
	F24	5986 ± 749
	F26	13794 ± 499

Figure 47 : Test de fixation du radioligand [3H]ZM241385 avec différentes méthodes de séparation

A : Graphique illustrant les résultats et **B** : tableau de valeurs exprimées en pmol de récepteurs ayant fixés un ligand par mg de protéine totale (pmol/mg), du test de fixation de radioligand réalisé sur les fractions F24 et F26 du récepteur A2A purifié et sur un témoin négatif de tampon avec du radioligand (noté T-). Les valeurs non significatives sont indiquées par l'abréviation : ns. Trois méthodes de séparation ont été employées : la filtration classique sur GF/B (notée Filtration), la séparation sur mini-colonne de chromatographie d'exclusion (notée SEC) et la précipitation au polyéthylène glycol avant filtration sur GF/B (notée PEG).

1.4.1.2. Courbe de saturation de radioligand sur le récepteur A2A purifié

J'ai alors réalisé des courbes de saturation, en utilisant la séparation par précipitation au PEG avant filtration, sur les différentes fractions du récepteur A2A purifié, afin de déterminer la quantité totale de récepteurs actifs (Bmax) et l'affinité de liaison (Kd). Les résultats présentés dans la **figure 48** indiquent que les fractions 23, 24 et 25 montrent un Bmax compris entre 5400 et 7200 pmol/mg et la fraction 26 d'environ 15700 pmol/mg. Pour les quatre fractions, l'affinité mesurée est assez proche, de l'ordre de 16 nM. Bien que l'analyse par le logiciel Graphpad Prism concorde avec un seul site d'affinité, la fraction 26, enrichie en récepteur délété à l'extrémité C-terminale, révèle une activité de liaison plus élevée que les fractions 23 à 25, qui contiennent, majoritairement ou en proportion équivalente, le récepteur sous sa forme entière. Il semblerait donc que l'activité mesurée soit dépendante de la composition des fractions en ces différentes formes de récepteurs et que la forme tronquée soit plus active que la forme entière. Par ailleurs, sachant que 100 % de récepteurs A2A purs et actifs correspondent en théorie à 17 000 pmol/mg pour la forme pleine et 22 000

pmol/mg pour la forme tronquée, ces résultats indiquent qu'il y aurait entre 30 et 40 % de récepteurs actifs dans les fractions 23 à 25 et jusqu'à 70 à 90 % dans la fraction 26.

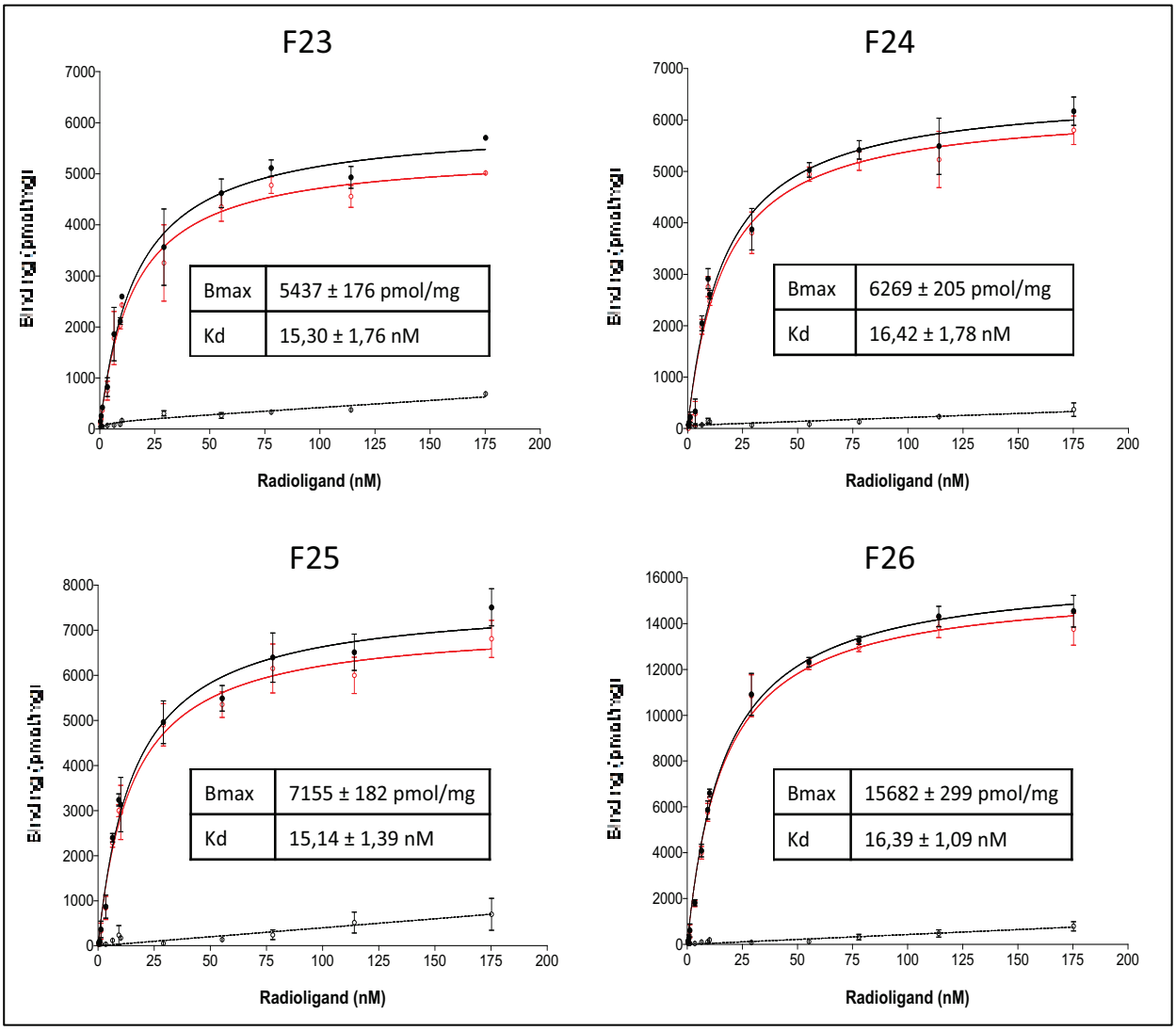


Figure 48 : Courbe de saturation de radioligand sur différentes fractions purifiées du récepteur A2A

Graphique représentant la liaison exprimée en pmol/mg en fonction de la concentration en radioligand exprimée en nanomolaire (nM). La liaison totale figure en trait plein noir, la liaison non spécifique en pointillé noir et la liaison spécifique en trait plein rouge.

1.4.1.3. Etude de la stabilité de l'activité de liaison dans le temps

J'ai purifié le récepteur A2A que j'ai ensuite aliquoté et conservé dans trois conditions différentes : à 4°C, à -20°C et à -20°C en présence de 10% de glycérol. Les échantillons ont ensuite été soumis à un test de fixation de radioligand à l'équilibre, avec une concentration de 50 nM de [^{3}H]ZM241385, en utilisant la séparation par précipitation au PEG avant filtration. Ceci m'a permis de comparer l'activité de liaison mesurée le lendemain de la purification et les jours suivants, afin d'évaluer la stabilité de l'activité du récepteur dans le temps et en fonction de la condition de conservation (**Figure 49**).

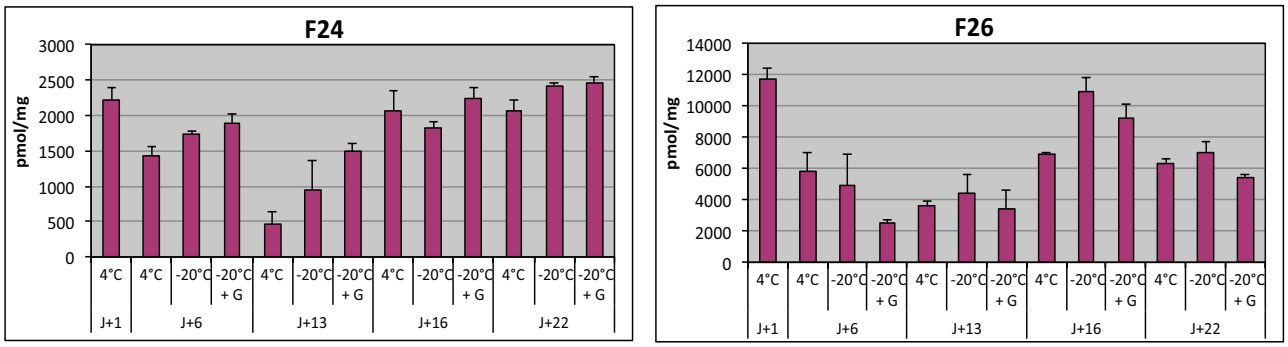


Figure 49 : Suivi de l'activité de liaison de radioligand en cours du temps

Graphique illustrant les résultats des tests de fixation de radioligand réalisés dans les jours qui ont suivis la purification (le jour J étant le jour de la purification). Ces tests ont été effectués sur les fractions F24 et F26 du récepteur A2A purifié, conservé dans différentes conditions à 4°C, à -20°C et à -20°C avec 10% de glycérol (-20°C + G). Les résultats sont exprimés pmol de récepteur ayant fixé un ligand par mg de protéine totale (pmol/mg).

Ces résultats montrent une certaine fluctuation de l'activité mesurée, qui semble être liée aux conditions expérimentales. Par exemple, à J+13 l'activité mesurée est plus faible qu'à J+16, alors que cela devrait être l'inverse, et ce pour les deux échantillons. Ceci peut s'expliquer par des variations du pipetage des faibles volumes, du processus de précipitation, des tampons d'incubation et de lavage, de la vitesse d'aspiration… Malgré tout, on peut voir que la fraction 24 a une activité proche de 2500 pmol/mg à J+1 comme à J+22, suggérant que l'échantillon est relativement stable. Pour la fraction 26, l'activité de liaison est mesurée d'environ 12 000 pmol/mg à J+1 ainsi qu'à J+16 mais aux alentours de 6000 pmol/mg à J+22. Cette différence peut être liée à la variabilité expérimentale ou indiquer une instabilité de l'activité de cet échantillon. Par ailleurs, bien qu'il semble y avoir quelques différences d'activité mesurée, aucune tendance ne ressort réellement quant à la meilleure condition de conservation à retenir. Au vu de la variabilité observée, cette étude mériterait certainement d'être reproduite, afin d'évaluer de façon plus précise la stabilité des récepteurs purifiés dans le temps. Néanmoins, cette analyse révèle que même après 22 jours l'activité mesurée demeure relativement élevée et que l'on peut raisonnablement travailler avec l'échantillon jusqu'à trois semaines après sa purification.

1.4.2. Etude par résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technologie qui permet d'étudier des interactions par la mesure de la variation de l'indice de réfraction de la lumière, due à un changement de masse lors de l'interaction, au niveau d'une surface sensible en or déposée sur une puce en verre. Le signal mesuré est exprimé en unité de résonance (RU). Cette technique ne nécessite pas de marquage fluorescent ou radioactif des partenaires étudiés, mais l'un des deux doit être immobilisé sur la puce tandis que l'autre est injecté dans le flux du canal de mesure. Dans notre cas, nous avons fixé le récepteur A2A purifié en DDM sur une puce et injecté le ligand antagoniste

ZM241385 afin de mesurer la fixation du ligand. Parallèlement, le ligand a également été injecté sur une surface sensible de référence (canal vide sans protéine immobilisée) pour définir la liaison non spécifique du ligand sur la surface sensible. La différence entre les deux mesures permet d'établir la liaison spécifique du ligand sur le récepteur.

1.4.2.1. Capture du récepteur A2A purifié sur une puce SPR

Nous avons choisi de capter le récepteur A2A par la biotine à l'extrémité C-terminale sur une puce SA (Streptavidine) afin d'orienter les récepteurs, de façon à favoriser l'accessibilité du site de fixation de ligand coté N-terminal. Cette méthode implique que seuls les récepteurs entiers biotinylés sont immobilisés tandis que les récepteurs tronqués ne sont pas retenus. Par ailleurs, l'interaction streptavidine-biotine étant très forte, il sera difficile de régénérer la surface active, c'est à dire d'éliminer toutes les protéines en vu d'une nouvelle capture. De ce fait, une seule capture par surface active pourra être réalisée. Après avoir testé différents temps de contact et concentrations en récepteurs purifiés, j'ai identifié une condition permettant d'obtenir un niveau de capture de l'ordre de 7000 RU. Compte tenu des masses moléculaires du récepteur A2A et du ligand ZM241385, dans le cas d'une interaction de stoechiométrie 1:1 (un ligand pour un récepteur), il est possible d'obtenir un signal maximum d'interaction (Rmax) d'environ 40 RU, ce qui est suffisant pour visualiser une interaction.

1.4.2.2. Test d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR

J'ai ensuite réalisé des tests préliminaires, afin de voir s'il était possible de visualiser une interaction entre le ligand ZM241385 et le récepteur A2A. Dans un premier temps, j'ai injecté différentes concentrations de ligand sur la surface où le récepteur a été capté et sur la surface de référence. Les résultats montrent une augmentation du signal en RU correspondant à une interaction. Ceci met en évidence que le récepteur A2A, une fois capté sur la puce, est toujours capable de lier le ligand ZM241385 (**Figure 50**). Cependant, bien que des concentrations croissantes en ligand aient été injectées, on n'observe pas vraiment de dose-réponse claire. Ceci est probablement lié au fait qu'il n'y a pas un bon retour à la ligne de base lors de la phase de dissociation. En effet, il apparaît que le ligand ZM241385 a une vitesse de dissociation lente, comme cela a été observé dans d'autres études (Rich *et al.*, 2011 ; Robertson *et al.*, 2011). Comme nous n'avons pas fait de régénération de la surface avant de passer à l'injection suivante, certains sites devaient déjà être occupés par des ligands, limitant le nombre de sites disponibles lors de l'injection suivante.

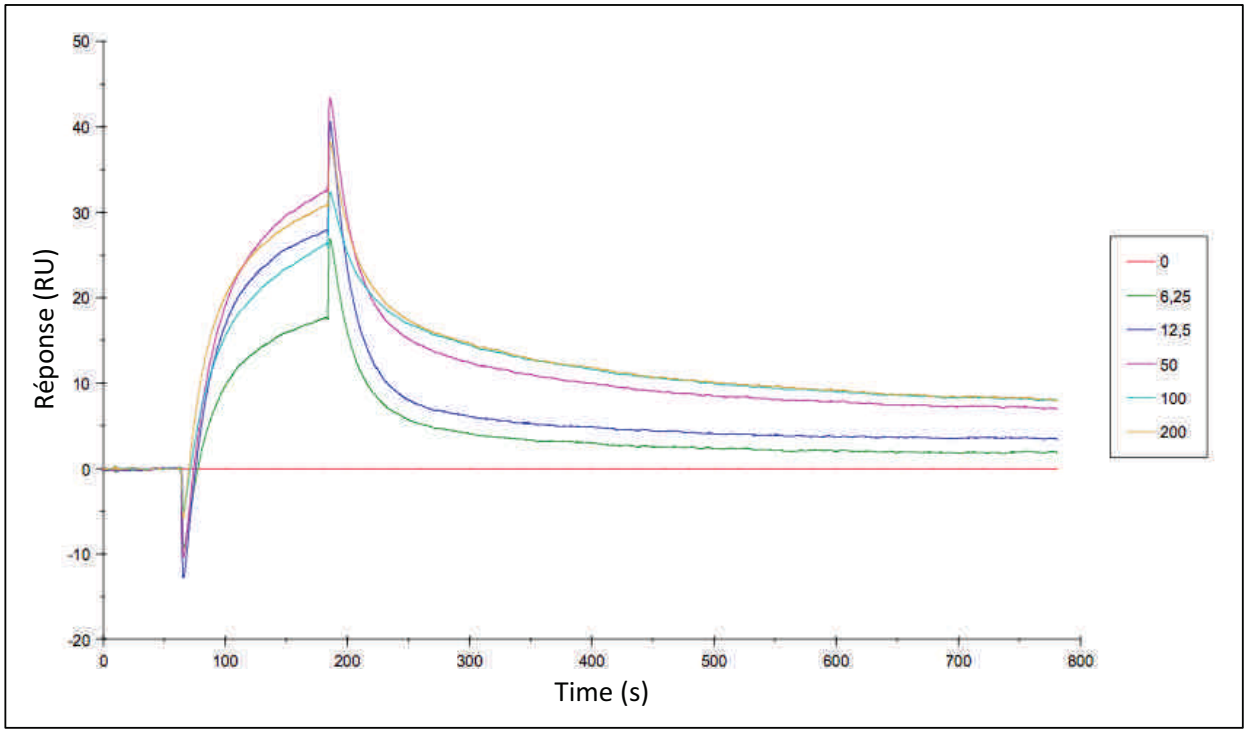


Figure 50 : Sensorgramme des tests d'interaction du ligand ZM241385 avec le récepteur A2A par SPR

Le récepteur A2A a été immobilisé sur une puce SA (Streptavidine) et des concentrations croissantes en ligand ZM241385 (0 - 6,25 - 12,5 - 50 - 100 - 200 nM) ont été injectées dans des cycles successifs. Les courbes ont été corrigées par rapport aux signaux observés dans le canal de référence.

1.4.2.3. Etude cinétique en un seul cycle de l'interaction ligand/récepteur par SPR

Pour pallier à ce problème, nous avons décidé de tester une étude cinétique en un seul cycle (« One single cycle kinetic »), comme cela a été réalisé dans une autre étude (Zhukov *et al.*, 2011). Par cette méthode, on observe la liaison du ligand ZM241385 sur le récepteur A2A avec un effet dose-réponse (**Figure 51**). Le logiciel d'analyse, qui utilise des algorithmes d'ajustement, comparant les données expérimentales avec des courbes théoriques de modèles de liaison moléculaire bien connus, permet de déterminer les constantes de l'interaction. Dans cette expérience, l'analyse indique qu'il s'agit d'une interaction de stoechiométrie 1:1, avec une affinité de l'ordre de 10 à 20 nM et un Rmax expérimental correspondant à 90% du Rmax théorique, indiquant qu'il y aurait 90 % de récepteur actif. Cependant, il faut noter que les duplicats ne sont pas tout à fait superposables et que la courbe modèle ne corrèle pas parfaitement aux courbes expérimentales, ces valeurs sont donc indicatives. Les conditions expérimentales nécessiteraient d'être optimisées et l'expérience reproduite un plus grand nombre de fois, pour déterminer de façon plus précise les constantes de cette interaction. Toutefois, même si cette étude est préliminaire, les résultats obtenus sont très encourageants.

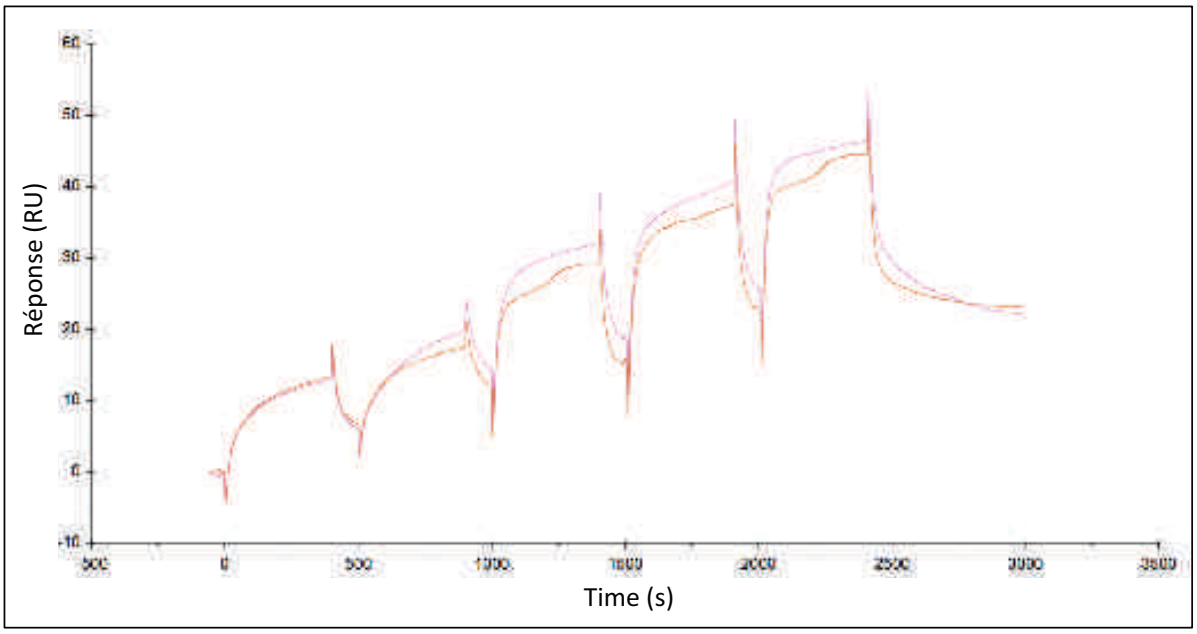


Figure 51 : Sensorgramme de l'étude cinétique de l'interaction de ligand avec le récepteur A2A par SPR

Le récepteur A2A a été immobilisé sur une puce SA (Streptavidine) et des concentrations croissantes en ligand ZM241385 (0 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 nM) ont été injectées successivement en un seul cycle. Les courbes ont été corrigées par rapport aux signaux observés dans le canal de référence. L'expérience a été réalisée en duplicat, donnant chacun une courbe (rose et rouge).

Ainsi, les études d'interaction ligand/récepteur purifié, réalisées par test de fixation de radioligand et résonance plasmonique de surface, ont permis de mettre en évidence que le récepteur A2A, purifié dans nos conditions, était capable de lier le ligand ZM241385. L'affinité mesurée est cohérente entre les deux techniques et proche de celle des récepteurs en membrane (Kd entre 10 et 20 nM). Par contre, le nombre total de site de liaison diffère un peu entre les deux approches. En effet, la SPR semble indiquer 90% de récepteurs actifs, sachant que seuls les récepteurs entiers biotinylés ont pu être captés, alors que les tests de fixation de radioligand révèlent 40% de récepteurs actifs pour les fractions enrichies en récepteurs entiers biotinylés. Néanmoins, il faut rappeler que les résultats de SPR sont assez préliminaires et que cette technique nécessite encore de l'optimisation.

1.5. Etude de thermostabilité du récepteur A2A purifié

La thermostabilité du récepteur A2A purifié a été étudiée par des techniques de fluorescence liée à la stabilité thermique (TSA pour Thermal Shift Assay) qui permettent d'évaluer la stabilité des protéines sur une rampe de température. Ces techniques permettent notamment de déterminer le point de fusion (Tm) des protéines, c'est à dire la température à laquelle 50 % des protéines sont dénaturées. Le Tm mesuré peut être comparé en fonction de l'environnement dans lequel les protéines se trouvent (tampon, sels, pH, détergent, glycérol, ligand, lipide) permettant d'identifier les conditions dans lesquelles les récepteurs sont les plus stables. Afin de voir si le ligand

ZM241385 pouvait avoir un effet stabilisant sur le récepteur A2A, nous avons voulu déterminer le Tm du récepteur en absence totale de ligand puis en présence de concentration croissante en ligand ZM241385. Pour cette étude, nous avons donc travaillé avec le récepteur A2A purifié en absence de ligand DPCPX, après nous être assuré que le récepteur purifié dans cette condition présentait les mêmes caractéristiques que celui purifié en présence de DPCPX.

1.5.1. Détermination du Tm avec l'appareil Optim® 1000

L'appareil Optim® 1000, développé par la société Avacta, mesure la fluorescence intrinsèque des protéines, qui varie lors de leur dénaturation quand elles sont soumises à une rampe de température. Des échantillons purifiés du récepteur A2A ont été confiés à cette société pour analyse et détermination du Tm à l'aide de cet appareil.

1.5.1.1. Détermination du Tm du récpeteur A2A en absence de ligand

Dans un premier temps, nous avons demandé à la société Avacta de mesurer le Tm du récepteur A2A purifié en absence de ligand avec l'appareil Optim® 1000. Cette analyse a permis de mesurer un Tm de 47,4°C pour le récepteur en absence de ligand (**Figure 52**).

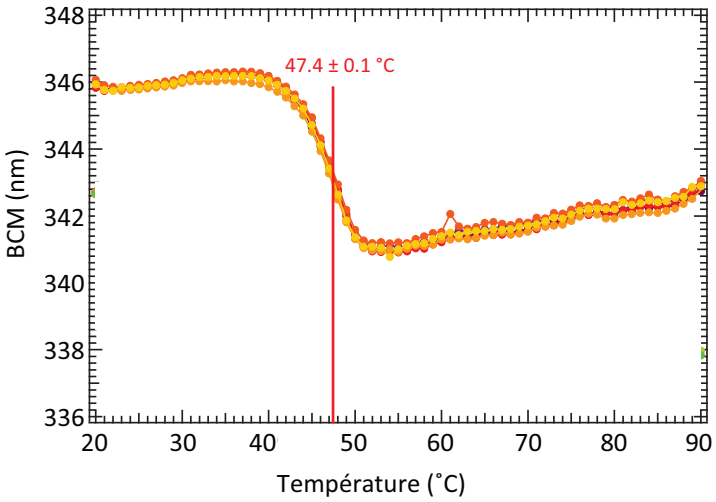


Figure 52 : Détermination du Tm du récepteur A2A en absence de ligand par l'appareil Optim® 1000

A partir des spectres d'émission de fluorescence des protéines, une moyenne barycentrique de l'émission de fluorescence est calculée car elle permet de lisser le bruit de fond des données spectrales. Ce graphique représente la moyenne barycentrique de l'émission de fluorescence (BCM pour Barycentric mean) exprimée en nanomètre en fonction de la température en °C. Le Tm correspond à la température coincidant à la moitié entre le minimum et le maximum des valeurs de BCM de cette courbe.

1.5.1.2. Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de ligand

L'appareil Optim® 1000 a ensuite été utilisé pour mesurer le Tm du récepteur A2A en présence de différentes concentrations en ligand ZM241385, afin d'évaluer si ce ligand a un effet

stabilisant sur le récepteur. Pour cela, une concentration constante en récepteur A2A a été additionnée de concentration croissante en ligand ZM241385 (0 - 0,1 - 0,316 - 1 - 3,16 - 10 µM) et le Tm de ces différents échantillons a été mesuré. Les résultats présentés dans la **figure 53** montrent que le Tm mesuré pour le récepteur A2A augmente lorsque la concentration en ligand augmente. Plus précisément, pour les concentrations de 0,1 et 0,316 µM le Tm est similaire à celui mesuré en absence de ligand (47,4°C), par contre à partir de 1 µM le Tm augmente à 48,8°C et continue de croitre avec l'augmentation de la concentration en ligand jusqu'à 52,3°C à 10 µM. Ces données suggèrent que le ligand ZM241385 a un effet stabilisant sur le récepteur A2A.

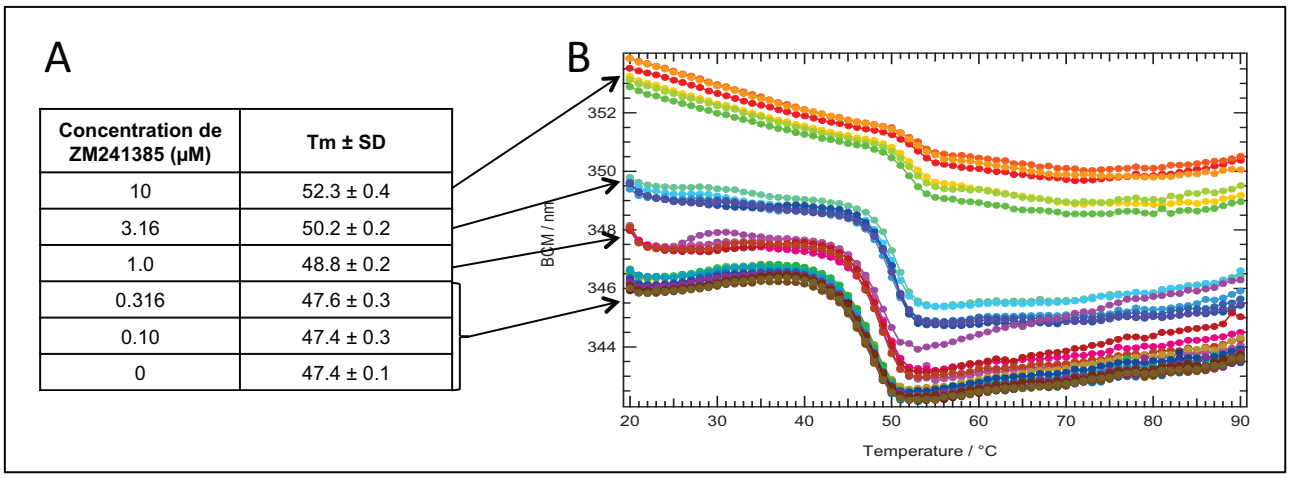


Figure 53 : Détermination du Tm du récepteur A2A en présence de concentration croissante en ligand par l'appareil Optim® 1000

A : Tableau de valeurs des Tm mesurés en fonction de la concentration en ligand ZM241385 mise en jeu. **B** : Graphique représentant la moyenne barycentrique de l'émission de fluorescence (BCM pour Barycentric mean) exprimée en nanomètre en fonction de la température en °C, pour les différentes échantillons analysés.

1.5.2. Détermination du Tm du récepteur A2A avec le kit ProteoStat™

La méthode utilisant le kit ProteoStat™ mesure l'émission de fluorescence d'une sonde, qui est non fluorescente en milieu aqueux et qui émet de la fluorescence quand elle se fixe. Cette sonde se lie aux parties hydrophobes des protéines, qui se retrouvent exposées lors de la dénaturation par l'augmentation de température. Avec les protéines membranaires, la présence de détergent à une concentration supérieure à la CMC est indispensable pour maintenir les protéines en solution. Cependant, les détergents possèdent une queue hydrophobe sur laquelle la sonde peut se fixer et génèrent un bruit de fond élevé. En effet, une émission de fluorescence importante est mesurée dans le tampon même en absence de protéine, qui n'est donc pas spécifique à la dénaturation des protéines. Pour adapter cette méthode à la présence de détergent, j'ai testé différentes concentrations en protéine, afin d'améliorer le ratio signal sur bruit. De plus, j'ai soustrait les valeurs de fluorescence du tampon seul à celles des échantillons, afin d'en retirer le signal

spécifique. Ceci m'a ainsi permis de déterminer un Tm de 47,25°C pour le récepteur A2A purifié en absence de ligand (**Figure 54**).

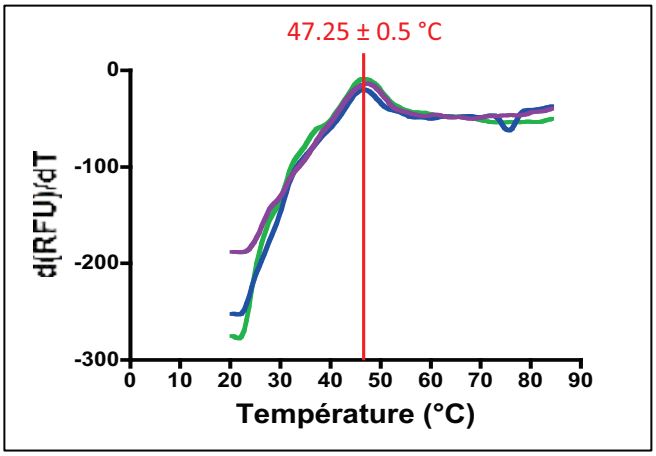


Figure 54 : Détermination du Tm du récepteur A2A en absence de ligand avec le kit ProteoStat™

Graphique représentant la dérivée première des valeurs de fluorescence (d(RFU)/dT) en fonction de la température en °C. Le Tm correspond à la température coincidant avec le sommet du pic. L'expérience a été réalisée en triplicat, chaque courbe correspondant à une expérience indépendante.

Ainsi le Tm du récepteur A2A purifié a été mesuré en absence de ligand par deux méthodes qui montrent une très bonne corrélation du Tm mesuré par les deux techniques (47,25 et 47,4°C). La mesure du Tm du récepteur, en présence d'une concentration croissante en ligand ZM241385, avec l'appareil Optim® 1000, a permis de mettre en évidence un effet stabilisant de ce ligand sur le récepteur A2A. A partir d'une concentration de 1 µM le Tm augmente à 48,8°C et jusqu'à 52,3°C avec 10 µM de ligand. Dans cette étude préliminaire, nous avons testé une première gamme de concentration en ligand mais d'autres concentrations pourraient être testées dans le but de visualiser plus précisément l'évolution du Tm et évaluer jusqu'à quelle valeur il peut être augmenté. De plus, il serait intéressant de réaliser le même type d'expérience avec le kit ProteoStat™ afin de voir si le même phénomène est observé et si les valeurs de Tm sont cohérentes avec celles mesurées par l'appareil Optim® 1000.

1.6. Discussion

1.6.1. Production et purifcation du récepteur A2A

Il s'agissait dans cette étude de trouver les conditions de production et purification du récepteur A2A dans sa version native. Nous avons réussi à identifier des conditions permettant d'obtenir un échantillon assez pur, monomérique, homogène, actif et stable. Néanmoins, ce récepteur est présent sous deux formes majoritaires : une forme entière et une forme tronquée à l'extrémité C-terminale. Nous avons souhaité travailler avec un récepteur, portant certes des

étiquettes pour la purification, mais le plus natif possible. C'est à dire un récepteur non délété, non muté et non fusionné à une protéine, afin de se rapprocher au mieux de la réalité biologique pour les études à visées pharmaceutiques. Cependant, le récepteur A2A possèdent la particularité d'avoir une extrémité C-terminale considérablement longue, qui est par conséquent particulièrement sensible à la protéolyse.

Pour faire face à ce problème, une équipe a développé un récepteur A2A génétiquement délété de 96 acides aminés à l'extrémité C-terminale. Ils ont montré que ce mutant est résistant à la protéolyse et que cette délétion n'affecte ni la liaison de ligand, ni l'activation de l'adénylate cyclase, ni la désensibilisation (Weiss & Grisshammer, 2002). Par la suite, dans la plupart des études publiées, l'extrémité C-terminale du récepteur A2A a été génétiquement délétée, pour réduire l'hétérogénéité liée à la protéolyse, mais aussi pour diminuer la flexibilité de la protéine dans le cadre d'études à des fins structurales (Jaakola *et al.*, 2008 ; Magnani *et al.*, 2008 ; Dore *et al.*, 2011 ; Rich *et al.*, 2011 ; Robertson *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2011 ; Zhukov *et al.*, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011a ; Lebon *et al.*, 2011b ; Hino *et al.*, 2012). Une équipe a tout de même travaillé sur le récepteur A2A non délété, avec une étiquette 10-histidines en C-terminal, exprimé dans la levure *S. cerevisiae*, et ne semble pas avoir rencontré de problème de dégradation de protéine (O'Malley *et al.*, 2007 ; O'Malley *et al.*, 2010).

Dans notre cas, nous souhaitions travailler avec un récepteur A2A entier, mais nous produisons malgré tout une forme tronquée à l'extrémité C-terminale. Ceci peut être le résultat d'une dégradation protéique lors de la lyse des cellules ou d'un arrêt spontané de la traduction lors de la synthèse protéique. Afin d'obtenir un échantillon parfaitement uniforme, nous pouvons envisager différentes options : il s'agirait soit de modifier la construction et travailler avec une forme génétiquement délétée d'une partie de l'extrémité C-terminale, soit de revoir les conditions d'expression et de lyse afin de ne plus produire cette forme tronquée, soit d'employer une chromatographie d'affinité sur avidine pour séparer les formes entières biotinylées des formes délétées. Par la suite, il pourrait également être intéressant de compléter la purification par une chromatographie d'affinité de ligand, comme cela a été fait pour plusieurs RCPG (Weiss & Grisshammer, 2002 ; Warne *et al.*, 2003 ; White & Grisshammer, 2010). Ceci nous permettrait de sélectionner uniquement les récepteurs capables de lier un ligand et d'enrichir l'échantillon en récepteur actif jusqu'à 100%.

1.6.2. Mise au point d'un test de fixation de radioligand adapté aux récepteurs purifiés

La filtration classique paraissant sous-estimer l'activité mesurée pour les échantillons purifiés, nous avons voulu mettre au point un test de fixation de radioligand à l'équilibre avec une

méthode de séparation plus adaptée aux protéines purifiées. Pour cela, j'ai testé des techniques alternatives de séparation des radioligands libres et fixés afin d'identifier celle qui permettait de mesurer l'activité spécifique la plus élevée. La précipitation des échantillons purifiés par un mélange de γ-globuline/PEG juste avant la filtration sur GF/B a déjà été employée avec succès pour mesurer l'activité de liaison de RCPG purifiés (Christoffers *et al.*, 2003 ; de Jong *et al.*, 2004 ; Christoffers *et al.*, 2005). Dans nos conditions, cette technique s'est avérée la plus efficace et nous a permis de mesurer l'activité la plus élevée. C'est donc cette méthode qui a été retenue pour la suite de l'étude.

Par ailleurs, la méthode de séparation sur mini-colonne SEC a également été décrite dans la littérature et utilisée pour mesurer l'activité de liaison de plusieurs RCPG purifiés (Park *et al.*, 2001 ; Weiss & Grisshammer, 2002 ; Park & Wells, 2003 ; Chelikani *et al.*, 2006 ; Fraser, 2006 ; Gan *et al.*, 2006 ; Noguchi & Satow, 2006). Cependant, dans nos conditions elle semble tout de même sous-estimer l'activité de liaison. Ceci est peut-être lié à un biais technique car la séparation sur la colonne nécessite une centrifugation qui peut amener de la variabilité en fonction du temps et de la vitesse de rotation, des vitesses d'accélération et décélération, du type de rotor… Notamment, il est préférable d'utiliser un rotor oscillant afin que la force centrifuge s'exerce dans un axe parallèle à l'axe longitudinal de la colonne favorisant l'élution des protéines. Ne possédant pas ce matériel au laboratoire j'ai utilisé un rotor à angle fixe dans lequel la force centrifuge s'exerce avec un angle de 45° par rapport à l'axe longitudinal de la colonne. Dans ces conditions, il est possible que les protéines n'aient pas été éluées correctement et qu'une partie se soient adsorbées au plastique de la colonne, sous-estimant alors l'activité mesurée.

1.6.3. Etude d'interaction ligand/récepteur purifié par SPR

L'objectif était de mettre au point l'étude d'interaction ligand/récepteur purifié par SPR et de comparer les résultats avec ceux obtenus en test de fixation de radioligand à l'équilibre. Une étude cinétique en un seul cycle (« One single cycle kinetic ») nous a permis de déterminer l'affinité et le nombre total de site de liaison par SPR. Les résultats sont assez cohérents entre les deux méthodes, bien que le nombre total de site de liaison diffère un peu. Cependant, l'étude en SPR est assez préliminaire et les conditions expérimentales peuvent encore être optimisées. Notamment, au cours des expériences réalisées, nous avons pu remarquer que la capture des récepteurs n'était pas parfaitement stable, ce qui peut compliquer et même fausser l'analyse cinétique. Il est donc nécessaire de stabiliser la capture des récepteurs. Pour cela, nous pourrions envisager une méthode hybride comme cela a déjà été mis en œuvre (Rich *et al.*, 2011). Cette méthode combine une capture par affinité, qui permet de sélectionner, orienter et concentrer les récepteurs, suivie d'un couplage chimique de type amine, qui permet de lier les protéines de façon covalente.

Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser la méthode de cinétique en un seul cycle pour palier au problème de la dissociation lente du ligand ZM241385, mais nous aurions également pu tester d'autres approches. Par exemple, un lavage de 60 min avec le tampon de course entre chaque injection de composé semblerait permettre un bon retour à la ligne de base (Robertson *et al.*, 2011). Nous envisageons également d'expérimenter une méthode de « régénération par déplacement » (Rich *et al.*, 2011). Dans cette approche, les ligands liés sont déplacés par un composé de faible affinité, injecté à des concentrations élevées. Celui-ci sature les sites de fixation disponibles et bloque la reliaison du ligand de haute affinité. Puis un lavage avec le tampon de course permet d'éliminer le composé de faible affinité. D'autre part, jusqu'ici nous avons utilisé une piste vide comme référence. Par la suite, la capture d'un autre RCPG, qui ne lie pas le ligand ZM241385, dans le canal de référence serait idéale pour déterminer s'il existe une liaison non spécifique. Ceci permettrait de renforcer la spécificité de la liaison du ligand ZM241385 dans le site de fixation du récepteur A2A.

1.6.4. Etude de thermostabilité

Afin de voir si le ligand ZM241385 pouvait stabiliser le récepteur A2A, nous souhaitions mesurer le Tm du récepteur en absence puis en présence de ligand. Ces expériences ont été réalisées avec l'appareil Optim® 1000 et ont montré un effet stabilisant du ligand ZM241385 sur le récepteur A2A. Avec le kit ProteoStat™ un Tm a pu être mesuré en absence de ligand, de façon cohérente avec celui mesuré par l'appareil Optim® 1000, mais l'étude en présence de ligand doit encore être réalisée. Par ailleurs, il existe une autre sonde fluorescente (CPM) qui semble plus adaptée aux protéines membranaires en présence de détergent, car elle ne se lie pas aux parties hydrophobes mais aux cystéines. Cette sonde thiol-spécifique a une fluorescence extrêmement faible en milieu aqueux mais qui augmente très fortement lorsqu'elle se lie aux cystéines. Sous réserve que la protéine possède des cystéines libres enfouies à l'intérieur de sa structure tridimensionnelle, lors de la dénaturation des protéines induite par la chaleur, ces cystéines vont être exposées et devenir accessibles à la sonde CPM. Celle-ci peut alors se lier et émettre de la fluorescence traduisant la dénaturation des protéines. Cette sonde a déjà été employée pour des études de thermostabilité avec des RCPG (Alexandrov *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2010) et notamment avec le récepteur A2A (O'Malley *et al.*, 2010). Dans ces travaux, le Tm du récepteur A2A a été mesuré en absence et en présence de ligands et un effet stabilisant des ligands a été mis en évidence. En revanche, les Tm mesurés sont moins élevés que ceux mesurés dans nos conditions. Nous souhaitons donc tester la sonde CPM, pour comparer les valeurs avec la même technique, afin d'évaluer si cette différence de Tm provient de la protéine elle-même ou de la technique employée.

D'autre part, une autre approche pour la mesure du Tm est fréquemment utilisée pour les RCPG, notamment pour l'établissement de mutants thermostables, qui n'est pas basée sur la fluorescence mais sur l'activité de liaison de ligand (Magnani *et al.*, 2008 ; Serrano-Vega *et al.*, 2008 ; Miller & Tate, 2011 ; Lebon *et al.*, 2011a). Dans ces études, les récepteurs sont incubés un temps fixe à différentes températures avant de réaliser l'expérience de fixation de radioligand. Plus la température d'incubation est élevée, plus l'activité de liaison de ligand est faible, traduisant la dénaturation des protéines. Un graphique représentant l'activité de liaison mesurée en fonction de la température permet de déterminer le Tm du récepteur. Cette méthode a été employée avec le radioligand [^{3}H]ZM241385, pour déterminer le Tm du récepteur A2A natif, afin de le comparer à celui des mutants (Magnani *et al.*, 2008 ; Robertson *et al.*, 2011). Nous avons remarqué que les Tm mesurés par cette approche sont moins élevés que ceux mesurés par les techniques utilisant la fluorescence. Il serait donc intéressant de comparer les valeurs de Tm, obtenues par la technique de fixation de radioligand et par les méthodes de fluorescence, sur un même échantillon, afin de vérifier si ces différences sont liées à l'échantillon ou dépendantes de la technique utilisée. Cela permettrait peut-être de mettre en évidence que les deux techniques ne mesurent pas le même niveau de dénaturation et que la perte de l'activité de liaison se produit avant la dénaturation tridimensionnelle des récepteurs. De la même manière, une analyse comparative sur un même échantillon de récepteur A2A purifié a montré que le Tm mesuré par la sonde CPM, qui traduit une dénaturation de la structure tridimensionnelle des protéines, est plus faible que celui mesuré par dichroisme circulaire, qui révèle une dénaturation des structures secondaires. Ceci mets en évidence que la dénaturation de la structure tridimensionnelle des protéines se produit avant la dénaturation des structures secondaires (O'Malley *et al.*, 2010).

1.6.5. Conclusions et perspectives

L'objectif de l'étude du récepteur A2A était de mettre au point un certain nombre de techniques d'analyses biochimiques et biophysiques pour ensuite pouvoir les appliquer au récepteur MT1. Certaines ont été mise au point avec succès et sont directement applicables au récepteur MT1, telles que le SEC-MALS, la microscopie électronique, le test de fixation de radioligand adapté aux protéines purifiées. D'autres nécessitent encore de l'optimisation avant de pouvoir être transférées au récepteur MT1, comme la SPR et les études de thermostabilité. Par la suite, nous aimerions approfondir certaines études afin de valider leur capacité à aller plus loin dans l'analyse. Nous voulons notamment poursuivre les études en SPR afin d'évaluer la possibilité d'analyser les interactions avec d'autres ligands mais aussi avec des partenaires protéiques et d'étudier l'effet de ligands variés sur ces interactions protéiques. Nous souhaitons également continuer les études de thermostabilité en vue de comparer différentes techniques et d'évaluer l'impact d'autres paramètres

sur la stabilité. Parallèlement, d'autres méthodes d'analyses biophysiques pourront être mise en place (dichroisme circulaire, DLS, ITC, thermophorèse…), qui renforceront les données obtenues et/ou apporteront des informations complémentaires. Par ailleurs, la qualité des échantillons actuellement produits permet de réaliser des criblages *in vitro* dans un environnement expérimental contrôlé. Des essais sont actuellement en cours avec ce récepteur, pour adapter à la présence de détergent une technique de SPR inverse qui permet de cribler une banque de ligand à l'aide de protéines purifiées. Le récepteur A2A est également utilisé pour cribler une banque de fragments d'anticorps par la technique de phage display. L'identification d'un fragment d'anticorps, interagissant avec ce récepteur, ouvrirait des perspectives de développement d'outils spécifiques pour l'immunodétection, la stabilisation du récepteur dans des études structurales ou encore pour des approches d'immunothérapie.

2. Production, purification et caratérisation du récepteur MT1

2.1. Introduction

Le récepteur de la mélatonine MT1 est le récepteur d'intérêt dans ce projet. Un des effets les plus connus de l'activation des récepteurs MT1 et MT2 par la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques, particulièrement le cycle circadien. Les dysfonctionnements dans la signalisation de la mélatonine provoquent des dérèglements physiologiques et entrainent notamment des troubles du sommeil et des phénomènes de dépression. Ils sont également impliqués dans des physiopathologies au niveau des systèmes cardiovasculaires, immunitaires, inflammatoires… Deux agonistes de la mélatonine constituent des molécules thérapeutiques et sont actuellement vendus sur le marché pharmaceutique : le Rameltéon® (Takeda Pharmaceuticals, Osaka, Japon) pour le traitement des troubles du sommeil et l'Agomélatine® (LLS, Suresnes, France) pour le traitement de la dépression. L'obtention d'informations structurales sur ces deux récepteurs, très étudiés au sein de la société Servier, revêt donc un intérêt particulier.

De nombreuses études *in vivo* ainsi qu'en contexte cellulaire ou membranaire ont été réalisées sur la mélatonine et ses récepteurs afin d'obtenir des informations sur leurs rôles physiologiques et leurs voies de signalisations (Slominski *et al.*, 2012). Des caractérisations pharmacologiques à l'aide de radioligand ont été publiées sur des récepteurs de la mélatonine humains (Browning *et al.*, 2000), ovins (Maillet *et al.*, 2004), de rat (Audinot *et al.*, 2008) et de souris (Devavry *et al.*, 2012). De nouveaux ligands et radioligands ont été développés (Audinot *et al.*, 2003 ; Mesangeau *et al.*, 2010 ; Legros *et al.*, 2013). Des études sur l'homo- et l'hétéro-

dimérisation de ces récepteurs ont également été réalisées (Ayoub *et al.*, 2002 ; Ayoub *et al.*, 2004 ; Jockers *et al.*, 2008). Une étude *in vitro* a été réalisée sur les récepteurs MT1 et MT2 entiers purifiés, par la technique de purification d'affinité en tandem (Tandem Affinity Purification, TAP) pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction (Daulat *et al.*, 2007). Mais globalement, peu d'études *in vitro* sur ces récepteurs entiers purifiés ont été publiées. Notamment, aucune caractérisation des récepteurs et étude d'interaction *in vitro* par des approches biophysiques n'ont été rapportées sur les récepteurs de la mélatonine.

Nous avons donc souhaité mettre en place un projet visant à enrichir les connaissances structurales et fonctionnelles sur les récepteurs de la mélatonine, en commençant par le récepteur MT1. Ce projet consiste à employer un ensemble d'approches biochimiques et biophysiques, pour analyser finement et spécifiquement différentes propriétés physico-chimiques des récepteurs purifiés, dans un environnement expérimental contrôlé, en présence ou en absence de partenaires d'interaction choisis. Ce type d'étude nécessite de disposer de récepteurs purs, actifs, homogènes et stables, en quantité suffisante. Or, à notre connaissance, aucun article n'a été publié concernant la surexpression et la purification du récepteur MT1 en qualité et quantité compatible avec études *in vitro*. En outre, il n'existe pas de méthode universelle pour la production et la purification des RCPG, chacun se comportant différemment. De ce fait, les conditions doivent être mise au point pour chaque récepteur étudié, y compris pour MT1.

Cette étude, dont les résultats majeurs sont regroupés dans l'article scientifique suivant, a donc démarré par l'évaluation d'un certain nombre de constructions protéiques et de systèmes d'expression pour la production du récepteur de la mélatonine MT1. Puis, nous avons réalisé un criblage des conditions de solubilisation et purification des récepteurs avec différents détergents. Comme pour le récepteur A2A, la molécule CHS a systématiquement été ajoutée, pour favoriser le maintien de l'activité de liaison, ainsi qu'un ligand antagoniste pour aider à stabiliser les récepteurs. Nous avons ici utilisé l'antagoniste D600, d'affinité inférieure à la mélatonine, afin de ne pas gêner les tests de fixation de radioligand réalisés par la suite. Les échantillons produits ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique, SDS-PAGE, microscopie électronique et tests de fixation de radioligands à l'équilibre afin d'évaluer leur état d'oligomérisation, leur pureté, leur homogénéité et leur activité de liaison de ligand. Puis, une caractérisation pharmacologique plus approfondie a été réalisée sur le meilleur échantillon de récepteur MT1 purifié obtenu, afin de mesurer les constantes d'inhibition d'une trentaine de composés connus pour interagir avec ce récepteur et de comparer ces valeurs avec celles du récepteur MT1 exprimé dans des membranes de cellules de mammifères CHO.

2.2. Article soumis

Title:

The human MT1 receptor purified in mixed detergents and in CHO membranes show similar molecular pharmacology

Authors:

Christel Logez[1,2], Sylvie Berger[2], Céline Legros[2], William Cohen[2], Philippe Delagrange[3], Jean A. Boutin[2], Gilles Ferry[2], Frédéric Simonin[1], Renaud Wagner[1]

[1] Institut de Recherche de l'ESBS, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg-CNRS UMR7242 / Laboratoire d'excellence MEDALIS, F-67100 Illkirch, France

[2] Institut de Recherche Servier, Biotechnologie, Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, F-78290 Croissy-sur-Seine, France

[3] Institut de Recherche Servier, Unité de Recherches et Découvertes en Neurosciences, F-78290 Croissy-sur-Seine, France

Abstract

The human melatonin MT1 receptor belongs to the large familly of G Protein Coupled Receptors (GPCRs). It plays a key role in the regulation of circadian rhythms and is notably involved in sleep disorders and depression, for which two molecules are already on the pharmaceutical market. Although structural and functional information at the molecular level are highly desired for a fine characterization of this receptor, the isolation of soluble MT1 material compatible with biochemical and biophysical studies has been poorly investigated so far. We here describe the evaluation of a panel of constructs and host systems for the production of recombinant human MT1 receptors, and the screening of different conditions for their solubilisation and purification. Eventually, we set up an original strategy relying on the use of a mixture of Fos14 and CHAPS detergents to extract and purify a recombinant human MT1 out of *Pichia pastoris* membranes. This procedure allowed us to recover a significant yield of relatively pure, monomeric and ligand-binding active MT1 receptor. Most interestingly, a comparative study based on an extensive ligand-binding characterization highlighted a very close correlation between the pharmacological profiles of the purified MT1 samples *versus* receptors expressed in mammalian cell membranes. The quality of the purified MT1 generated in this study thus opens novel routes to investigate this receptor by biochemical and biophysical approaches.

Introduction

Seven transmembrane, G-protein coupled receptors form a huge family of proteins mediating infinity of signals, by selectively binding many endobiotic compounds, such as dopamine, serotonin, adenosine, acetylcholine, melanin-concentrating hormone, and a large quantity of small peptides, some of which still to be discovered. Accordingly, this family of receptors are involved in many physiological processes and associated diseases, and thus represent one of the larger family of drug targets for the pharmaceutical industry.

About twenty years ago, the seminal work of Brian Kobilka brought to the scientific community one purified and active recombinant member of this protein family, the beta2 adrenergic receptor (1), that was further investigated in a large variety of biochemical, biophysical and pharmacological approaches (2, 3, 4). Thanks to the wealth of data and tools thus generated, major findings boosted the understanding of the subtle molecular mechanisms underpinning the function of this prototypical receptor, and were eventually rewarded by the nobel prize committee in 2012 (5). Despite the immense interest for such approaches and the huge efforts that have been spent for the study of a number of other GPCRs however, references and procedures describing the successful production and purification of active receptors are still rather limited. This is directly to connect to the highly challenging task in obtaining significant amounts of these membrane proteins in a purest form, while still having characteristics resembling the native proteins (as adjudged from ligand binding experiments using overexpressing membranes as biological materials).

To obtain such pure preparations, several successive steps have actually to be overcome, including productive expression systems and efficacious extraction and purification conditions leading to homogeneous, stable and active receptors. Moreover, only few "universal' rules have been understood and drawn from validated procedures which are generally rarely transposable from one receptor to another, thereby highlighting the necessity to develop taylor-made methods for the successful generation of a given GPCR.

This is precisely the situation we faced for the study of receptors involved in melatonin signaling. Melatonin is a neurohormone produced during the night by the pineal gland, in all mammals, whether diurnal or nocturnal (6). Melatonin has been described as having a key role in the mastering of circadian rhythm at circulating concentration in the pico-to-nanomolar range (7). Melatonin also modulates, although at much higher concentrations (micromolar and beyond) physio-pathological situations such as inflammation, cancer progression, and immunological responses (8). Melatonin actions are mainly mediated by three binding sites (9): MT1 & MT2, two classical GPCRs of class A (10), and one protein

initially described as a possible receptor (MT3) but later on demonstrated to be an enzyme, quinone reductase 2 (11). Two melatonin agonists have reached the market: Ramelteon® (Takeda Pharmaceuticals, Osaka, Japan) for the treatment of sleep disorders (12) and Agomelatin® (LLS, Suresnes, France) for the treatment of depression (13).

It was therefore of the highest interest for us to try to obtain structural information on these two receptors. To start the program, we chose MT1. In the present paper, we described the way by which we express the genuine sequence of the human MT1 in *Pichia pastoris*, prepare membranes, solubilize it using a cocktail of detergents to maintain its binding capacity and chromatography-purify it up to a stage where MT1 seems to be the main protein species of the preparation. Using a slightly modified binding protocol, and [3H]-melatonin as radioligand, the pure receptor has a binding pharmacology (comprising 28 different compounds) close to the membrane-bound receptor express in a mammalian cell line.

To our knowledge, this is the first report on the purification of a functional melatonin receptor, and one of the rare reports on the purification of GPCRs. This work opens new routes towards the gain of information on the structure of this receptor through crystallization and of biophysical data on the interaction between MT1 and its ligands.

Experimental procedures

Plasmid construction

The sequence of the MT1 receptor was introduce in the pDest17oi and pETG20A vectors for *Escherichia coli,* in the pPIC9K vector for *Pichia pastoris* and in the pSFV2genB vector for BHK-21 cells infected by SFV as previously described (14). For MT1 in fusion with the Gαi1 subunit, the sequence of the MT1 receptor was introduce in a vector derived from pPIC9K in which the sequence of the biotinylation domain was replaced by the sequence of the Gαi1 subunit. For MT1 in fusion with YFP, the sequence Tev-YFP-His was obtained by PCR amplification and cloned into the pSFV2genB-MT1 vector in place of the sequence Tev-His. The same construct of MT1 in fusion with the YFP was introduced in the pcDNA5-TO vector and a sequence of 2StrepTag-Tev-MT1 obtained by PCR amplification was also introduced in the pcDNA5-TO vector for the expression in the T-REx-HEK293. For the cell free/liposome expression system, the sequence of the MT1 receptor was introduce in two proprietary vectors from the Synthelis company, introducing a His-tag either at the amino- or carboxy-terminus of the synthetized recombinant protein. For MT1 expression in the CHO-K1 cell line, the receptor cDNA was subcloned into pcDNA3.1.

Cell culture procedures for MT1 expression

Cell free / liposome

The MT1 receptor was produced by the Synthelis Company from the two dedicated plasmids using *E. coli* cell lysate with preformed liposomes in presence or absence of MT1 ligands. Liposomes, composed of DOPC/DOPE/cholesterol/DMPA (Avanti Polar Lipids) in a weight ratio 4/2/2/2, were obtained by evaporation of chloroform, resuspension of the lipids, sonication and extrusion. The reaction was performed at 30°C overnight. The generated proteoliposomes were isolated on a sucrose gradient after ultracentrifugation at 280,000 g, 1h at 4°C as previously described (15).

E. coli

The pDest17oi and pETG20A recombinant vectors expressing MT1 were introduced either in BL21, Rosetta, Origami and C41 *E. coli* strains that were placed in induction conditions for GPCR expression as previously described (14).

Pichia pastoris

The targeted integrative transformation of a SMD1163 *P. pastoris* strain with the pPIC9K expression vectors, the selection of recombinant yeast clones and the standard culturing procedures were performed according to (16). The methanol-induced MT1 expression was carried out in a BMMY medium supplemented with 1 μM D600, 3% DMSO, 0.4 mg/ml histidine at an initial OD_{600} of 5. After 18h induction at 20 °C, cells were harvested at 3,000 g for 10 min, washed with PBS (phosphate buffer saline: 20 mM sodium phosphate pH 7.4; 2 mM KCl; 150 mM NaCl) and subsequently used for membrane preparation.

SFV-infected BHK-21 cells

Recombinant SFV particles were generated, and BHK-21 cells in suspension culture were infected as previously described (17). 48h post-infection, cells were pelleted at 1,000 g for 10 min, washed with PBS and subsequently used for membrane preparation.

Inducible stable T-REx-HEK293 cell line

The establishment of the inducible stable T-REx-HEK293 cell lines expressing MT1 was performed as previously described (18). Cells were grown in flasks at 37°C under a humidified 5 % CO_2 atmosphere in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% FBS, 4 mM Glutamax, 10 μg/ml Blasticidine, 200 μg/ml Hygromycine. When cells reached 90-100% confluence, the receptor expression was induced by the addition of 2 μg/ml tetracycline and 5 mM of sodium butyrate. After 48h induction, cells were detached with 5 mM EDTA in PBS, pelleted by a 1,000 g centrifugation for 10 min, washed with PBS and subsequently used for membrane preparation.

Stable CHO-K1 cell line

CHO-K1 cell line stably expressing the human MT1 receptor (19) were grown to confluence, harvested in PBS containing 5 mM EDTA, and centrifuged at 1,000 g for 20 min at 4 °C. The resulting pellet was subsequently used for membrane preparation.

<u>*Membrane preparation*</u>

Membrane preparation of P. pastoris

All procedures were performed on ice. The yeasts were resuspended in cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). Cells were then lysed with three cycles of 60 s shaking and 60 s cooling on ice using 0.5 mm glass beads in a

FastPrep 24 device. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at 3,000 g for 10 min and the supernatant containing membranes fraction was pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g for 45 min at 4°C. Membrane pellets were resuspended in a cold membrane buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF) using a Dounce homogeniser and stored at -80°C.

Membrane preparation of HEK293 and BHK-21 cells

All procedures were performed on ice. The cells were resuspended in a cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). Cells were then lysed using an Ultra-Turrax T25 homogenizer. Membranes were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g for 45 min at 4°C. Membrane pellets were homogenized in a cold membrane buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF) with Ultra-Turrax T25 and ultracentrifuged once again. Finally membranes were resuspended in cold membrane buffer using a Dounce homogeniser and stored at -80°C.

Membrane preparation of CHO cells

The cells were resuspended in 5 mM Tris/HCl, pH 7.4 containing 2 mM EDTA, and were homogenized using a Kinematica polytron. The homogenate was then centrifuged (20,000 x g, 30 min, 4 °C), and the resulting pellet was resuspended in 75 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 2 mM EDTA and 12.5 mM $MgCl_2$. Aliquots of membrane preparations were stored at -80 °C until use.

Purification of the MT1 receptor expressed in P. pastoris

Analytical-scale purification

Membrane proteins were diluted at 2 mg/ml in a cold solubilisation buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 μM D600) supplemented with different detergent/CHS mixtures at different concentration, with a detergent/CHS ratio of 1/0.1 (w/w). The suspension was incubated 5 min at room temperature followed by a centrifugation at 100,000 g for 45 min to pellet the non-solubilised material. Solubilised proteins were then purified on Ni-NTA spin column according to the manufacturer's protocol. Briefly, the column was equilibrated in a purification buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 μM D600 and 0.1% detergent/0.01 % CHS for DM, DDM, Fos14 or 0.5% detergent /0.05 % CHS for CHAPS), supplemented by 20 mM imidazole. Solubilised proteins were loaded onto the column, washed with the purification buffer supplemented by 20 mM imidazole and finally

eluted in an elution buffer (purification buffer supplemented by 300 mM imidazole) in a final volume of 100 µl. Then, 10 µl of purified proteins were loaded onto an analytical Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare) pre-equilibrated with the purification buffer on an ÄKTA FPLC system. Proteins were separated in the purification buffer at 0.3 ml/mn and the absorbance was mesured at 280 nm.

Preparative-scale purification

Membrane proteins were diluted and solubilised following the same procedure as before. Solubilised proteins were then incubated in batch with 1 ml of anti-FLAG M2 affinity gel prepared following the manufacturer's instruction. The suspension was then transferred in a 10 ml drip gravity-flow column (Bio-Rad). After collecting the flow-through, the resin was washed with 25 ml of purification buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 µM D600 supplemented with the different detergent/CHS mix mentioned in the results section). Bound proteins were eluted in the same buffer containing 100 µg/ml of FLAG peptide. Pooled anti-FLAG affinity chromatography elution fraction was concentrated in a centrifugal concentrator with a 50 kDa MWCO down to 200-250 µl. Concentrated sample was loaded onto a Superdex 200 10/300 GL pre-equilibrated with the same purification buffer on an ÄKTA FPLC system. Proteins were separated in the purification buffer at 0.3 ml/mn and 0.5 ml fractions were collected.

Proteins dosage, SDS-PAGE and Western blot

Protein concentrations were determined with the bicinchoninic acid assay using bovine serum albumin as standard. Protein samples were diluted in NuPAGE LDS sample buffer, separated on a NuPAGE 10% Bis-Tris gel with MOPS buffer and directly stained with coomassie blue or electrotransferred 1h at 100 V to a nitrocellulose membrane. After blocking with BLOT-Quick Blocker (GE Healthcare), the nitrocellulose membrane was incubated with a 1 : 8,000 diluted M2 anti-FLAG antibody and revealed with a 1 : 10,000 diluted, HRP conjugated, anti-mouse secondary antibody. Immunoblots were finally visualized using an enhanced chemiluminescence reagent following the manufacturer's procedure.

Electron microscopy

The protein samples were diluted to approximately 50 µg/ml in the purification buffer. The samples were observed by negative staining with 2% (w/v) silicotungstate sodium (pH 7.4) using the technique of floating mica. The observation was carried out with a transmission electron microscope Philips CM 120 with a filament LaB6 (lanthanum hexaboride) at a

voltage of 120 kV. Images were recorded at magnifications x 45000 and using a Gatan OriusTM CCD camera.

Ligand binding

Ligand binding experiments were carried out according to (20). Briefly, Membrane protein samples (50 g/ml) were incubated in 96-well plates for 2h at 25°C in a binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA). In saturation assays, a concentration range of 0.025 to 50 nM [^{3}H]-melatonin was used as the tracer and non-specific binding was determined with 10 µM melatonin. In competition experiments, the [^{3}H]-melatonin concentration was maintained at 5 nM and competitor molecules were assayed in the range of 10^{-15} to 10^{-3} M. After incubation, the reaction was stopped by rapid filtration through GF/B unifilters, followed by three successive washes with ice-cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.4.

For purified proteins, the same protocol was followed with some modifications: the concentration of purified proteins was 0.1 g/ml, a solution of 0.1% Chaps/0.01% CHS was added in the binding buffer, and a concentration of 1 nM of [^{3}H]-melatonin was applied for competitive assays. In addition, proteins were precipitated after incubation by the supplementation of 0.1% of gamma globulins and 25% PEG 6000 (Sigma) during 15 min before filtration on GF/B filters, followed by three successive washes with a ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 8% PEG 6000. Data were analysed with the GraphPad PRISM Software. For saturation assay, the density of binding sites (Bmax) and the dissociation constant of the radioligand (K_D) values were calculated according to the method of Scatchard. For competition experiments, inhibition constants (Ki) were calculated according to the Cheng-Prussof equation: $Ki=IC50/[1+(L/K_D)]$, where IC50 is the Inhibitory Concentration 50% and L is the concentration of [^{3}H]-melatonin. For the correlation analyses, the Ki values were expressed as pKi corresponding to the logarithmic expression of Ki [pKi = -log(Ki)] and the Pearson Product-Moment Correlation Coefficient was employed for statistical correlation analysis of pK_I values.

#	Expression system	cDNA construct	Expression level (specific binding ± SEM in pmol/mg)
1	Cell free / liposomes	MT1 | His	No binding *(N= 30)*
2	Cell free / liposomes	His | MT1	No binding *(N= 30)*
3	*Escherichia coli*	pDest17oi — His | attB1 | Tev | MT1 | attB2	No expression *(N = 4)*
4	*Escherichia coli*	pETG30A — TRX protein | His | attB1 | Tev | MT1 | attB2	No expression *(N = 4)*
5	*Pichia pastoris*	pPIC9K — α-F | Flag | His | Tev | MT1 | Tev | Biotin	12.1 ± 1.7 *(N = 13)*
6	*Pichia pastoris*	pPIC9K — α-F | Flag | His | Tev | MT1 | Gαi1	0.48 ± 0.17 *(N = 4)*
7	BHK cells infected by SFV	pSFV2genB — ss | Flag | Tev | MT1 | Tev | His	2.4 ± 2.0 *(N = 2)*
8	BHK cells infected by SFV	pSFV2genB — ss | Flag | Tev | MT1 | Tev | YFP | His	0.50 ± 0.30 *(N = 4)*
9	Inducible stable HEK cells	pCDNA5-TO — ss | Flag | Tev | MT1 | Tev | YFP | His	15.3 ± 5.0 *(N = 10)*
10	Inducible stable HEK cells	pCDNA5-TO — ss | 2-Strep | Tev | MT1	8.1 ± 2.3 *(N = 10)*

Figure 1: MT1 expression yields obtained with ten combinations of cDNA constructs and host systems

Expression levels of the human MT1 receptor was assessed by a [3H]-melatonin ligand binding assay. N: number of independent experiments. Schematic representation of expression vectors evaluated: MT1: human MT1 receptor; His: 10-histidine tag; attB1 and attB2 : recombination sites of the Gateway system; Tev: Tobacco Etch Virus protease cleavage site; Trx protein: Thioredoxin protein; α-F: sequence signal of the *Saccharomyces cerevisiae* α-Factor; Flag: Flag-epitope tag; Biotin: biotinylation domain from *Proprionibacterium shermanii*; Gαi1: αi1 subunit of G protein; ss: signal sequence from influenza hemagglutin gene; YFP : yellow fluorescent protein; 2-Strep: double Strep Tag.

Results

Evaluation of a panel of MT1 recombinant constructs and sources of production

In vitro studies of proteins require significant amounts of material, typically in the mg range. In the case of membrane proteins and GPCRs in particular, this systematically implies the use of recombinant systems that efficiently overexpress the gene of interest. Furthermore, since no universal system is readily available for this exercize, the first hurdle to overcome is to identify the right combination for the best recombinant sequence to introduce into the most appropriate production system. For the successful production of the human melatonin MT1 receptor, we thus selected a panel of five representative expression systems that proved to be efficient at GPCR overexpression for several of them. These include a bacterial cell free technology where the receptors are directly embedded in liposomes (21), the popular *E. coli* bacterial system (14), the yeast *Pichia pastoris* as a eukaryotic microorganism (16) and two mammalian cell lines utilized either in a transient expression mode (BHK cells infected by a recombinant SFV alphavirus; 17) or for stable and inducible expression (T-REx™ system with HEK293 cells; 18). In addition, various tag sequences were fused to the receptor cDNA on the basis of their proven benefit for detection, purification and /or receptor stability purposes. **Figure 1** compiles the ten combinations of constructs and host systems that were evaluated in this study and for which expression levels of the MT1 receptor was assessed by a specific radioactive ligand binding assay. Except for the condition #7 for which only two independent samples could be assayed, expression evaluation was conducted at least 4 times for each system.

The results obtained clearly indicate that prokaryotic systems performed rather poorly since no ligand binding competent receptor could be measured with the bacterial cell free technology, and even no receptor polypeptide could be immunodetected from the eight *E. coli* samples (data not shown). The output was significantly much promising with the eukaryotic systems, with more than 15 pmol/mg ligand binding receptors quantified in the membranes of inducible stable HEK cells (condition #9). In addition, even if the numbers of independent samples evaluated were rather low for receptors transiently expressed in SFV-infected BHK cells (N=2 and N=4 for conditions #7 and #8, respectively), the expression levels observed in these conditions appeared more fluctuating than for the two other yeast and HEK eukaryotic systems.

These results also highlighted the impact of the selected fusion sequences on the expression output for a given host cell, with for instance a 25-fold variation of ligand binding receptors observed between the two constructs expressed in *P. pastoris* (conditions #5 and #6).

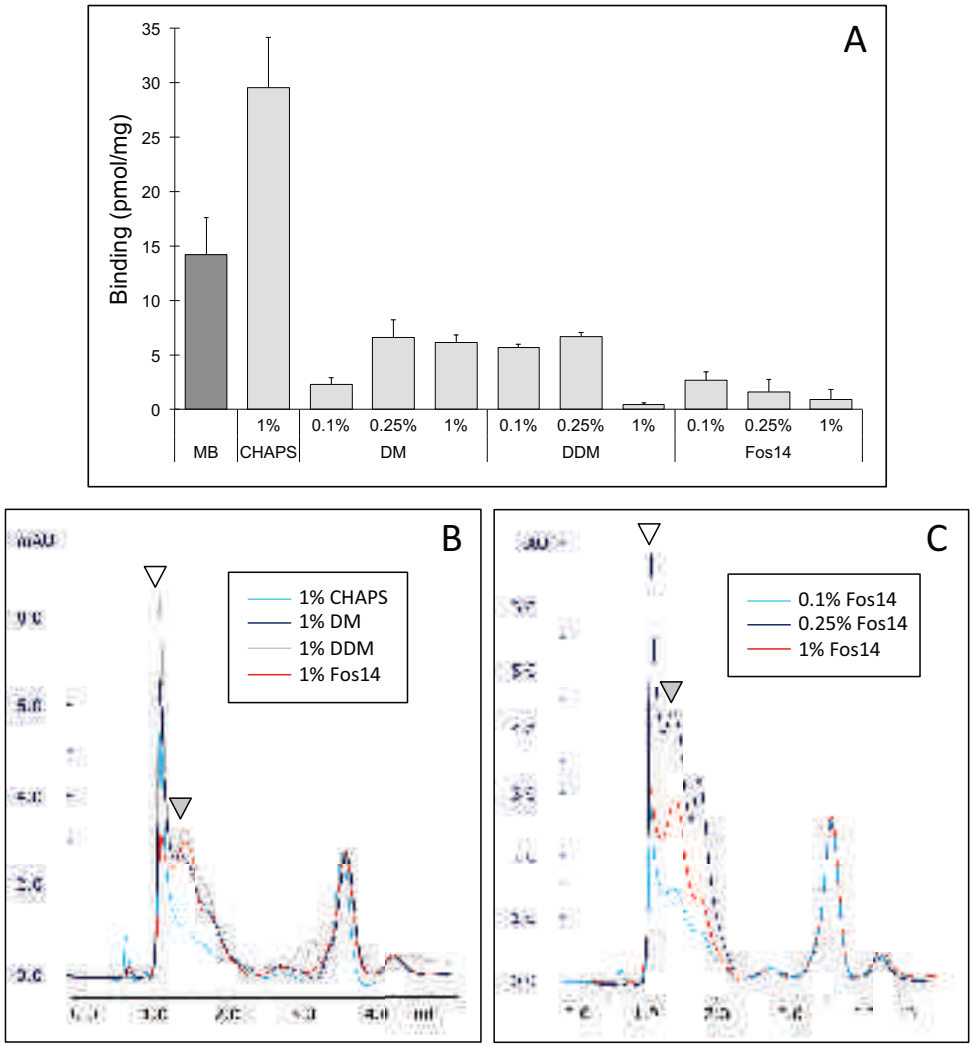


Figure 2: Detergent screening for MT1 extraction from *Pichia pastoris* membranes

P. Pastoris membranes were solubilized in presence of a panel of detergent concentrations indicated on the figures. Solubilized protein were then partially purified on Ni-NTA Spin columns and finally analysed by a [^{3}H]-melatonin binding assay (panel A) and by analytical size exclusion chromatography (SEC) (panel B and C). **A**: MB: *P. Pastoris* membranes expressing MT1 receptor. **B** and **C**: protein absorbance profiles measured at 280 nm; white triangles: MT1 oligomers; grey triangles: MT1 monomers.

Overall, this limited but representative screening of expression systems drove us to identify two principal conditions, *P. pastoris* #5 and stable inducible HEK #9, that allow for a relevant production of ligand binding active MT1 receptor. In our hands however, the latter cell system couldn't be adapted to a cell suspension culturing format that would better fit with large production needs. On the contrary, the yeast *Pichia pastoris* being fully compatible with mass production approaches, this system appeared as the most appropriate for the generation and study of the purified MT1 receptor. From 1 Liter of culture actually, about 500 mg of total membrane proteins containing an average of 6,000 pmol of ligand binding receptors can be prepared with very straightforward up-scaling possibilities.

Screening for extraction conditions of MT1 from Pichia pastoris membranes

As a first step towards purification, we conducted a short detergent screening in order to identify the best condition for an efficient extraction of active and homogeneous MT1. Based on our previous experience with GPCR solubilization from *P. pastoris* membranes, this screening was focused on a limited number of conditions including four representative detergents, CHAPS ((3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate), DM (n-Decyl-ß-D-Maltopyranoside), DDM (n-Dodecyl-ß-D-Maltopyranoside) and Fos14 (Fos-Choline-14), that we used at various concentrations (**Figure 2**). The same amount of starting membrane sample (MB) was used in each solubilization condition and the resulting fractions were analysed for the MT1 receptor activity (ligand binding assay, **Figure 2A**) and homogeneity (analytical SEC run after an IMAC purification on spin columns, **Figure 2B**). These experiments highlighted three typical detergent behaviors: at the two extremes, CHAPS allowed to extract the highest amounts of active MT1 but mainly under an oligomeric state according to the SEC data (**Figure 2B**, white triangle), whereas Fos14 enabled to recover the highest ratio of monomeric receptors (**Figure 2B**, grey triangle) but with very low ligand binding activity. Finaly, intermediate situations were found for the two other detergents, DM and DDM. In addition, except for CHAPS for which only one concentration could be assayed due to it's high critical micelle concentration (cmc close to 0.5%), both the activity and the polydispersity of the receptor were diversely impacted by the detergent concentration tested. As a significant illustration, high concentrations of DDM and Fos14 that share a very low cmc revealed seriously detrimental to the ligand binding activity (**Figure 2A**).

This short solubilization screening thus leaved us with a panel of representative situations that could be further investigated for purification purposes.

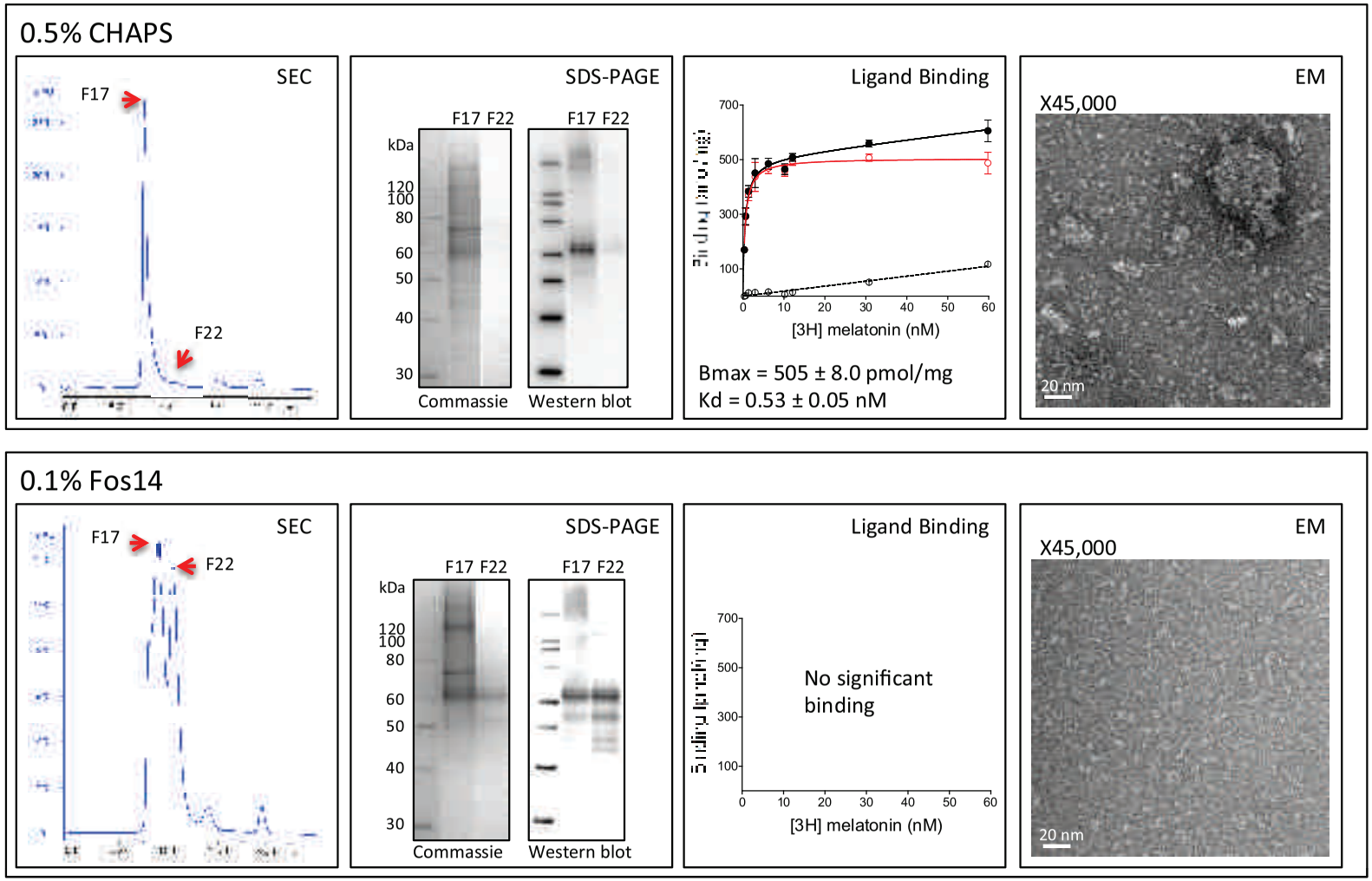


Figure 3 : Characterization of MT1 samples purified in presence of CHAPS or Fos14

P. Pastoris membranes were solubilized with 1% CHAPS (upper panel) or 0.25% Fos14 (lower panel) and purified in the presence of the indicated concentration of detergents by a two-step purification approach consisting in an anti-flag affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography. **SEC**: Size Exclusion Chromatography profile. SEC elution fractions F17, corresponding to MT1 oligomers, and F22, corresponding to MT1 monomers, are indicated by a red arrow. **SDS-PAGE**: SDS-PAGE of SEC elution fraction F17 and F22 colored by Coomassie Blue (left) and revealed by an anti-Flag immunodetection (right). **Ligand Binding**: saturation ligand binding experiments with [^{3}H]-melatonin on SEC elution fraction F17 for CHAPS and F17 or F22 for Fos14. **EM**: negative staining electron microscopy on SEC elution fractions F17 for CHAPS and F22 for Fos14.

Purification of a ligand-binding active and monomeric MT1 receptor

Preliminary purification attempts were conducted following the outcomes of the detergent screening. Because they showed a good compromise between ligand binding activity and significant amounts of monomeric receptors after membrane extraction, first DM and DDM were utilized in affinity purification approaches. The output was however disappointing in all cases since only low yields of < 50% pure receptor could be achieved with very poor ligand binding activity remains (data not shown).

We thus focused on the two other detergents CHAPS and Fos14. Each was used in parallel experiments during solubilization and maintained through out a two-step purification approach consisting in an anti-flag affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography. Consistent with what was observed in the solubilization screening, using CHAPS allowed to recover mainly particles of high molecular weight containing partially purified MT1, as assessed by SEC and SDS-PAGE analyses, but with significant ligand binding activity according to the saturation curve obtained (**Figure 3, upper panel**). Conversely, the utilization of Fos14 allowed to retrieve a significant population of monomeric receptor revealing both a higher level of purity but a complete loss of ligand binding activity (**Figure 3, lower panel**). These observations were further corroborated by an electron microscopy (EM) analysis: samples obtained in presence of CHAPS were actually presenting a number of objects of various size, including aggregates and probably small remains of membranes, while those issued from a purification with Fos14 appeared much more homogeneous (**Figure 3, EM panels**).

We hypothesized from these data that Fos14 was well performing for the extraction of individual but probably denatured receptors, while CHAPS was likely extracting complex protein samples that were offering a more suitable environment for maintaining the activity of MT1. This prompted us to set up a mixed-detergent extraction and purification strategy involving Fos14 and CHAPS, with the aim to keep only the beneficial properties of each one. We thus screened for various Fos14 to CHAPS ratios during solubilization and purification that we assessed by ligand binding activity (saturation curves) and receptor oligomeric state analyses (SEC and EM). We notably found out that using a mixture of 0.25% Fos14 and 0.1% CHAPS during the solubilization step, followed by 0.1% Fos14 and 0.1% CHAPS during purification allowed to recover a significant yield of relatively pure, monomeric and active MT1 receptor (**Figure 4A**). Not only higher amounts of active receptors could be retrieved as assessed by the ligand binding data, but samples were much more homogeneous with no apparent presence of aggregated particles according to the EM images.

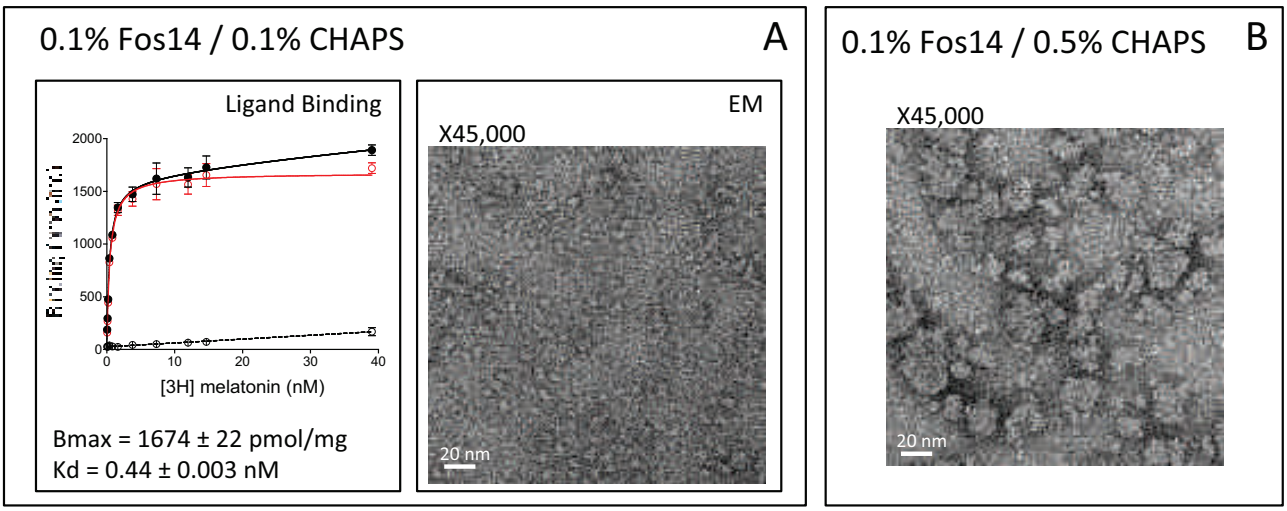


Figure 4: Characterization of samples purified in a mixture of CHAPS and Fos14 detergents

P. Pastoris membranes were solubilized and purified by a two-step purification approach (anti-flag affinity chromatography followed by a SEC). **A**: Samples were solubilized in a mixture of 0.25% Fos14 / 0.1% CHAPS and purified in presence of 0.1% Fos14 / 0.1% CHAPS. They were analyzed by saturation binding experiment with [^{3}H]-melatonin (left) and observed by negative staining electron microscopy (EM, right). **B**: Samples were solubilized in a mixture of 0.25% Fos14 / 1% CHAPS, purified in presence of 0.1% Fos14 / 0.5% CHAPS and analyzed by negative staining electron microscopy.

Most remarkably, samples obtained with higher concentrations of CHAPS during solubilization and purification exhibited rather homogeneous populations of oligomeric or aggregated forms of the receptor (**Figure 4B**).

Pharmacological analysis of the MT1 receptor purified in mixed detergent micelles

Using a [^{3}H]melatonin ligand binding assay, the molecular pharmacology of the purified MT1 in mixed detergents was measured with a set of 28 compounds representative of melatonin receptor ligands for which affinities were already published for human, sheep, rat and mouse melatonin receptors (19, 22, 23, 24, 25). Membranes from CHO (N>3) and of *P. pastoris* (N=3) expressing the human MT1 receptor were used as controls. Four independent purified samples (N=4) were assayed in these competition experiments. The dose-response curves were analysed by a non-linear regression from which pKi were determined (**Table 1**). These pKi were further compared in a Pearson correlation analysis (**Figure 5**) between MT1 in CHO and *P. pastoris* membranes, between MT1 in CHO membranes and purified MT1, and between MT1 in *P. pastoris* membranes and purified MT1 (**Figure 5, panel A, B and C,** respectively). For MT1 in *P. pastoris* membranes, these results highlighted a marked decrease in the ligand binding affinities for the 28 compounds compared to MT1 expressed in the CHO cell line. The affinity ranking toward these compounds was however fully maintained according to the correlation analysis (r = 0,908). Most strikingly, the receptor purified from the yeast membranes in a Fos14 / CHAPS mixture revealed a pharmacological profile closer to the receptor in CHO membranes (panel B) than in yeast membranes (panel C). These results strongly suggest that the pharmacology of the MT1 receptor purified in the procedure we used is very similar to that of MT1 in a mammalian membrane environment, at least at the ligand binding level. Such a material thus represent a resource of choice for a number of *in vitro* studies and applications, including primary ligand screening approaches.

	MT1 CHO membranes	MT1 *P. p.* membranes	MT1 purified
	pKi ± SEM	pKi ± SEM	pKi ± SEM
MLT	10.15 ± 0.12	8.88 ± 0.02	10.38 ± 0.15
2I-MLT	12.12 ± 0.20	9.87 ± 0.01	10.62 ± 0.06
4P-PDOT	7.56 ± 0.16	6.13 ± 0.01	8.06 ± 0.21
Luzindole	8.09 ± 0.31	6.27 ± 0.01	7.10 ± 0.12
FLN68	11.82 ± 0.06	9.80 ± 0.01	10.63 ± 0.12
SD6	11.33 ± 0.34	9.68 ± 0.01	10.63 ± 0.11
6Cl-MLT	9.25 ± 0.07	7.63 ± 0.01	9.85 ± 0.17
2-Br-MLT	12.11 ± 0.08	9.97 ± 0.01	10.73 ± 0.16
S 70254	7.32 ± 0.31	6.03 ± 0.01	8.51 ± 0.12
SD1881	6.83 ± 0.24	7.23 ± 0.13	8.96 ± 0.15
SD1882	7.95 ± 0.07	6.19 ± 0.01	8.04 ± 0.12
SD1918	7.88 ± 0.10	6.19 ± 0.17	8.19 ± 0.09
S 22153	8.25 ± 0.09	7.08 ± 0.14	8.63 ± 0.15
S 27128-1	9.03 ± 0.12	7.42 ± 0.15	9.49 ± 0.19
S 20098	10.17 ± 0.25	8.76 ± 0.10	10.69 ± 0.17
D600	7.76 ± 0.15	8.26 ± 0.09	7.25 ± 0.06
DIV880	7.44 ± 0.12	6.35 ± 0.01	6.32 ± 0.05
5HT	>5	> 5	> 5
S 20928-1	7.27 ± 0.26	5.93 ± 0.04	7.19 ± 0.13
S 75436-1	8.53 ± 0.06	7.07 ± 0.01	9.09 ± 0.21
S 73443-1	8.13 ± 0.04	6.37 ± 0.01	8.59 ± 0.15
S 75462-1	8.11 ± 0.11	6.22 ± 0.01	8.30 ± 0.19
S 78525-1	9.85 ± 0.13	8.02 ± 0.01	9.95 ± 0.12
S 78613-1	8.15 ± 0.06	6.64 ± 0.01	8.85 ± 0.14
S 21278-1	7.71 ± 0.14	5.34 ± 0.01	7.02 ± 0.14
S 73893-1	8.60 ± 0.06	6.89 ± 0.01	8.30 ± 0.13
S 77834	7.87 ± 0.15	nd	8.38 ± 0.14
S 77840	8.16 ± 0.11	nd	7.47 ± 0.19

Table 1: Comparison of binding affinities (Ki) of MT1 receptors in CHO and *P. pastoris (P.p.)* membranes, and purified in a 0.1% Fos14/ 0.1% CHAPS mixture

Twenty-eight compounds of our MT1 ligands collection were tested. Concentration-response curves were analyzed by non-linear regression. Binding affinities are expressed as mean pKi ± SEM of four independent experiments.

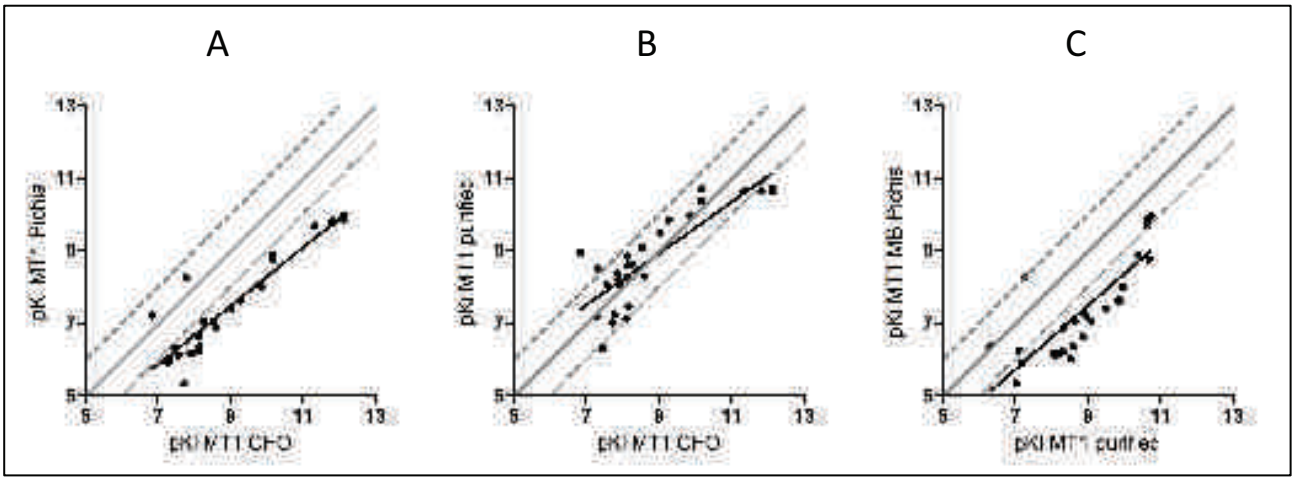


Figure 5: Correlation plots between binding affinities of MT1 receptors in CHO membranes, in *P. pastoris* membranes and purified in 0.1% Fos14 / 0.1% CHAPS

A: pKi correlation of MT1 in *P. pastoris* membranes *vs.* MT1 in CHO membranes. **B**: pKi correlation of MT1 purified in Fos14/CHAPS *vs.* MT1 in CHO membranes. **C**: pKi correlation of MT1 in *P. pastoris* membranes *vs.* MT1 purified in Fos14/CHAPS. Data were processed from Table 1. Pearson's correlation analyses ends up with r coefficients of 0,908 ($p<0.0001$, n=4), 0.839 ($p<0.0001$, n=4) and 0.829 ($p<0.0001$, n=4) for A, B, and C, respectively.

Discussion

Despite the important efforts that have been put in the last decade on the production of recombinant GPCRs for *in vitro* studies, identifying the experimental conditions leading to the obtention of pure and active receptor is still dealt on a case-by-case and trial-and-error basis (26). Accordingly, successive screenings applied at each step of the production procedure were needed in the present study to recover near milligram amounts of a relatively pure and ligand-binding competent human MT1 melatonin receptor. This taylor-made MT1 production process initially relies on the use of the *P. pastoris* yeast system that growingly proves particularly well-adapted to the overexpression of a large panel of eukaryotic membrane proteins, including GPCRs, at a crystallization-grade level (27, 28, 29). As stressed in this study, this very flexible system actually not only gathers advantageous handling and upscaling properties, but also offers the cellular machineries and membrane environment comparatively as efficient as a HEK mammalian cell host for the high level expression of MT1.

In addition to this effective bioproduction resource, our MT1 production procedure is established on the original association of the Fos14 and CHAPS detergents for extracting and maintaining the receptor in a soluble and ligand active state. Although DDM has been widely used for GPCR structural studies in all recent reports, the two maltoside derived detergents we tested allowed to recover only low amounts of partially purified MT1. We thus investigated and exploited the opposite and complementary properties of Fos14 and CHAPS on MT1 extraction and solubility. In our experiments, Fos14 was actually the most potent detergent for the extraction and maintainance of MT1 in its monomeric form, albeit with a poor ligand binding activity. On the opposite, CHAPS was best suited for keeping active soluble MT1 receptors although in an apparently more polydisperse and heterogeneous shape. These two zwitterionic detergents are not frequently employed for membrane protein extraction and purification, but comparable behaviors were also observed in other reports. For instance, Fos14 was the only out of 110 evaluated detergents that allowed to solubilize and maintain monodisperse the Protective Antigen (PA), a heptameric pore-forming membrane protein (30). In a similar detergent screening approach, Fos14 and Fos16 were shown to be the more effective surfactants for the solubilization and the purification of a tetrameric human multidrug transporter ABCG2, even if the activity of the soluble protein appeared rather low (31). Most interestingly, a concurrent study was conducted on the same ABCG2 transporter that was successfully solubilized and purified in an active form in the presence of CHAPS (32). This detergent was also used for the purification of the Thromboxan A2 receptor, ending with low yields of relatively active proteins (33). Similarly, addition of

CHAPS proved beneficial in others studies for the isolation of active recombinant receptors 5HT1A (34), CB2 (35), AA2A (36), as well as for a number of other class A receptors we investigated (unpublished data).

In all these studies with CHAPS however, no clue was given on the homogeneity and polydispersity of the solubilized nor purified samples. From our SEC and EM data on CHAPS-treated samples, we observed heterogeneous particles of high molecular sizes, suggesting that CHAPS does not fully solubilize *P. pastoris* membranes but rather generates lipoprotein complexes of various dimensions that remain soluble after ultracentrifugation. Such environment appears well-suited for maintaining ligand-binding active MT1, whereas monomeric receptors fully solubilized with Fos14 seem to have lost this capacity, more likely due to some delipidation issues. We thus look for, and succeeded to, identifying the right combination of Fos14 and CHAPS that offers a good compromise between these two situations, leading to a relatively pure, homogeneous, monomeric and ligand-binding competent MT1 receptor that can be utilized for *in vitro* studies.

In comparison with reference membrane samples, this material then served for an extensive evaluation of its molecular pharmacology towards a collection of 28 compounds from our melatonin library. Most remarkably, the inhibition parameters measured in ligand-binding competition experiments revealed a pharmacology of the purified receptor very close to MT1 in CHO membranes for the 28 molecules. This analysis thus validate the quality of the purified material which could furthermore be of particular interest for primary screening of MT1-binding molecules. As no cellular nor membraneous artifacts are susceptible to interfere with the assay, purified MT1 samples would indeed reveal very helpful for limiting the false positive rate usually experienced with classical screenings (37, 38). Obviously, in this assay format, no indication is given on the G-protein coupling and signaling properties of the compounds while we know the importance of the coupling, particularly in the melatoninergic system as recently described (20). Nevertheless, in our laboratory, preliminary reconstitution experiments were successfully conducted in a controlled membrane environment, confirming the functionality of the purified MT1 in an agonist-dependent G protein activation assay. Further and detailed investigations are ongoing but the present data already strengthen the usefulness of such material for *in vitro* studies of MT1.

Interestingly, this study also highlighted a marked difference in ligand affinities when the receptor was assayed in *P. pastoris* membranes compared to the CHO samples. This is likely due to differences in membrane lipid composition between yeast and mammalian cell (39). In particular, the major sterol entity in yeasts is ergosterol instead of cholesterol in animal cells

which has been reported to be essential for the activity of a growing number of GPCRs (40). The lower pKi values we observed in *P. pastoris* membranes could be then related to the lack of cholesterol that is not compensated by the yeast ergosterol, in a similar way that what was observed for the human mu-opioid receptor expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (41). Consistently, the CHO-like pKi values restored in MT1 purified from the yeast membranes can be linked to the presence of the cholesterol derivative CHS that we systematically added to the detergent solutions. Such a cholesterol supplementation is systematically employed for the preparation of GPCRs for strucural studies and its effect on the stability of purified receptors is rather well documented (42). Such interpretations thus suggest that the ligand binding properties of MT1 would be modulated by the presence of cholesterol. Whether such modulation is actual, is depending on a direct interaction with cholesterol such as described for B2AR (43) or is linked to a targeted localization of MT1 in cholesterol-enriched membrane microdomains, is still to be investigated.

To the present authors' knowledge, this is the first successful attempt to produce and purify a melatonin receptor, in such a state that it does recognise multiple ligands with an affinity close to the ones measured on cell membranes.

References

(1) Kobilka BK. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. Anal Biochem. 1995, 231(1):269-71.

(2) Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci. 2007, 28(8):397-406.

(3) Weis WI, Kobilka BK. Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. Curr Opin Struct Biol. 2008, 18(6):734-40.

(4) Steyaert J, Kobilka BK. Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. Curr Opin Struct Biol. 2011, 21(4):567-72.

(5) Roth BL, Marshall FH. NOBEL 2012 Chemistry: Studies of a ubiquitous receptor family. Nature. 2012, 492(7427):57.

(6) Arendt J. Melatonin. Clin Endocrinol (Oxf) 1988, 29:205-229.

(7) Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocr Rev. 1980, 1:109-131.

(8) Carpentieri A, Diaz de BG, Areco V, Peralta LM, Tolosa de TN. New perspectives in melatonin uses. Pharmacol Res. 2012, 65:437-444.

(9) Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrange P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? Br J Pharmacol. 2008, 154:1182-1195.

(10) Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrange P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. Trends Pharmacol Sci. 2005, 26:412-419.

(11) Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem. 2000, 275:31311-31317.

(12) Uchiyama M, Hamamura M, Kuwano T, Nishiyama H, Nagata H, Uchimura N. Evaluation of subjective efficacy and safety of ramelteon in Japanese subjects with chronic insomnia. Sleep Med. 2011, 12(2):119-26.

(13) de Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Renard P, Muñoz C, Millan MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. Nat Rev Drug Discov. 2010, 9(8):628-42.

(14) Lundstrom K, Wagner R, Reinhart C, Desmyter A, Cherouati N, Magnin T, Zeder-Lutz G, Courtot M, Prual C, André N, Hassaine G, Michel H, Cambillau C, Pattus F. Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems. J Struct Funct Genomics. 2006, 7(2):77-91.

(15) Marques B, Liguori L, Paclet MH, Villegas-Mendéz A, Rothe R, Morel F, Lenormand JL. Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox). PLoS One. 2007, 2(9):e856.
(16) André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, Wagner R, Reinhart C. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in Pichia pastoris to levels required for structural studies via a single expression screen. Protein Sci. 2006, 15(5):1115-26.
(17) Hassaine G, Wagner R, Kempf J, Cherouati N, Hassaine N, Prual C, André N, Reinhart C, Pattus F, Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. Protein Expr Purif. 2006, 45(2):343-51.
(18) Hassaine G, Deluz C, Li XD, Graff A, Vogel H, Nury H. Large scale expression and purification of the mouse 5-HT3 receptor. Biochim Biophys Acta. 2013, 1828(11):2544-52.
(19) Audinot V, Mailliet F, Lahaye-Brasseur C, Bonnaud A, Le GA, Amosse C, Dromaint S, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, Malpaux B, Guillaumet G, Lesieur D, Lefoulon F, Renard P, Delagrange P, Boutin JA. New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003, 367:553-561.
(20) Legros C, Devavry S, Caignard S, Tessier C, Delagrange P, Ouvry C, Boutin JA, Nosjean O. Only the G protein-coupled state MT1 and MT2 melatonin receptors display different molecular pharmacologies. Br J Pharmacol. 2013 Oct 10. doi: 10.1111/bph.12457. [Epub ahead of print].
(21) Liguori L, Marques B, Lenormand JL. A bacterial cell-free expression system to produce membrane proteins and proteoliposomes: from cDNA to functional assay. Curr Protoc Protein Sci. 2008, Chapter 5:Unit 5.22.
(22) Mailliet F, Audinot V, Malpaux B, Bonnaud A, Delagrange P, Migaud M, Barrett P, Viaud-Massuard MC, Lesieur D, Lefoulon F, Renard P, Boutin JA. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. Biochem Pharmacol. 2004, 67:667-677.
(23) Coge F, Guenin SP, Fery I, Migaud M, Devavry S, Slugocki C, Legros C, Ouvry C, Cohen W, Renault N, Nosjean O, Malpaux B, Delagrange P, Boutin JA. The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor. Br J Pharmacol, 2009,158:1248-1262.
(24) Audinot V, Bonnaud A, Grandcolas L, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, Balik A, Messager S, Hazlerigg DG, Barrett P, Delagrange P, Boutin JA. Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. Biochem Pharmacol. 2008, 75:2007-2019.

(25) Devavry S, Legros C, Brasseur C, Cohen W, Guenin SP, Delagrange P, Malpaux B, Ouvry C, Cogé F, Nosjean O, Boutin JA. Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT_1 and MT_2. Eur J Pharmacol. 2012, 677(1-3):15-21.

(26) Chiu ML, Tsang C, Grihalde N, MacWilliams MP. Over-expression, solubilization, and purification of G protein-coupled receptors for structural biology. Comb Chem High Throughput Screen. 2008, 11(6):439-62.

(27) Alkhalfioui F, Logez C, Bornert O, Wagner R. Expression systems: Pichia pastoris. in: Production of Membrane Proteins – Strategies for Expression and Isolation (Robinson A.S., ed.), Wiley-VCH, 2011, pp. 75-108.

(28) Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. Nature. 2011, 475(7354):65-70.

(29) Hino T, Arakawa T, Iwanari H, Yurugi-Kobayashi T, Ikeda-Suno C, Nakada-Nakura Y, Kusano-Arai O, Weyand S, Shimamura T, Nomura N, Cameron AD, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Murata T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. Nature. 2012, 482(7384):237-40.

(30) Vernier G, Wang J, Jennings LD, Sun J, Fischer A, Song L, Collier RJ. Solubilization and characterization of the anthrax toxin pore in detergent micelles. Protein Sci. 2009, 18(9):1882-95.

(31) McDevitt CA, Collins RF, Conway M, Modok S, Storm J, Kerr ID, Ford RC, Callaghan R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. Structure. 2006, 14(11):1623-32.

(32) Pozza A, Perez-Victoria JM, Sardo A, Ahmed-Belkacem A, Di Pietro A. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. Cell Mol Life Sci. 2006, 63(16):1912-22.

(33) Pawate S, Schey KL, Meier GP, Ullian ME, Mais DE, Halushka PV. Expression, characterization, and purification of C-terminally hexahistidine-tagged thromboxane A2 receptors. J Biol Chem. 1998, 273(35):22753-60.

(34) Chattopadhyay A, Harikumar KG, Kalipatnapu S. Solubilization of high affinity G-protein-coupled serotonin1A receptors from bovine hippocampus using pre-micellar CHAPS at low concentration. Mol Membr Biol. 2002, 19(3):211-20.

(35) Vukoti K, Kimura T, Macke L, Gawrisch K, Yeliseev A. Stabilization of functional recombinant cannabinoid receptor CB(2) in detergent micelles and lipid bilayers. PLoS One. 2012, 7(10):e46290.

(36) O'Malley MA, Helgeson ME, Wagner NJ, Robinson AS. The morphology and composition of cholesterol-rich micellar nanostructures determine transmembrane protein (GPCR) activity. Biophys J. 2011, 100(2):L11-3.
(37) Boutin JA, Lahaye C, Pegurier C, Nicolas JP, Fauchere JL, Langlois M, Renard P, Delagrange P, Canet E. Screening of ligand binding on melatonin receptor using non-peptide combinatorial libraries. J Recept Signal Transduct Res. 2000, 20(1):105-18.
(38) Yan JH, Su HR, Boutin JA, Renard MP, Wang MW. High-throughput screening assay for new ligands at human melatonin receptors. Acta Pharmacol Sin. 2008, 29(12):1515-21.
(39) Opekarová M, Tanner W. Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. Biochim Biophys Acta. 2003, 1610(1):11-22.
(40) Oates J, Watts A. Uncovering the intimate relationship between lipids, cholesterol and GPCR activation. Curr Opin Struct Biol. 2011, 21(6):802-7.
(41) Lagane B, Gaibelet G, Meilhoc E, Masson JM, Cézanne L, Lopez A. Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2000, 275(43):33197-200.
(42) Thompson AA, Liu JJ, Chun E, Wacker D, Wu H, Cherezov V, Stevens RC. GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles. Methods. 2011, 55(4):310-7.
(43) Hanson MA, Cherezov V, Griffith MT, Roth CB, Jaakola VP, Chien EY, Velasquez J, Kuhn P, Stevens RC. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 A structure of the human beta2-adrenergic receptor. Structure. 2008, 16(6):897-905.

2.3. Conclusions et perspectives

L'objectif de cette étude était de mettre au point les conditions de production et purification du récepteur MT1 pour ensuite l'étudier *in vitro* par diverses techniques biochimiques et biophysiques. L'utilisation du système d'expression levure *P. pastoris* et d'un mélange de détergent pour la solubilisation et la purification, nous a permis d'obtenir un échantillon relativement pur, homogène, monomérique, avec une importante activité de liaison de la mélatonine et un profil pharmacologique très proches des récepteurs MT1 exprimés dans des membranes de cellules de mammifères CHO. Les techniques de microscopie électronique et de test de fixation de radioligand adapté aux protéines purifiées, qui ont été mises au point sur le récepteur A2A, ont pu être appliquées avec succès au récepteur MT1 dans cette étude. Par la suite, nous poursuivrons l'analyse du récepteur MT1 avec d'autres méthodes qui sont en cours d'optimisation sur le récepteur A2A. Nous étudierons notamment les interactions ligands/récepteurs purifiés par des approches biophysiques (SPR, ITC, thermophorèse…) qui permettront de renforcer les données obtenues et d'apporter des informations complémentaires. Nous souhaitons également réaliser des études d'interaction du récepteur MT1 avec des partenaires protéiques et analyser l'effet des différents ligands sur ces interactions protéiques. Des études de thermostabilité pourront aussi être initiées, afin d'évaluer l'impact de différents paramètres (ligand, lipide, pH, sels…) sur la stabilité des récepteurs et identifier les conditions dans lesquelles les récepteurs MT1 sont les plus stables. Par ailleurs, la qualité des échantillons purifiés nous permet d'envisager leur utilisation pour des approches de criblage criblages *in vitro* dans un environnement expérimental contrôlé. En effet, des techniques de criblage de molécules par SPR inverse et de criblage de banque de fragments d'anticorps par phage display sont actuellement en cours de développement sur le récepteur A2A et nous espérons pouvoir les appliquer au récepteur MT1 par la suite.

3. Essais de stabilisation du récepteur MT1

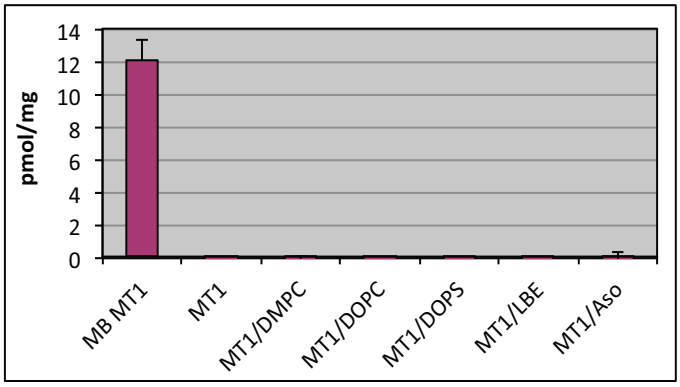
3.1. Introduction

Comme cela a été présenté dans le chapitre précédent, le récepteur MT1 est exprimé dans la levure *P. pastoris* avec un bon niveau d'expression de protéine capable de fixer le radioligand agoniste [^{3}H]mélatonine. Lors du criblage des conditions de solubilisation et purification avec différents détergents, nous avons observé notamment deux comportements opposés. Avec le CHAPS, les échantillons sont agrégés et multimériques, avec un faible niveau de pureté, mais une activité de liaison partiellement maintenue. Avec le Fos14, les échantillons sont monomériques et homogènes, avec un haut niveau de pureté, mais une activité de liaison quasiment nulle. Au vu de

ces résultats, nous avons envisagés deux stratégies afin d'obtenir des échantillons non agrégés mais actifs. D'une part, nous avons réalisé des essais de purification en mélange de détergents Fos14 et CHAPS, visant à conserver les propriétés bénéfiques de chacun, dont les résultats ont été présentés dans le chapitre précédent. Parallèlement, à partir des échantillons monomériques, homogènes et purs obtenus avec le Fos14, nous avons cherché à identifier des conditions expérimentales permettant de rétablir l'activité de liaison des récepteurs MT1. Outre la dénaturation totale du récepteur, différentes raisons peuvent en effet expliquer l'altération de l'activité de liaison de ligand : (i) la perte d'un lipide ou d'un cofacteur essentiel, (ii) le fait que la structure micellaire ne mime pas correctement l'environnement membranaire ou (iii) que celle-ci gêne l'accessibilité au site de fixation. Dans cette optique, j'ai donc évalué la capacité d'agents stabilisants et de systèmes de reconstitution de protéine membranaire à restaurer l'activité du récepteur MT1 purifié en Fos14.

3.2. Ajout de lipides

Bien que la solubilisation et la purification avec le Fos14 aient été réalisées en présence de CHS, un analogue de cholestérol, une hypothèse est qu'il manque un autre lipide essentiel à l'activité des récepteurs MT1. Nous avons donc expérimenté l'ajout de lipide, afin d'évaluer si cela permettait de rétablir l'activité de liaison du récepteur. Pour cela, j'ai testé différents types de lipides : des lipides purifiés tels que des DMPC, DOPC, DOPS, ou des mélanges complexes de lipides comme un extrait de lipides de cerveau de porc (Lipide Brain Extract, LBE) et un extrait de lipides de soja (Asolectine, Aso). J'ai incubé le récepteur MT1 purifié en Fos14/CHS avec ces différents lipides, puis j'ai réalisé un test de fixation de radioligand à l'équilibre avec la mélatonine tritiée sur les différents échantillons (**Figure 55**). Le contrôle positif de membrane *P. pastoris* exprimant le récepteur MT1 présente une activité de liaison spécifique de 12 pmol/mg, correspondant à la valeur attendue. Par contre, aucune liaison spécifique n'a pu être mesurée pour les échantillons MT1 purifiés en Fos14/CHS seul ou additionnés de différents types de lipides. Ceci révèle que l'addition de ces lipides n'a pas permis de restaurer l'activité de liaison du récepteur MT1 purifié en Fos14/CHS, dans les conditions testées.



B

	pmol/mg	ET
MB MT1	12,0	1,3
MT1	ns	ns
MT1/DMPC	ns	ns
MT1/DOPC	ns	ns
MT1/DOPS	ns	ns
MT1/LBE	ns	ns
MT1/Aso	ns	ns

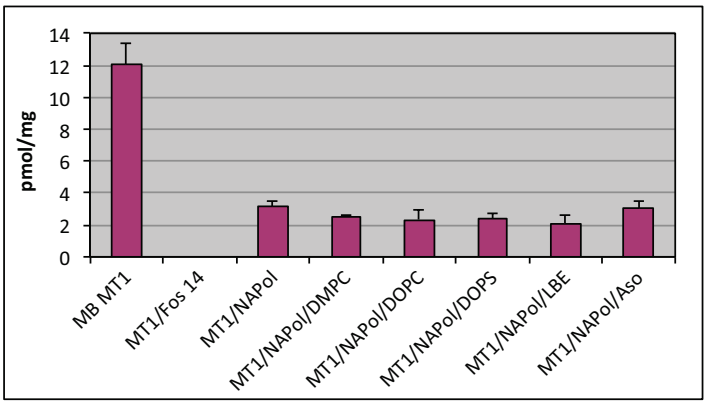
Figure 55 : Test de fixation du radioligand sur le récepteur MT1 additionné de lipides

A : Graphique illustrant les résultats du test de fixation de radioligand et **B** : tableau de valeurs exprimé en pmol de récepteur ayant fixé un ligand par mg de protéine totale (poml/mg) ; avec les écarts types (ET). Les valeurs non significatives sont indiquées par l'abréviation : ns. Ce test a été réalisé sur des membrane *P. pastoris* exprimant le récepteur MT1 (MB MT1), sur le récepteur MT1 purifié en Fos14/CHS seul (MT1) ou additionné de différents types de lipides (MT1/DMPC ; MT1/DOPC ; MT1/DOPS ; MT1/LBE ; MT1/Aso). Une concentration de 50 nM de [^{3}H]mélatonine et la méthode de séparation par précipitation au PEG avant filtration ont été utilisées.

3.3. Echange des détergents avec des polymères amphiphiles

Une autre approche a consisté à modifier l'environnement de la protéine en échangeant les détergents Fos14 avec des polymères amphiphiles tels que les amphipols. Ces molécules n'ont pas la capacité d'extraire les protéines membranaires des bicouches lipidiques. Cependant, elles peuvent être substituées aux détergents par la suite pour maintenir les protéines en solution en s'adsorbant sur leurs parties hydrophobes. Ces polymères semblent fournir aux protéines membranaires un environnement moins dénaturant que celui fourni par les détergents, notamment en raison de leur efficacité limitée à perturber les interactions protéiques intramoléculaires ou protéines-lipides. Plusieurs études ont montré que les protéines membranaires étaient plus stables en amphipols qu'en détergents (Tribet *et al.*, 1996 ; Gohon *et al.*, 2008). De plus, les amphipols ont été utilisés avec succès pour la renaturation *in vitro* des RCPG, après expression en corps d'inclusion bactériens et purification en conditions dénaturantes (Pocanschi *et al.*, 2006 ; Dahmane *et al.*, 2009 ; Baneres *et al.*, 2011). Parmi les différents types d'amphipols développés ces dernières années, nous nous sommes intéressés aux amphipols non ioniques à base de glucose (NAPols). Ceux-ci présentent l'avantage d'être neutres, contrairement aux amphipols A8-35 (APols) qui sont chargés. En effet, la charge limite la gamme de pH utilisable pour les A8-35, car ils commencent à précipiter en dessous d'un pH de 7,5. La présence de charges peut également générer des attractions ou des répulsions électrostatiques, qui peuvent donner lieu à des liaisons non spécifiques avec des ligands chargés ou au contraire empêcher des interactions par répulsion. De plus, les NAPols ont déjà montré leur efficacité pour la stabilisation de RCPG (Bazzacco *et al.*, 2012 ; Rahmeh *et al.*, 2012). Nous avons donc testé l'échange du détergent Fos14 avec les NAPols, afin d'évaluer si les NAPols pouvaient

favoriser une conformation du récepteur capable de fixer le ligand agoniste mélatonine. Parallèlement, nous avons également testé la stabilisation en NAPols en présence de lipides, pour voir si la combinaison des deux pouvait avoir un effet synergique sur l'activité du récepteur MT1 purifié. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Pr. Ange Polidori, qui nous a fourni les NAPols. J'ai incubé les NAPols avec les récepteurs MT1 purifiés en Fos14/CHS, additionnés ou non de lipides, puis j'ai éliminé les détergents à l'aide de billes de polystyrène (Biobeads). J'ai ensuite soumis les échantillons contenant les complexes récepteurs/NAPols ou récepteurs/lipides/NAPols à un test de fixation de radioligand à l'équilibre avec la [^{3}H]mélatonine (**Figure 56**). Le contrôle positif de membrane *P. pastoris* exprimant le récepteur MT1 indique une liaison spécifique de 12 pmol/mg, correspondant à une valeur habituelle. Les récepteurs MT1 purifiés en Fos14/CHS ne montrent pas de liaison spécifique, comme cela a déjà été observé. Les récepteurs MT1 stabilisés en NAPol seul révèlent une liaison spécifique de 3,2 pmol/mg et ceux stabilisés par les NAPols en présence de lipides montrent une liaison comprise entre 2,1 et 3,2 pmol/mg. L'addition de lipide ne semble donc pas avoir d'effet bénéfique par rapport aux NAPols seuls. Par ailleurs, pour 100% de récepteur MT1 pur et actif, on attendrait 18 500 pmol/mg. L'activité de liaison mesurée sur les échantillons MT1 stabilisés en NAPols (≈ 3 pmol/mg) correspondrait donc à moins de 0,1 % de récepteur pur et actif. Ceci met en évidence que, dans les conditions testées, les NAPols, seuls ou en combinaison avec des lipides, n'améliorent que très faiblement l'activité de liaison de ligand du récepteur MT1.



B

	pmol/mg	ET
MB MT1	12,0	1,3
MT1/Fos 14	ns	ns
MT1/NAPol	3,2	0,3
MT1/NAPol/DMPC	2,5	0,2
MT1/NAPol/DOPC	2,3	0,7
MT1/NAPol/DOPS	2,3	0,3
MT1/NAPol/LBE	2,1	0,5
MT1/NAPol/Aso	3,1	0,4

Figure 56 : Test de fixation du radioligand sur le récepteur MT1 stabilisé en NAPols seul ou additionné de lipides

A : Graphique illustrant les résultats du test de fixation de radioligand et **B** : tableau de valeurs exprimées en pmol de récepteur ayant fixé un ligand par mg de protéine totale (pmol/mg), avec les écarts types (ET). Les valeurs non significatives sont indiquées par l'abréviation : ns. Ce test a été réalisé sur des membrane *P. pastoris* exprimant le récepteur MT1 (MB MT1), sur le récepteur MT1 purifié en Fos14/CHS (MT1/Fos14), sur le récepteur MT1 stabilisé en NAPols seul (MT1/NAPols) ou stabilisé en NAPols et additionné de différents types de lipides (MT1/NAPol/DMPC ; MT1/NAPol /DOPC ; MT1/NAPol /DOPS ; MT1/NAPol /LBE ; MT1/NAPol /Aso). Une concentration de 50 nM de [^{3}H]mélatonine et la méthode de séparation par précipitation au PEG avant filtration ont été utilisées.

3.4. Reconstitution en nanodisques

Une autre possibilité, pour stabiliser le repliement natif des récepteurs en solution, consiste à employer des systèmes lipidiques, tels que les nanodisques, qui miment au plus près la membrane. Les nanodisques sont de petits disques de bicouche lipidique dont la structure est stabilisée par des lipoprotéines hélicoïdales appelées MSP (Membrane Scaffolding Protein). Les protéines membranaires purifiées en détergent, mises en présence de MSP et de lipides solubilisés à l'aide de détergent, vont pouvoir être incorporées dans les nanodisques lors de leur assemblage spontané par élimination des détergents (Bayburt & Sligar, 2010). Cette approche ayant été employée avec succès pour plusieurs RCPG (Leitz *et al.*, 2006 ; Whorton *et al.*, 2007 ; Kuszak *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2009 ; Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013), nous avons souhaité la tester sur le récepteur MT1. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Pharmacologie Moléculaire de RCPG (PMR) du Dr. Jean-Louis Banères, à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier.

3.4.1. Assemblage et purification des nanodisques

Sur la base des compositions en nanodisque employées avec succès pour les RCPG, nous avons choisi d'utiliser un mélange de lipides POPC/POPG solubilisés en détergent Cholate et des MSP1 E3 qui forment des nanodisques de grande taille (≈ 12 nm de diamètre). Sachant qu'un ratio molaire [1 MSP : 130 POPC/POPG] est nécessaire à la formation d'un disque et qu'un RCPG déplace environ 40 molécules de lipide (données estimées sur la base des structures de la bactériorhodopsine et rhodopsine (Ritchie *et al.*, 2009)), nous avons opté pour un ratio [1 MSP : 90 lipides]. Un rapport similaire a été utilisé pour reconstituer avec succès différents RCPG dans des nanodisques, comme par exemple le récepteur d'hormone parathyroïde PTH1R (Mitra *et al.*, 2013). De plus, nous nous sommes placés dans un ratio molaire [RCPG : MSP] faible [1:10], qui favorise l'efficacité d'insertion en limitant le nombre de récepteurs par nanodisque. Nous avons donc utilisé un ratio molaire final de [0,1 GPCR : 1 MSP : 90 lipides]. J'ai incubé les récepteurs MT1 purifiés en Fos14/CHS avec les lipides solubilisés en cholate et les MSP. Puis, j'ai éliminé les détergents par l'ajout de billes de polystyrène (Biobeads) pour permettre l'assemblage des nanodisques. J'ai ensuite procédé à une purification sur colonne de nickel, afin de séparer les nanodisques vides et les nanodisques ayant intégrés un RCPG. En effet, les récepteurs MT1 possèdent une étiquette 10-histidines, alors que les MSP n'en ont pas. J'ai donc chargé l'échantillon sur une colonne de nickel et élué les protéines en deux étapes par un tampon contenant 0,2 M d'imidazole puis 0,5 M d'imidazole. Le profil d'élution, correspondant à la mesure de l'absorbance à 280 nm, (**Figure 57 A**) montre un pic de protéines lors de la première étape d'élution à 0,2 M d'imidazole mais pas lors de la seconde étape à 0,5 M d'imidazole. J'ai ensuite analysé les échantillons récoltés au cours de la

purification sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 57 B**). Cette analyse révèle une bande intense de MSP dans la fraction non retenue et le lavage (piste 1 et 2), qui correspond aux nanodisques vides en excès non retenus sur la colonne. Dans les fractions de la première élution, on observe une bande de MSP et une bande de MT1, ce qui correspond aux nanodisques ayant intégrés le récepteur. Les quatre fractions d'élution de 20 à 22 ml contenant le plus de protéines (pistes 3 à 6 sur le gel) ont été regroupées puis dialysées pour éliminer l'imidazole. J'ai ensuite concentré l'échantillon et mesuré l'absorbance à 280 nm afin de déterminer la concentration en protéine.

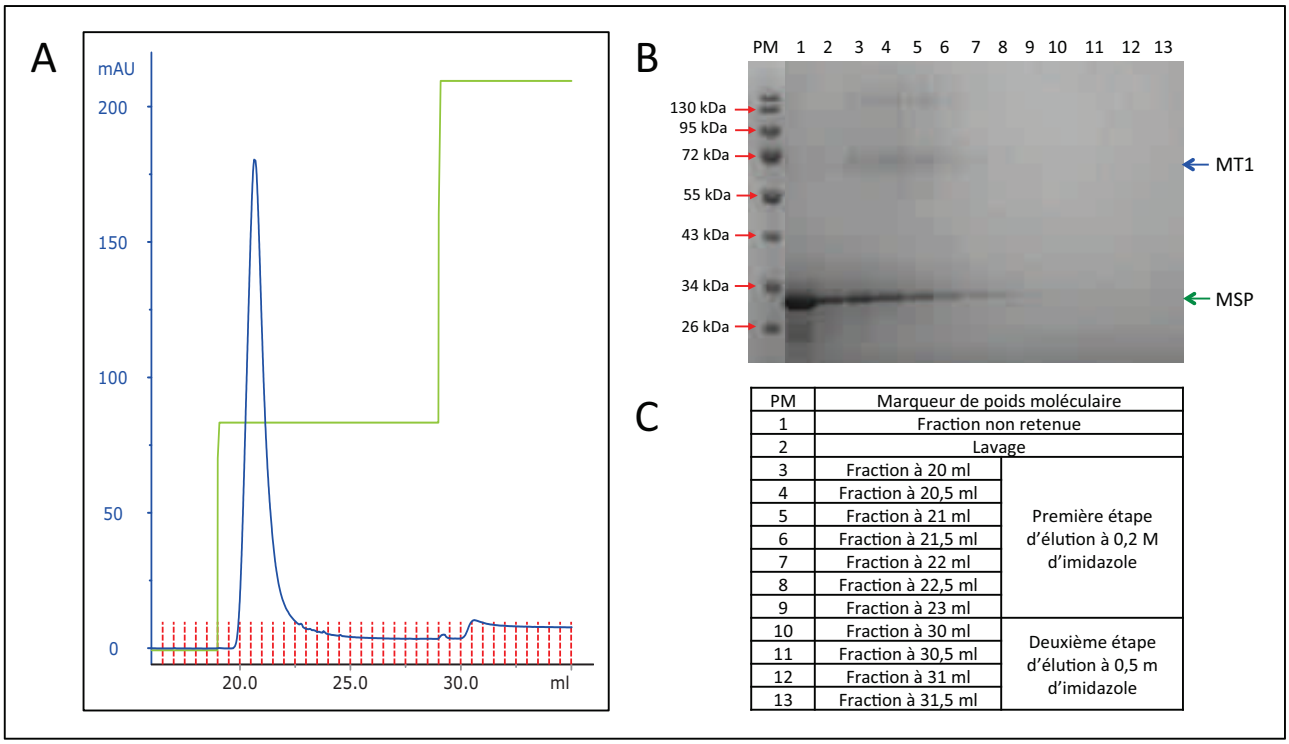


Figure 57 : Résultats de la purification des nanodisques sur colonne de nickel

A : Profil d'élution de la colonne de nickel en deux étapes, **B** : SDS-PAGE coloré au bleu de Comassie et **C** : Légende du dépôt sur gel SDS-PAGE.

3.4.2. Test d'activation de la protéine G

Nous avons ensuite soumis l'échantillon produit à un test d'activation de la protéine G. L'objectif est de déterminer si le récepteur MT1 reconstitué en nanodisque est fonctionnel, c'est à dire capable d'activer la protéine Gi, à laquelle il est naturellement couplé, sous l'effet de la liaison de son ligand agoniste, la mélatonine. Le principe du test repose sur le fait que, si le récepteur lie le ligand agoniste, il adopte une conformation active capable d'activer la protéine G. Cette activation se traduit par l'échange du GDP par le GTP dans la sous-unité α de l'hétérotrimère αβγ. La mise en évidence de la liaison du GTP se fait ici grâce à un GTPγS couplé à un fluorophore Bodipy. En milieu aqueux, le Bodipy se trouve à proximité de la base du GTP et de ce fait sa fluorescence est

quenchée. Lorsque le GTPγS-Bodipy se lie à la sous-unité α de la protéine G, il y a un éloignement entre la base du GTP et le fluorophore qui retrouve ses propriétés de fluorescence, ce qui se traduit par une exaltation de la fluorescence. Ainsi, la mesure d'une augmentation de fluorescence traduit la fixation du GTP et donc l'activation de la protéine G par le récepteur. De plus, le GTPγS est non hydrolysable par la protéine G, il n'y a donc plus d'échange possible avec le GDP. Ainsi, le cycle est bloqué et il y a une accumulation de protéine G ayant fixé du GTP et donc une augmentation de fluorescence. Il faut noter que la sous-unité α de la protéine G possède une activité intrinsèque, c'est à dire qu'elle est capable d'échanger le GDP contre du GTP sans activation par un RCPG. Cette activité est réduite lorsqu'elle s'associe aux sous-unités β et γ pour former l'hétérotrimère. C'est pourquoi, dans le test mis en place, les sous-unités β et γ purifiées sont systématiquement ajoutées à la sous-unité α. De plus, nous avons réalisé un contrôle négatif en absence de ligand agoniste afin de déterminer ce bruit de fond et d'en déduire l'activation spécifique de la protéine Gi par le récepteur MT1 ayant fixé le ligand agoniste mélatonine. En outre, un contrôle négatif avec la protéine Gs, à laquelle le récepteur MT1 n'est normalement pas couplé, a également été réalisé.

Dans cette expérience, j'ai pré-incubé les récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques avec les trois sous unités purifiées de la protéine Gs en présence de ligand agoniste mélatonine ou de la protéine Gi, en présence ou en absence du ligand. Puis, j'ai ajouté le GTPγS-Bodipy et mesuré la fluorescence immédiatement et 40 minutes plus tard. Ce temps de 40 minutes correspond au plateau où toutes les sous-unités présentes en solution ont dû fixer le GTPγS-Bodipy et où l'intensité de fluorescence a donc atteint son maximum. Les résultats (**Figure 58**) montrent qu'il y a une augmentation significative de la fluorescence avec la protéine Gi en présence du ligand mélatonine mais pas en absence de ligand. D'autre part, il n'y a pas d'augmentation de fluorescence avec la protéine Gs en présence de ligand. Ceci indique que les récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques sont capables d'activer spécifiquement la protéine Gi, en présence du ligand agoniste mélatonine.

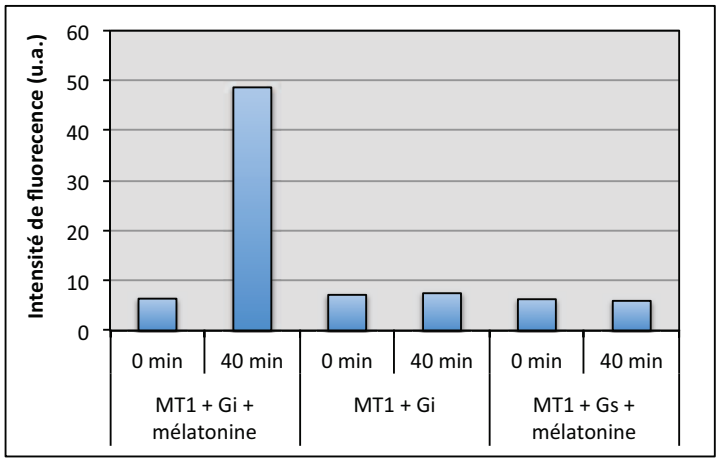


Figure 58 : Test d'activation de la protéine G sur le récepteur MT1 reconstitué en nanodisque

Graphique illustrant les résultats de la liaison du GTPγS-Bodipy représentés par l'intensité de fluorescence exprimée en unité arbitraire (a.u.) en fonction de la condition testée mesurée immédiatement après l'ajout du GTPγS-Bodipy (0 min) et 40 minutes plus tard (40 min). MT1 : récepteur MT1 reconstitué en nanodique ; Gi : protéine Gi hétérotrimérique reconstituée *in vitro* à partir des sous-unités αi, β et γ purifiées ; Gs : protéine Gs hétérotrimérique reconstituée *in vitro* à partir des sous-unités αs, β et γ purifiées ; mélatonine : 1 µM de ligand agoniste mélatonine.

Par la suite, j'ai réalisé des tests de fixation de radioligand à l'équilibre avec de la [^{3}H]mélatonine sur les récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques. L'activité de liaison mesurée est plutôt faible (≈ 50 pmol/mg, résultats non montrés), indiquant que seule une faible proportion des récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques est capable de fixer un ligand. Par ailleurs, j'ai également analysé par SEC-MALS, l'échantillon de récepteur MT1 reconstitué en nanodisque, qui s'est révélé être majoritairement agrégé (résultats non montrés). Ceci suggère que les nanodisques que nous avons produits ne sont pas stables dans le temps et que rapidement le complexe se déstabilise, ce qui entraine l'agrégation des protéines.

3.5. Discussion

3.5.1. L'ajout de lipide

Le récepteur MT1 a été purifié en détergent Fos14 en présence de CHS, un analogue du cholestérol qui est connu pour améliorer l'activité et la stabilité des RCPG purifiés (Gimpl & Fahrenholz, 2002 ; Weiss & Grisshammer, 2002 ; Hanson *et al.*, 2008). Néanmoins, dans le cas du récepteur MT1 purifié en Fos14, la présence de CHS n'est pas suffisante pour permettre l'activité de liaison de ligand. Une hypothèse est qu'un autre lipide, indispensable à la liaison de la mélatonine, a été éliminé lors de la solubilisation et purification du récepteur. Nous avons donc voulu voir si l'ajout de lipides pouvait avoir un effet bénéfique pour le repliement, la fonctionnalité et la stabilité du récepteur MT1, comme cela a été montré pour d'autres RCPG (Baneres *et al.*, 2005 ; Damian *et al.*, 2006). Cependant, dans les conditions testées, nous n'avons pas observé d'amélioration de l'activité mesurée en présence de différents lipides. Une explication possible est que les conditions testées ne sont pas adaptées au récepteur. Nous pourrions alors tester d'autres types de lipides et de faire varier les conditions expérimentales, notamment le ratio de protéine et lipide, le temps et la température d'incubation. Ceci nous permettrait peut-être d'identifier des conditions permettant de rétablir l'activité de liaison de ligand du récepteur MT1 purifié en Fos14. Une autre explication est que l'addition de lipides ne suffit pas à restaurer l'activité car le détergent Fos14 empêche la liaison du ligand. Ceci peut être dû à sa structure micellaire qui gêne l'accessibilité au site de fixation, ou au fait que ce détergent ne fourni pas un environnement favorable au récepteur MT1 pour son activité de liaison de ligand ou encore qu'il dénature la structure du récepteur de façon irréversible.

3.5.2. L'échange des détergent avec des polymères amphiphiles

Dans l'hypothèse où le Fos14 ne mime pas correctement l'environnement membranaire ou gêne l'accessibilité au site de fixation, sans dénaturer la structure du récepteur de façon irréversible, nous avons testés l'échange des détergents avec des NAPols. En effet, des études ont montré que

ces polymères amphiphiles fournissent aux protéines membranaires un environnement moins dénaturant que les détergents, permettant ainsi une meilleure stabilisation du repliement natif en solution (Gohon *et al.*, 2008 ; Breyton *et al.*, 2010). Les NAPols ont été employés avec succès pour la stabilisation de RCPG. Par exemple, le récepteur de vasopressine de type 2 purifié a été stabilisé en NAPols sous forme fonctionnelle (Rahmeh *et al.*, 2012). Le récepteur de la ghréline a été purifié en condition dénaturante, puis a été renaturé sous forme fonctionnelle à l'aide de NAPols en présence de lipide Asolectine et de CHS (Bazzacco *et al.*, 2012). Cependant, dans les conditions testées, les NAPols, seuls ou en combinaison avec des lipides, n'améliorent que très faiblement l'activité de liaison de ligand du récepteur MT1. Ceci nous indique que l'absence d'activité de liaison n'est probablement pas liée à la structure micellaire du Fos14, qui gênerait l'accessibilité au site de fixation ou ne mimerait pas correctement l'environnement membranaire. Par contre, il est possible que le détergent Fos14 ait dénaturé de façon irréversible les récepteurs MT1 et que les NAPols ne permettent pas de restaurer la structure native des récepteurs. Une autre interprétation est que les conditions que nous avons choisis pour la stabilisation avec les polymères amphiphiles ne soient pas les plus adaptées. Nous pourrions donc envisager de tester d'autres types de polymères amphiphiles, différents ratios de protéine/polymère et divers temps et températures d'incubation, dans le but d'améliorer ces résultats.

3.5.3. La reconsitution en nanodisques

Dans l'idée que le Fos14 ne dénature pas la structure du récepteur de façon irréversible, nous avons testé la reconstitution en nanodisques des récepteurs MT1 purifiés en Fos14/CHS, afin d'apporter aux récepteurs un environnement qui mime au plus près la membrane, favorisant un repliement natif sous forme fonctionnelle. Les conditions de reconstitution ont été établies avec le Dr. Jean-Louis Banères sur la base des différentes conditions qui ont été employées avec succès pour des RCPG (Leitz *et al.*, 2006 ; Whorton *et al.*, 2007 ; Kuszak *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2009), y compris dans son laboratoire (Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013). Les récepteurs MT1 purifié en Fos14/CHS ont pu être reconstitué en nanodisques et un test d'activation de la protéine G avec du GTPγS-Bodipy a montré que les récepteurs étaient capables d'activer spécifiquement la protéine Gi, uniquement en présence du ligand agoniste mélatonine. Ceci nous indique que la reconstitution en nanodisque a permis de restaurer la structure native sous forme fonctionnelle des récepteurs MT1 purifiés en Fos14. Néanmoins, il faut noter que l'activité de la protéine G étant un acte catalytique, il est difficile d'estimer par ce test la proportion de récepteur fonctionnel. Les tests de fixation de radioligand à l'équilibre, réalisés par la suite, montrent peu de liaison spécifique de ligand. Ceci suggère que seule une faible proportion des récepteurs MT1 reconstitués en nanodisques ont récupéré une conformation native capable de fixer la mélatonine et

d'activer la protéine Gi. Une autre possibilité serait que le test de liaison de [^{3}H]mélatonine sous-estime la quantité de récepteur capable de lier un ligand. Cependant, les tests de fixation de radioligand à l'équilibre, avec une séparation par filtration sur GF/B, ont déjà été employés avec succès, pour mesurer l'activité de liaison de RCPG reconstitués en nanodisques (Whorton *et al.*, 2007).

D'autres raisons peuvent expliquer le fait que nous mesurons une fixation de radioligand plus faible que celle attendue. En effet, la protéine G hétérotrimérique était présente dans le test de fixation de GTPγS-Bodipy, mais pas dans le test de liaison de radioligand agoniste. Or, pour de nombreux RCPG, les protéines G stabilisent l'état actif du récepteur, qui présente la plus haute affinité pour les agonistes. C'est une des raisons pour lesquelles, pour de nombreux récepteurs purifiés, les tests de liaison sont effectués avec des ligands antagonistes et non agonistes. Il est donc envisageable que la présence de la protéine Gi soit importante pour stabiliser un état du récepteur MT1 qui lie le ligand agoniste avec une affinité raisonnable. Afin de vérifier cette hypothèse, nous souhaitons réaliser un test de fixation de radioligand en présence de la protéine Gi hétérotrimérique. De plus, dans le test de liaison de radioligand, une concentration de 50 nM de [^{3}H]mélatonine a été mise en jeu, contre une concentration de 1 µM de ligand mélatonine dans le test de fixation de GTPγS-Bodipy. Dans ce cas, il est possible que l'affinité du ligand mélatonine, pour le récepteur MT1 reconstitué en nanodisque, soit faible et que la concentration en [^{3}H]mélatonine ne soit pas suffisante pour détecter tous les sites de liaison. Il serait alors intéressant de réaliser des tests de fixation de GTPγS-Bodipy en présence de différentes concentrations en ligand mélatonine. L'objectif serait d'évaluer s'il y a une dose réponse de l'intensité de fluorescence émise en fonction de la concentration en ligand mise en jeu, ce qui nous permettrait d'estimer l'affinité du récepteur purifié pour la mélatonine.

Par ailleurs, l'analyse en SEC-MALS a révélé que l'échantillon de nanodisque MT1 était majoritairement agrégé après quelques jours, traduisant une déstabilisation rapide du complexe conduisant à l'agrégation des protéines. Une possibilité est que les ratios récepteurs/lipides/MSP utilisés ne sont pas optimaux pour l'assemblage et le maintien d'une structure stable des nanodisques. Nous envisageons donc de tester différents ratios récepteurs/lipides/MSP, afin d'optimiser les conditions pour l'obtention de nanodisques plus stables.

3.5.4. Conclusions et perspectives

L'objectif de cette étude consistait à évaluer si l'utilisation d'agents stabilisants et de système de reconstitution de protéines membranaires pouvait restaurer l'activité de liaison de ligand des récepteurs MT1 purifiés en Fos14. L'ensemble des résultats obtenus nous conduit à penser que

le détergent Fos14 entraine une dénaturation, plus ou moins réversible, de la conformation active des récepteurs MT1 qui n'est pas rétablie de façon significative avec les NAPols mais semble l'être, au moins partiellement, lors du retour en bicouche lipidique de type nanodisque. Bien que nos essais soient assez préliminaires, la reconstitution en nanodisque nous semble très prometteuse. Nous envisageons donc de poursuivre ces essais en optimisant les conditions d'assemblage. En effet, une fois les bonnes conditions d'assemblage identifiées, les nanodisques sont stables et se comportent comme des particules solubles, permettant de travailler en absence de détergent ou de lipide et facilitant ainsi les études *in vitro* (Gluck *et al.*, 2011). De plus, leur utilisation ouvre des perspectives très intéressantes pour l'étude des mécanismes moléculaires responsables de l'activation des RCPG, comme illustré par de récents travaux avec le récepteur de la ghréline (Damian *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2012 ; Mary *et al.*, 2013).

Par ailleurs, nous souhaitons également tester la stabilisation des récepteurs MT1 avec les NAPols et/ou les nanodisques à partir des échantillons purifiés en mélange de détergent Fos14 et CHAPS. En effet, parallèlement à ces essais, j'ai identifié une condition de solubilisation et purification du récepteur MT1 en mélange de détergent Fos14 et CHAPS, qui nous permet d'obtenir un échantillon à la fois relativement pur, homogène, monomérique et avec une importante activité de liaison de ligand. Cependant, même si l'activité de liaison des récepteurs est en partie maintenue dans cette condition, à la longue la présence de détergent risque tout de même de finir par dénaturer les récepteurs. Il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir stabiliser la structure native de ces récepteurs dans un environnement moins dénaturant.

Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse constitue les premiers pas vers la caractérisation structurale et fonctionnelle du récepteur de la mélatonine MT1 humain par des approches biochimiques et biophysiques. Nous avons en effet identifié des conditions de production et de purification permettant d'obtenir un échantillon de récepteur MT1 relativement pur, homogène, monomérique, avec une importante activité de liaison de ligand et un profil pharmacologique très proches des récepteurs MT1 exprimés dans des membranes de cellules de mammifères CHO.

Cette étude souligne la complexité de la problématique de bioproduction des RCPG et le nombre de mises au point à réaliser pour pouvoir réunir le matériel nécessaire aux études *in vitro*. Ce travail illustre en particulier les différentes approches de criblage à mettre en œuvre à chacune des étapes de production. Nous avons ainsi dû évaluer plusieurs constructions protéiques et systèmes d'expression pour identifier la meilleure combinaison pour la production du récepteur MT1, mais aussi un certains nombre de conditions de solubilisation et de purification pour pouvoir obtenir un échantillon qui soit à la fois pur, homogène et actif, sans parler des approches de stabilisation des récepteurs purifiés sur lesquelles nous devons encore travailler. Tout ceci met en avant que, malgré le panel d'outils développés pour la production, la purification et la stabilisation des nombreux RCPG étudiés ces dernières années, il n'existe pas de méthode universelle qui soit efficace pour tous les récepteurs et que les conditions de bioproduction doivent encore à l'heure actuelle être mises au point pour chaque nouveau récepteur étudié.

Dans le cas présent, la stratégie qui nous a permis d'isoler le récepteur MT1 en quantité et en qualité compatible avec les études *in vitro* envisagées s'est appuyée sur deux points essentiels. D'une part, nous avons utilisé d'un récepteur de référence pour développer et valider des méthodes de préparation et d'analyses pour ensuite les appliquer au récepteur MT1. Ceci nous a entre autres beaucoup aidé pour la mise au point d'un test de fixation de radioligand à l'équilibre adapté aux protéines purifiées, tout comme les analyses en SEC-MALS et en microscopie électronique. Potentiellement, cela devrait aussi nous aider pour les études à suivre, notamment celles mettant en jeu les techniques de SPR et d'analyse de thermostabilité. D'autre part, nous avons beaucoup travaillé sur le choix des détergents à utiliser pour solubiliser les récepteurs MT1 afin de trouver un bon compromis entre la monodispersité et la préservation de l'activité. Contrairement aux conditions couramment utilisées, y compris pour le récepteur A2A, utilisant des détergents non-ioniques de type DDM ou DM, c'est finalement l'utilisation d'un mélange de deux détergents aux propriétés opposées, l'un permettant la solubilisation sous forme monomérique, l'autre favorisant le

maintien de l'activité, qui nous a permis d'obtenir un échantillon de récepteur MT1 relativement pur, homogène, monomérique et actif.

Avec ce matériel purifié, nous avons pu démarré des études biochimiques et biophysiques que nous souhaitons approfondir par la suite. Il s'agira d'une part, d'affiner les conditions d'obtention de récepteur actif et stable, en particulier avec la reconstitution en nanodisques qui ouvre des perspectives particulièrement attrayantes pour l'étude de complexes protéiques variés en présence ou en absence de ligands. D'autre part, nous pourrons avancer dans l'analyse et la caractérisation des différents échantillons en détergents par les techniques développées pendant ma thèse, mais aussi avec d'autres méthodes biophysiques qui devraient être mise en place. De plus, nous souhaitons approfondir les études d'interaction des récepteurs purifiés avec différents ligands, mais aussi avec des partenaires protéiques, et évaluer l'effet des ligands sur les interactions protéines/récepteurs. Par ailleurs, la qualité des échantillons produits nous permet déjà d'envisager des approches de criblage *in vitro* dans un environnement expérimental contrôlé. Par la mise en œuvre de diverses techniques, telles que la SPR, la SPR inverse ou le phage display, nous espérons identifier de nouveaux ligands mais aussi de nouvelles protéines ou fragments d'anticorps interagissant avec ces récepteurs.

Annexes

Publication 1 :

Alkhalfioui F, **Logez C**, Bornert O, Wagner R. (2011). "Expression systems: Pichia pastoris. In Production of Membrane Proteins – Strategies for Expression and Isolation." (Robinson A.S., ed.) **Wiley-VCH** 75-108.

UNCORRECTED PROOF

3
Expression Systems: *Pichia pastoris*

Fatima Alkhalfioui, Christel Logez, Olivier Bornert, and Renaud Wagner

3.1
Introduction

Among the most widespread, popular, effective, and inexpensive microorganisms developed for heterologous expression, *Pichia pastoris* has become a system of choice not only for the production of cytosoluble and industrially relevant proteins, but also for a growing panel of eukaryotic membrane proteins expressed at levels compatible with structural studies. Up to now indeed, more than 150 different representative membrane proteins have been expressed in *P. pastoris* and this has led to the acquisition of high-resolution structures for a dozen of them, making *P. pastoris* one of the most performant heterologous expression system for the structural studies of eukaryotic membrane proteins. This chapter gives a global overview on (i) how the *P. pastoris* system basically operates, (ii) how it performs for the recombinant expression of membrane proteins, and (iii) the different strategies and tips that can be applied to improve the system.

3.2
A (Brief) Summary on the (Long) History of *P. pastoris*

P. pastoris is an ascosporous yeast that is naturally present in tree fluxes from European and north American forests [1]. It was first isolated in 1919 in France from the exudate of a chestnut tree [2] and half a century later was described for its ability to use methanol as a sole carbon source [3]. From this time point, the potential of *P. pastoris* for biotechnological applications has been continuously explored both in industry and academia. While its use as a potential source of single-cell protein for animal feed did not meet the expected economic viability [4], this yeast was rapidly recognized as a remarkable production platform for a wide class and number of heterologous proteins, and up to now more than 500 candidates have been successfully recombinantly expressed in this system (reviewed in [5, 6] among others), several of them being biopharmaceuticals already on the market. Recently, phylogenetic analyses based on rRNA sequence

M

Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation, First Edition.
Edited by Anne Skaja Robinson.
© 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

c03.indd 75 2/16/2011 11:42:25 AM

comparisons led to the transfer of *Pichia pastoris* into the *Komagataella* genus [7], and the commonly used biotechnological strains are now classified into two distinct species, *K. pastoris* and *K. phaffii* [8]. The saga of this special yeast, that we will continue to call *P. pastoris* for the sake of simplicity, will be certainly boosted in the coming years after the very recent release of its genome sequence [9]. This new wealth of information will indeed open new possibilities for the engineering of enhanced biotechnological strains.

3.3 Introducing *P. pastoris* as a Biotechnological Tool: Its (Extended) Strengths and (Limited) Weaknesses

The success of *P. pastoris* as an efficient protein factory is attributable to a series of advantages related to both its yeast nature and its particular methylotrophic metabolism. This organism indeed presents a short generation time (2 h), grows on very simple and inexpensive media, and is very easy to handle. A comprehensive panel of plasmids and strategies is available for the expression of recombinant genes and genetic manipulation is nearly as straightforward as for *Saccharomyces cerevisiae*. As a methylotroph, *P. pastoris* possesses a peculiar methanol utilization pathway relying on some of the strongest and most tightly regulated known promoters that can be used for very-high-level expression of recombinant genes. In addition, *P. pastoris* can reach very high cell densities (up to 130 g/l dry cell weight [5]), and various fermentation processes and formats have been developed in the industry so that up-scaling protein production is easily achievable [10, 11]. Contrary to *Escherichia coli*, *P. pastoris* is a eukaryotic microorganism capable of complex post-translational modifications including disulfide isomerization, sulfation, phosphorylation, N-terminal acetylation, C-terminal methylation, myristoylation, farnesylation, and glycosylation (reviewed in [12]), which are often very essential for the proper targeting, biological activity, and stability of the expressed recombinant proteins. Regarding glycosylation, which is central for many membrane proteins [13–15], *P. pastoris* has been notably shown to graft shorter and more authentic oligosaccharide chains to proteins than *S. cerevisiae* does [16], and therefore often appeared as a more appropriate system [11]. Finally, ^{15}N and ^{13}C isotopic labeling of recombinant proteins for nuclear magnetic resonance or spectrometric studies is also achievable with *P. pastoris,* both in a uniform mode using isotopically enriched nitrogen and carbon sources [17] or more selectively using amino acid isotopes and engineered auxotroph strains [18].

This idyllic description has, however, to be tempered with some drawbacks that prevent *P. pastoris* from becoming an ideal expression system. First, a common characteristic for eukaryotic systems that are efficiently overproducing proteins, an overload of the translocation and folding machineries in *P. pastoris* often creates a stress that triggers the activation of sorting and degradation processes, and results in lowered expression levels and heterogeneity of recombinant proteins [18]. Moreover, if glycosylation processes occur in a fashion acceptable for many

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 76 2/16/2011 11:42:25 AM

recombinant proteins, *P. pastoris* is not able to graft the complex carbohydrate motifs that are sometimes critical for the functionality of mammalian proteins. In addition, nonhomogeneous *N*-glycosylation of recombinant proteins is frequently observed, notably in the case of membrane proteins, leading to some degree of heterogeneity [19–22] that can be detrimental in various applications, including structural studies. Recently, several *Pichia* strains have been engineered to generate more complex and more homogeneous *N*-glycosylations (reviewed in [23]). These strains exhibited protein-dependent but promising outcomes, thereby also demonstrating all the potential and possibilities that could be gained from these genetic engineering approaches.

Another characteristic that can have a direct impact on the expression of mammalian membrane proteins is related to the lipidic composition of yeast membranes that varies significantly from that of higher eukaryotes membranes [24]. As membrane proteins do require specific lipids for their proper functions or for their correct folding and stability, these differences may influence both the expression level and functionality of recombinant membrane proteins. This was notably reported in studies where the absence of cholesterol in *Pichia* membranes was shown to profoundly alter the activity and stability of recombinant membrane proteins [25].

Finally, a secondary but not trivial issue is related to the presence of a significant cell wall surrounding *Pichia* cells that cannot only hinder the secretion of certain proteins [26], but also represents an obstacle for the preparation of membrane-embedded proteins as aggressive disruption methods are needed [27]. Engineered strains with weaker cell walls have been recently developed [26, 28], but none has been reported yet for its use in heterologous expression of membrane proteins and their benefit for a facilitated cell disruption has still to be assayed.

3.4 Basics of the *P. pastoris* Expression System

This section is intended at give a global overview on how the system functions for the heterologous expression of proteins in general, before giving specific details on how it performs in particular for membrane proteins (Section 3.5). Further details on the system as well as additional information concerning secreted and/or cytosoluble proteins can be found in several excellent and comprehensive reviews that have been published on the topic [5, 6, 11, 29].

3.4.1 Methanol Utilization Pathway

Together with a small set of methylotrophic yeasts from the *Pichia*, *Komagataella*, *Candida* and *Ogatae* genera, *P. pastoris* has developed a specific metabolism for the utilization of methanol as sole carbon source. Briefly, methanol enters specialized microbodies, the peroxisomes, where it is oxidized by specific oxidases

UNCORRECTED PROOF

that are encoded by the two genes *AOX1* and *AOX2* to generate formaldehyde and hydrogen peroxide. While the latter compound is decomposed to water and molecular oxygen by a peroxisomal catalase, formaldehyde leaves the peroxisome to enter both the cytosolic dissimilatory pathway to yield energy and the assimilatory pathway for generation of biomass [30]. The genes encoding the specific enzymes related to this peculiar metabolism are repressed when cells are grown on nonmethanol carbon sources (glucose, glycerol, ethanol, etc.) and are dramatically induced in presence of methanol; alcohol oxidases representing as high as 30% of the total soluble protein content. These enzymes are thus very tightly regulated and their promoters represent ideal components to be used for recombinant expression – the basis for the development of the *P. pastoris* expression system.

3.4.2
Host Strains and Plasmids

The principal strains used for recombinant expression derived either from the NRRL Y-11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) or the NRRL Y-48124 (Invitrogen expression kit) strains, both being from the *K. phaffii* type [8]. This limited number of strains is listed in Table 3.1. They mainly differ in their auxotrophic behavior, principally relying on a histidinol dehydrogenase deficiency (*his4*), allowing, upon transformation, for the positive selection of recombinant expression vectors. Some of them bear additional deficiencies in endogenous proteases (SMD series); others were recently engineered for their capacity in performing "human-like" *N*-glycosylations [23].

Expression vectors (Table 3.2) are built on a classical *E. coli*/yeast shuttle model

Table 3.1 Most commonly used strains of *P. pastoris*.

Strain	Genotype	Phenotype
NRRL[a)] Y-11430	wild-type	Mut^+
X-33	wild-type	Mut^+
GS115	*his4*	Mut^+, His^-
KM71	*his4, arg4, aox1::ARG4*	Mut^S, His^-, Arg^+
SMD1163	*his4, pep4, prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^-, $CarbY^-$)
SMD1165	*his4, prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (B^-)
SMD1168	*his4, ura3, pep4::URA3*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^S, $CarbY^-$)
PichiaPink® Strain 1	*ade2*	Mut^+, Ade^-
PichiaPink® Strain 2	*ade2, pep4*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (A^-, B^S, $CarbY^-$)
PichiaPink® Strain 3	*ade2, prb1*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (B^-)
PichiaPink® Strain 4	*ade2, pep4, prb1*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (A^-, B^-, $CarbY^-$)

a) NRRL, Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL.
See text for the explanation of the different elements.

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 78 2/16/2011 11:42:25 AM

Table 3.2 *P. pastoris* expression vectors.

Name	Selection markers	Phenotype of transformants	Promoter	Secretion sequence	Added tags
pAO815	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	none	none
pPIC3.5K	*HIS4, Kan*	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	none	none
pPIC9K	*HIS4, Kan*	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	α factor	none
pPICZ A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{AOX1}	none	c-Myc/His_6
pPICZα A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{AOX1}	α factor	c-Myc/His_6
pPIC6 A, B, C	*Bsd*	Bla^R	P_{AOX1}	none	c-Myc/His_6
pHIL-D2	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	none	none
pHIL-S2	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	PHO1	none
pFLD	*Ble*	Zeo^R	P_{FLD1}	none	V5 epitope/His_6
pFLDα	*Ble*	Zeo^R	P_{FLD1}	α factor	V5 epitope/His_6
pGAPZ A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{GAP}	none	c-Myc/His_6
pGAPZα A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{GAP}	α factor	c-Myc/His_6
pPink-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	none	none
pPink-LC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	none	none
pPinkα-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	α factor	none

HIS4, *P. pastoris* auxotrophy marker, encodes a histidinol dehydrogenase; *Kan* gene, confers resistance to kanamycine (Kan^R, *E. coli*) and G418 ($G418^R$, *P. pastoris*); *Ble*, *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene, confers resistance to zeocin (Zeo^R); *Bsd* gene, confers resistance to blasticidin (Bla^R); *ADE2*, *P. pastoris* auxotrophy marker, encodes a phosphoribosylaminoimidazole carboxylase; P_{AOX1}, promoter sequence of the alcohol oxidase-encoding *AOX1* gene from *P. pastoris*; P_{FLD1}, promoter sequence of the formaldehyde dehydrogenase-encoding *FLD1* gene from *P. pastoris*; P_{GAP}, promoter sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding *GAP* gene from *P. pastoris*; α factor, encodes the native *S. cerevisiae* α factor secretion signal; PHO1, encodes the native *P. pastoris* acid phosphatase secretion signal; V5 epitope, GKPIPNPLLGLDST peptide; c-Myc, C-terminal *myc* epitope, EQKLISEEDL.

with components required for *E. coli* amplification (classically one origin of replication and one antibiotic selection marker) and specific elements for heterologous gene expression in *P. pastoris*. These typically include selectable auxotrophy markers (*HIS4*, *ADE2*) and/or antibiotic resistance bacterial genes (*bla*, *zeo*, and *kan*), a range of promoter and terminator sequences, a multiple cloning cassette, and supplementary signal sequences and other fusion sequences that can be added to improve the secretion and detection of the expressed proteins.

Among the panel of constitutive and inducible promoters that have been introduced in expression vectors (listed in [31]), P_{AOX1} is by far the most widely used as it is the most strongly induced in the presence of methanol. Moreover, an original P_{AOX1} synthetic promoter library was developed in a recent study that demonstrated enhanced P_{AOX1} variants could reach higher expression levels of a tested recombinant Green Fluorescent Protein (GFP) [31].

A comprehensive set of vectors and strains is commercially available from Invitrogen, each of them being accessible either individually or included in expression kits.

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 79 2/16/2011 11:42:25 AM

3.4.3
Transformation and Clone Selection Strategies

As for many other yeasts, transformation of *P. pastoris* is rather straightforward. Several robust methods are available, either based on chemically competent (spheroplasts, PEG1000, LiCl) or electrocompetent cells, thus being accessible to a large majority of operators in standard labs. Moreover, these protocols are well described and can be easily found on numerous websites (convenient *Pichia* manuals can be downloaded from www.invitrogen.com).

Except for a limited set of autoreplicative plasmids that are not yet frequently employed [32–35], most of the transforming expression vectors are designed to be maintained as integrative elements in the genome of *P. pastoris*. This is generally achieved through recombination events between linearized sequences borne by the plasmids (typically *HIS4* or P_{AOX1}) and their homologous sequence counterparts present on the genome, leading to the targeted insertion of the expression vectors. Moreover, such plasmid insertions frequently occur in tandem in yeasts and thus lead to the multiple integration of the genes of interest with a correlated impact on their subsequent expression levels.

Alternatively, integration can be obtained by a gene replacement strategy. In this case, a double recombination event must be realized between the *AOX1* promoter and terminator sequences present on the transforming DNA (containing the gene of interest and a selection marker) and the corresponding homologous sequences present on *P. pastoris* genome. This double recombination event ends up with the replacement of the *AOX1* gene by the construct of interest.

The phenotype of the resulting transformants then depends not only on the selection marker present on the chosen vector (auxotrophy and/or antibiotic resistance), but also on the selected integration strategy (plasmid insertion versus gene replacement) that dictates their methanol utilization behavior. Indeed, while a plasmid insertion does not affect the methanol utilization ability of the transformed strain (Mut^+, methanol utilization plus phenotype), the gene replacement of *AOX1* leads to a Mut^S (methanol utilization slow) phenotype. In several cases, these differences in methanol utilization have been reported as an important parameter to consider for enhancing the performance of recombinant protein expression [36].

3.4.4
Expression Conditions and Culturing Formats

Once transformants have been obtained, the next step usually consists in screening for the clones and conditions exhibiting the best expression levels of the recombinant protein. For expression strategies based on P_{AOX1}-dependent vectors, this is practically achieved by growing the cells in repressive media to an appropriate cell density and growth phase, before starting the production phase by transferring the cells to a methanol-containing induction media. For clones and expression condition screenings, small-scale culturing procedures most often rely on shaken baffled-flasks or on tubes of smaller volumes provided an appropriate aeration is

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 80 2/16/2011 11:42:25 AM

maintained. Several parameters are then usually adjusted for an optimal expression, such as the duration and the temperature of the induction phase, as well as the media formulation including the methanol concentration and the use of additive compounds.

For the production of large amounts of heterologous proteins, shake-flask culture is usually not recommended due to the limitations of volume, oxygen transfer, substrate addition, and an inability to monitor these factors efficiently. The use of bioreactors is therefore preferred, since all of these parameters can be monitored and controlled simultaneously, allowing more efficient production of the desired heterologous protein. Accordingly, a number of robust fermentation processes including fed-batch techniques and continuous culturing procedures have been developed and are routinely employed. Detailed descriptions of these methods with their benefits and limitations can be found in several excellent and comprehensive reviews that we recommend [6, 10, 11, 37].

3.5
Successful Large-Scale Expression of Membrane Proteins Using *P. pastoris*

3.5.1
P. pastoris for Membrane Protein expression

The first use of *P. pastoris* as a host for the expression of an integral membrane protein was reported in 1995 when Helmut Reilander and his colleagues successfully expressed a member of the G-protein-coupled receptor (GPCR) family – the mouse serotonin receptor 5-HT_{5A} [38]. Few additional membrane proteins were then assayed in the following years before the system became more and more popular in the 2000s: a thorough survey we conducted on the last decade of published results revealed 100 references encompassing more than 150 different membrane proteins expressed in *P. pastoris* (Table 3.3). In this list where only integral membrane proteins were considered (soluble domains of membrane proteins as well as membrane-anchored proteins were excluded), all classes of eukaryotic membrane proteins are equally represented. This includes monotopic receptors and enzymes, several aquaporins and ion channels, many members of the GPCR family, as well as large polytopic transporters bearing up to 17 putative transmembrane domains. This survey also highlights the great potential of *P. pastoris* for coexpression approaches, including studies on two membrane subunits of multimeric protein complexes, two interacting membrane protein partners, as well as a membrane protein and a cytosolic partner, in strategies where the coexpressed genes are either borne on a same vector or on two distinct vectors. Successful coexpression was actually recorded for the α and β subunits of Na/K-ATPase [39–42], and for α/β and phospholemman (a membrane modulator of the enzyme) [43]. Similarly, coexpression strategies were also reported for $K_v1.2$, a membrane subunit, and $K_v\beta2$, a cytosoluble partner, of the rat voltage-dependent K^+ channel [44–46].

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 81 2/16/2011 11:42:25 AM

Table 3.3 Recombinant membrane proteins produced using the *P. pastoris* expression system.

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
Transporters				
P-glycoprotein MDR3	mouse	140	12	GS115
P-glycoproteins MDR3 (S430T, S1073T)	mouse	140	12	GS115
Multidrug resistance protein MRP1	human	165	17	GS115, KM71
Phosphate transporter *Mt*PT1	*Medicago truncatula*	45	ND	GS115
Intestinal peptide transporter hPEPT1	human	71	ND	GS115
P-glycoproteins MDR1, MDR3 (unglycosylated)	human, mouse	140	12	GS115
P-glycoprotein MDR1 (Cys-less)	human	140	12	GS115
Antimalarial drug resistance protein Pfcrt (codon-optimized)	*Plasmodium falciparum*	57	10	KM71, GS115
P-glycoprotein MDR3	mouse	140	12	GS115
Serotonin transporter rSERT	rat	50	12	GS115, SMD1168
Breast cancer resistance protein BCRP	human	62	6	KM71
Sodium/glucose cotransporter hSGLT1	human	55	9	GS115
Copper transporter hCTR1	human	23	3	SMD1163
Low-affinity cation transporter LCT1	wheat	ND	ND	GS115
Chloroquine resistance transporter *Pf*CRT (codon-optimized)	*Plasmodium falciparum*	45	10	KM71
P-glycoprotein MDR3 (Cys-less)	mouse	140	12	GS115
Multidrug resistance protein *Pf*MDR1 (codon-optimized)	*Plasmodium falciparum*	161	12	KM71, X-33
16 ABC transporters: ABCC3, ABC A1, A4, B1, C10, C11, C12, G5, G8, B7, B6, D1, E1, F1, G1, G4	human	176	6, 12	KM71
Glucose transporter *Nl*HT1	*Nilaparvata lugens*	40	12	X-33

UNCORRECTED PROOF

7

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pHIL-D2)-**MDR3**-His_6-bio	P: 4.3 µmol/min/mg, 0.35 mg/l	CESP	[47]
(pHIL-D2)-**mutMDR3**-His_6	P: 3 µmol/min/mg, 0.7 mg/l	CESP	[48]
(pHIL-D2)-**MRP1**-HA-His_6	ligand binding assay	CE	[49]
(pPIC3K)-**MtPT1**	functional complementation	CE	[50]
(pGAPZB)-**hPEPT1**-c-Myc-His	transport assay, E: 64 pmol/mg	CE	[51]
(pHIL-D2)-**QQQ-MDR1**-His_{10}, (pHIL-D2)-**QQQ-MDR3**-His_6	ATPase activity, P: 1.2–3.8 U/mg, 0.75–1.25 mg/l	CESP	[52]
(pHIL-D2)-**MDR1**-His_{10}	ATPase activity, P: 0.75 mg/l	CESP	[53]
(pPIC3.5)-**Pfcrt**-bio	ATPase activity	CESP	[54]
(pHIL-D2)-**MDR3**-His_6	ATPase activity	CESP	[55]
(pHIL-D2)-**rSERT**	nonfunctional	CE	[20]
(pHIL)-**BCRP**-His_{10}	ATPase activity, ligand binding assay, E: 80 nmol/min/mg	CE	[56]
(pPICZB)-**hSGLT1**-FLAG-His_6	functional transport, E: 273 nmol/min/mg, P: 3 mg/l	CESPC	[57]
(pPIC3.5K)-HA-**hCTR1N15Q**	functional complementation	CESPCS (6 Å)	[58]
(pPIC3.5K)-**LCT1**	E: 14 pmol/10^6 cells/10 min	CE	[59]
(pPICZA)-**CRT**-His_6	transport activity, P: 487 pmol/mg/min	CESP	[60]
(pHIL-D2)-**MDR3**-His_6	P: 2.7 µmol/min/mg, 60 mg/g cells	CESP	[61]
(pPICZc/pPIC3.5)-**PfMDR1**-His_6-bio	ATPase activity, P: 63 µmol/mg/min	CESP	[62]
(pSGP18)-AF-**ABC**-CBP-His_6	ATPase activity, P: 82 nmol/min/mg, P: 35 mg/g cells	CESP (ABCC3)	[63]
(pPICZB)-**NlHT1**-c-Myc-His_6	transport activity	CE	[64]

(*Continued*)

M

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 83 2/16/2011 11:42:25 AM

Table 3.3 (*Continued*)

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
Vesicular glutamate transporter VGLUT1	rat	61	12	X-33
Glucose transporters GLUT1 and GLUT4	human, rat	42, 46	12	X-33
P-glycoprotein Pgp	mouse	ND	12	GS115
Formate-nitrite transporter *An*NitA	*Aspergillus nidulans*	31	6, 8	GS115
Water channel proteins				
Aquaporin PM28A	spinach	32	6	X-33
Aquaporin *So*PIP2;1	spinach	32	6	ND
Aquaporin *Pv*TIP3;1	plant	25	6	KM71
Aquaporin *So*PIP2.1	spinach	32	6	X-33
Aquaporin AQP6	rat	29	6	X-33, GS115, KM71
Aquaporin hAQP1	human	35	6	X-33
Aquaglyceroporin *Pf*AQP (codon-optimized)	*Plasmodium falciparum*	30	6	X-33
Aquaporin HsAQP5	human	ND	6	ND
Aquaporin *At*PIP2;1	*Arabidopsis thaliana*	55	6	X-33
Aquaporins *Tg*PIP2;1, *Tg*PIP2;2	*Tulipa gesneriana*	31	6	KM71
Aquaporin Aqy1	*Pichia pastoris*	ND	6	GS115 *aqy1*
Aquaporin hAQP4	human	ND	6	X-33
13 Aquaporins (hAQP0 to hAQP12)	human	30	6	X-33
Ion channel proteins				
Voltage-sensitive K^+ channel $K_v1.2/\beta2$ (coexpression)	rat	58/40	6	SMD1163
Voltage-dependent K^+ channel $K_v1.2/\beta2$ (coexpression)	rat	ND	6	SMD1163
Calcium-activated K^+ channel SK2	mammalian	64	6	SMD1163
Chimeric K^+ channel $K_v1.2/K_v2.1/\beta2.1$ (coexpression)	rat	ND	6	SMD1163
Inward-rectifier K^+ channel $K_{ir}2.2$	chicken	ND	6	SMD1163

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 84 2/16/2011 11:42:25 AM

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pGAPZB)-c-Myc-His-**VGLUT1**	P: 1 mg/l	CESP	[65]
(pPICZB)-**GLUT**-His_8	transport activity, P: 13.1 mg/g cells	CESPC	[66]
(pHIL-D2)-**QQQ-Pgp**-His_6	ATPase activity	CESPCS (3.8 Å)	[67]
(pPICZA)-His_6-**AnNitA**	ND	CESP	[68]
(pPICZB)-**PM28A**-c-Myc-His_6	P: 25 mg/l	CESP	[69]
(ND)-**SoPIP2;1**	water channel activity	CESPCS (5 Å)	[70]
(pPICZ)-**PvTIP3;1**-gly3-His_6	water channel activity	CE	[71]
(pPICZB)-**SoPIP2.1** ± His_6	P: 25 mg/l	CESPCS (2.1, 3.9 Å)	[72]
(pPICHOLi/pPICZ)-**AQP6-**His_6	E: 7 pmol/mg	CE	[73]
(pPICZB)-**hAQP1-**c-Myc-His_6	water channel activity, P: 90 mg/l	CESPC	[74]
(pPICZB)-**PfAQP**-c-Myc-His_6	P: 18 mg/l	CESPC	[75]
(pPICZB)-**HsAQP5**	water channel activity	CESPCS (2 Å)	[76]
(pPICZB)-**WT/mutAtPIP2;1**	water channel activity, P: 65 μg/l	CESP	[77]
(pPICZB)-**TgPIP2**-gly3-His_6	water channel activity	CE	[78]
(pPICZaB)-ΔN36**Aqy1**-His_6	water channel activity	CESPCS (1.5 Å)	[79]
(pPICZ)-His_8-FLAG-**hAQP4**	water channel activity	CESPCS (1.8 Å)	[80]
(pPICZB)-**hAQP**-His_6	water channel activity	CE	[81]
(pPIC3.5K)-His_8-**K_v1.2**; (pPICZC)-strepII-**K,β2**	E: 98 pmol/mg, P: 26 mg, 3.3 nmol/mg	CESPCS (2.1 nm)	[44]
(pPICZC)-His_8-**K_v1.2-β2**	P: 10 mg/ml	CESPCS (2.9 Å)	[45]
(pPIC3.5K)-strepII-His-**SK2**	E: 0.1 pmol/mg	CES	[82]
(pPICZC)-His_{10}-**K_v1.2/ K_v2.1/β2.1**	channel activation	CESPCS (2.4 Å)	[46]
(pPICZB)-**K_{ir}2.2-**GFP-1D4	channel activation, P: 8 mg/ml	CESPCS (3.1 Å)	[83]

(*Continued*)

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 85 2/16/2011 11:42:26 AM

Table 3.3 (*Continued*)

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
GPCRs				
Endothelin receptor B ETB	human	55	7	SMD1163
Endothelin receptor B ETB	human	55	7	SMD1163
Cannabinoid receptor CB2	human	51	7	X-33
Mu-opioid receptor HuMOR	human	74	7	GS115, SMD1163, SMD1168, X-33
Dopamine receptor D_{2S}	human	40	7	SMD1163
Dopamine receptor D_{2S}	human	51	7	SMD1163
Receptor smoothened hSmo	human	80	7	GS115
Cannabinoid receptor CB1	human	75	7	X-33
Mu-opioid receptor HuMOR	human	45/66	7	SMD1163
20 GPCRs: ADA1B, ADA2B, ACM1, ACM2, HRH2, OPRK, $5HT_{1D}$, $5HT_{1B}$, $5HT_{1A}$, DRD2, NK1R, NK2R, NK3R, NPY1R, $AA_{2A}R$	human, pig, mouse, rat	ND	7	SMD1163
Adenosine A_{2A} receptor $hA_{2A}R$	human	34	7	SMD1163
β_2-Adrenergic receptor β_2AR (codon-optimized)	human	45	7	SMD1168
100 GPCRs	human, pig, mouse, rat, bovine, yeast	36–126	7	SMD1163
EDG-1 receptors	human	69	7	SMD1168
Bradykinin B2 receptor B2R	human	68	7	GS115
Bradykinin B2 receptor B2R	human	55	7	SMD1163

M

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 86 2/16/2011 11:42:26 AM

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pPIC9K)-AF-FLAG-**ETB**/Δ**GPETB**-bio	E: 35–60 pmol/mg	CE	[84]
(pPIC9K)-AF-FLAG-Δ**GPETB**-bio/GFP/His_{10}; (pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-Δ**GPETB**-bio	E: 7–60 pmol/mg	CESP	[85]
(pPICZa)-AF-**CB2**-c-Myc-His_6	E: 2.6 pmol/mg	CESP	[86]
(pPICZaA)-AF-GFP-**HuMOR**-c-Myc-His_6	E: 1 pmol/mg	CE	[87, 88]
(pPIC9K)-AF-FLAG ± His_6-$\mathbf{D_{2S}}$	P: 10 pmol/mg	CESP	[89]
(pPIC9K)-AF-FLAG ± His_6-$\mathbf{D_{2S}}$, (pPIC9K)-AF-FLAG-$\mathbf{D_{2S}}$-His_{10}/bio	E: 37–80 pmol/mg	CES	[90]
(pAO815)-**hSmo**-CBD-strep-HA-His_6	ND	CESP	[91]
(pPICZa)-AF-FLAG-**CB1**-c-Myc-His_6	E: 3.6 pmol/mg	CESP	[92]
(pPICZ) ± GFP-**HuMOR**-c-Myc-His_6	E: 0.45 pmol/mg	CESP	[93]
(pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-**GPCR**-bio	E: 0.3–165 pmol/mg	CE	[94]
(pPICZaA)-AF-FLAG-His_{10}-$\mathbf{hA_{2A}R}$	P: 18 nmol/mg	CESP	[95]
(pPIC9K)-AF-His_6-$\boldsymbol{\beta_2}$**AR**	P: 11 nmol/mg	CESP	[96]
(pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-**GPCR**-bio	E: 0.1–180 pmol/mg	CE	[97]
(pPIC9K)-AF-**EDG-1**-GFP	E: 8.2 pmol/mg	CES	[98]
(pPIC9K)-AF-**B2R**-GFP	ND	CES	[99]
(pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-**B2R**-bio	E: 3.5 pmol/mg	CE	[100]

(*Continued*)

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 87 2/16/2011 11:42:26 AM

Table 3.3 (*Continued*)

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
Neuromedin U receptor NmU2R	human	60	7	SMD1163
Cannabinoid receptor CB2	human	42	7	X-33
12 GPCRs: CNR2, NK1R, NK3R, ADA1B, ADA2B, ADA2C, D2DR, OPRK, OPRD, P2RY1, HRH1, PAR1	human, rat	40–50	7	SMD1163
Mu-opioid receptor (ΔN64) ΔN64-HuMOR	human	38	7	SMD1163
β-Adrenergic receptors β_1AR, β_2AR, β_3AR	human	66	7	SMD1163
25 nonglycosylated GPCRs: CNR1, AGTR2, HTR1B, ADORA2A, DRD1, DRD2, DRD4, DRD5, OPRK, CHRM2, PTGER1, PTGER2, PTGER3, PTGER4, TBXRA2, TACR1, TACR2, TACR3, NTSR1, ADRB2, HRH4	human, mouse	ND	7	SMD1163
Leukotriene B_4 receptor BLT1	guinea pig	100	7	GS115
Enzymes				
11β-OH steroid dehydrogenase 11β-HSD1	human	29	ND	GS115
Monoamine oxidase B MAOB	human	60	1	KM71, GS115
Monoamine oxidase B MAOB	human	60	1	KM71, GS115
Monoamine oxidase A MAOA	human	60	1	KM71
11β-OH steroid dehydrogenases 11β-HSD1	human, rat	31	ND	GS115, X-33
Isatin-bound monoamine oxidase B MAOB	human	60	1	KM71, GS115
Na/K-ATPase (α_1, β_1) (coexpression)	pig	112/47	10, 1	SMD1165
Oxidosqualene cyclase hOSC	human	80	1	GS115
Na/K-ATPase (α, β) (coexpression)	pig	ND	10, 1	SMD1165

UNCORRECTED PROOF

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-**NmU2R**-bio	E: 6 pmol/mg	CE	[21]
(pPICZa)-AF-FLAG-**CB2**-c-Myc-His_6; (pPICZa)-AF-FLAG-**CB2**-His_6/His_{10}	ligand binding assay	CESP	[101]
(pPIC9K)-AF-FLAG-His_{10}-**GPCR**-bio	ligand binding assay, P: up to 0.9 mg/l	CESP	[102]
(pPICZB) ± AF ± GFP-**ΔN64-HuMOR**-c-Myc-His_6	P: 5 mg/l	CESP	[103]
(pPICZ)-AF-GFP-**βAR**-c-Myc-His_6	ND	CESP	[104]
(pPIC9K)-AF-FLAG-**GPCR**-His_{10}	E: 0–75.4 pmol/mg	CE	[22]
(pPIC3.5K)-AF-FLAG-**BLT1**	E: 50 pmol/mg, P: 0.4 mg/l	CESP	[105]
(pPIC3.5K)-**11β-HSD1**	enzyme activity	CE	[106]
(pPIC3.5K)-**MAOB**	oxidase activity P: 100 mg/l	CESP	[107]
(pPIC3.5K)-**MAOB**	ND	CESPCS (3 Å)	[108]
(pPIC3.5K)-**MAOA**	P: 115 mg/l	CESP	[109]
(pPIC3.5K/pPICZB)-His_6-**11β-HSD1**	dehydrogenase activity, S: 713 pmol/min/mg	CESP	[110]
(pPIC3.5K)-**MAOB**	ND	CESPCS (1.7 Å)	[111]
(pHIL-D2)-α_1/β_1	E: 30–50 pmol/mg	CE	[39]
(pPICZB)-**hOSC**-c-Myc-His_6	IC_{50} values, P: 105 mg/l	CESPC	[112]
(pHIL-D2)-α/His_{10}-β	E: 30 pmol/mg, 1 g/3 l	CESP	[40]

(*Continued*)

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 89 2/16/2011 11:42:26 AM

Table 3.3 (*Continued*)

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
Clorgyline-bound monoamine oxidase A MAOA	human	60	1	KM71
Cytochrome P450 2D6 monooxygenase CYP2D6/ NADPH P450 oxidoreductase CPR (coexpression)	human	56/77	1, 1	X-33
Adrenal cytochrome b_{561} Cytb561	bovine	28	5, 6	GS115
Cytochrome P450 *Pc*CYP1f	*Phanerochaete chrysosporium*	60	ND	KM71
Phospholemman (PLM)/ Na/K-ATPase (α_1, β_1) (coexpression)	human PLM, pig (α_1, β_1)	ND	1, 1, 1	SMD1165
Na/K-ATPase (α_1, β_1) (coexpression)	human, pig	ND	10, 1	SMD1165
Cytochrome P450 17α-hydroxylase CYP17	human	54	ND	GS115
Apo and GSH-complexed leukotriene C_4 synthase LTC4S	human	ND	4	KM71H
Na/K-ATPase (α_3, β_1) (coexpression)	pig	110/44	10, 1	GS115, SMD1168
Monoamine oxidase B MAOB	rat	60	1	KM71
Leukotriene C_4 synthase LTC4S	rat	18	4	KM71
Monoamine oxidase A MAOA	rat	60	1	KM71
Monoamine oxidase MAO	zebrafish	60	1	KM71
Other membrane proteins				
Thromboplastin, tissue factor TF	rabbit	31	1	GS115
Immunotoxin Cyt2Aa1 (codon-optimized)	*Bacillus thuringiensis*	60	1?	KM71
Lectin-like oxLDL receptor 1 hLOX-1	human	43	1?	GS115

UNCORRECTED PROOF

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pPIC3.5K)-**MAOA**	P: 115 mg/l	CESPCS (3 Å)	[113]
(pPICZA)-**CPR-CYP2D6**	E: 8.8 pmol/min/pmol enzyme	CE	[114]
(pPICZB)-**Cytb561**-His_6	S: 0.7 mg/l, P: 2.7 mg	CESP	[115]
(pPICZA)-**PcCYP1f**	ND	CE	[116]
(pHIL-D2)-α_1/His_{10}-β_1; (pGAPZA)-**PLM**	ATPase activity	CESP	[43]
(pHIL-D2)-α_1/His_{10}-β_1	S: 8–16 μmol/min/mg	CESP	[41]
(pPIC3.5K)-**CYP17**(His)	E: 300 pmol/mg	CES	[117]
(pPICZA)-His_6-**LTC4S**	ND	CESPCS (2, 2.15 Å)	[118]
(pAO815)-α_3/β_1	E: 0.23 mg/l	CESP	[42]
(pPIC3.5K)-**MAOB**	oxidase activity, P: 100 mg/0.5 l	CESP	[119]
(pPICZA)-His_6-**LTC4S**	P: 1 mg/l, 49 μmol/mg/min	CESPC	[120]
(pPIC3.5K)-**MAOA**	E: 700 U/l, P: 200 mg/l	CESP	[121]
(pPIC3.5K)-**zMAO**	P: 200 mg/l, 300 U/l	CESP	[122]
(pIL-D26)-PHO1-**TF**-His_6	P: 0.1 mg/g cells	CESP	[123]
(pPICZB)-CsFvC6.5-**synCyt2Aa1**-c-Myc-His_6	cytotoxic activity, P: 10 mg/l	CESP	[124]
(pPIC9K)-AF-**hLOX-1**-His_6	ND	CESP	[125]

(*Continued*)

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 91 2/16/2011 11:42:26 AM

Table 3.3 (*Continued*)

Protein name	Organism	kDa	Transmembrane domains	Strains
Metal-dependent hydrolase PAB0107	*Pyrococcus abyssi*	20–46	5	X-33
Chloride channel PAB2010			10	
Putative membrane protein PAB0965			3	
Fe^{3+} ABC protein PAB0677			9	
Carbohydrate transport protein PAB0724			9	
Tetraspanin hCD81	human	26	4	X-33, GS115
Peroxisomal membrane protein 22 PMP22	rat	22	4	SMD1163
Tetraspanin peripherin/RDS p/RDS	ND	37	4	KM71
Epidermal growth factor receptor 2 HER-2/*neu*	human	200	1	X-33

In the vector constructs column: His_6, His_8, His_{10}, hexa-, octa-, deca-istidine tag; AF, α factor secretion signal; CBP, calmodulin binding peptide; gly3, triglycine tag; strep, streptavidin tag; strepII, StrepII tag (MAWSHPQFEK); 1D4, 1D4 antibody recognition sequence (TETSQVAPA); HA, hemagglutinin A tag; c-Myc, C-terminal *myc* epitope (EQKLISEEDL); FLAG, FLAG tag; bio, biotin acceptor domain.
In the process column CESPCS: C, cloning; E, expression; S, solubilization; P, purification; C, cristallization; S, structure.
Other: ND, not determined.

Moreover, this list not only reports on expression evaluations in *P. pastoris* but also covers solubilization, purification, crystallization, and structural studies of membrane proteins produced with this system. Remarkably, high-resolution structures for a dozen of them were thus obtained (see CEPSCS-labeled references in Table 3.3), which represents about one-third of the recombinantly produced eukaryotic membrane proteins for which a three-dimensional structure is available as of January 2010 (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html). Overall, these records highlight *P. pastoris* as one of the most performant heterologous expression system for the structural studies of eukaryotic membrane proteins.

3.5.2
Common Trends for an Efficient Expression of Membrane Proteins in *P. pastoris*

The basic experimental data recorded in Table 3.3 are intended to give some general directions to help the reader in the choice of an adapted procedure to start with for his/her favorite membrane protein to be expressed in *P. pastoris*.

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 92 2/16/2011 11:42:26 AM

Vector constructs (plasmid backbone)	Activity	Process	Reference
(pPICZB/pPICZa) ± AF-**MP**-c-Myc-His_6	ND	CESP	[126]
(pPICZB)-**hCD81**-His_6	P: 1.75 mg/l	CESP	[127]
(pPICZA)-His_{10}-**PMP22**	P: 90 mg/4 l	CESP	[128]
(pPICZA)-**p/RDS**-c-Myc-His_6	P: 0.3 mg/l	CESP	[129]
(pPICZaA)-AF-**HER-2/*neu***-c-Myc-His	ND	CE	[130]

Regarding the plasmidic constructs to select, nearly all kinds of available expression vectors have been assayed, most exclusively based on the P_{AOX1} inducible promoter. To our knowledge, only three noticeable exceptions are reported on the use of vectors bearing the constitutive promoter P_{GAP} for the expression evaluation of membrane proteins, including the human intestinal peptide transporter hPEPT1 [51], the human phospholemman [43], and the rat vesicular glutamate transporter 1 VGLUT1 [65]. In all cases the expression levels were rather significant; however, no comparison was conducted on the benefit of such a constitutive expression over an inducible system.

Overall, no real tendency emerges in the choice of a given vector for a given type of membrane protein, except in the case of water channel proteins where pPICZ constructs were always privileged. Similarly, whereas a secretion sequence is quite systematically added upstream of GPCR open reading frames (ORFs) for an enhanced expression of functional proteins, there is no apparent rule for all the other reported membrane proteins whatever their topology and orientation in the membrane. In the case of the six-transmembrnae domain aquaporins, for instance, where N- and C-termini are intracellularly located, protein expression has been evaluated with or without a fused secretion sequence and both situations proved efficient enough to obtain high-resolution structures of the produced protein ([79] versus [72, 76, 80]).

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 93 2/16/2011 11:42:26 AM

As for several other expression systems, a large panel of tag sequences are frequently inserted to improve the downstream detection and purification steps, ranging from hexa- or decahistidine (the most widely employed tags), c-Myc, FLAG, HA and StrepII epitopes, to larger peptidic domains such as a biotinylation domain (bio), a calmodulin binding domain (CBD), or the fluorescent protein GFP. In addition, protease cleavage sequences are sometimes included in the constructs such as the Factor Xa or tobacco etch virus (TEV) sequences in order to eliminate the fused tags after or during [102] the purification step.

Nearly all commercially available strains have been used to express membrane proteins. While the criteria used for the choice of a given strain are generally not documented, few studies reported on the membrane protein-dependent differential behavior of strains – a phenomenon that is commonly observed. SMD1163, KM71, and X-33 indeed appeared more performant than GS115 for the expression of a GPCR [38], an ATP-binding cassette (ABC) transporter [49], and a tetraspanin [127], respectively, whereas GS115 performed better than SMD1168 for the recombinant expression of a serotonin transporter [20]. Alternatively, no real variation of the expression level could be observed when a GPCR, the μ-opioid receptor, was evaluated in the X-33, GS115, SMD1163, and SMD1168 strains [87].

In most of the reported studies, functional expression levels of membrane proteins are assessed through both specific immunodetection tests and activity assays. In the situation where these parameters can be compared, as in the particular case of GPCRs, the outcome highlights a very fluctuating performance of the system that not only depends on the expressed membrane protein, but also on the experimental conditions assayed. Therefore, optimization of the expression conditions is often very helpful for the recovery of higher amounts of functional recombinant membrane proteins. This is the issue of the next section that aims at illustrating how expression levels can be enhanced with GPCRs as model membrane proteins.

3.6 Guidelines for Optimizing Membrane Protein Expression in *P. pastoris* Using GPCRs as Models

From the seminal work of Weiss *et al.* [38], more than 30 original articles focusing on GPCR expression in *P. pastoris* have been published so far. This wealth of quantitative and qualitative information relative to hundreds of different receptors from the same membrane protein family represents an ideal source of data to exemplify the different directions that can be undertaken to enhance the expression levels of membrane proteins. Different experimental adjustments conducted in several of these studies indeed proved highly beneficial. They can be divided into two main categories that are detailed below: those allowing us to design and to select for the most performing clones, and those implemented at the level of growth and induction. In addition, some considerations on optimizing yeast cell lysis are also briefly discussed.

UNCORRECTED PROOFS

c03.indd 94 2/16/2011 11:42:27 AM

3.6.1
Design and Selection of Enhanced Expression Clones

As a general rule in heterologous expression studies, optimizing the coding sequence of the gene to be expressed is often very helpful. For instance, fitting the gene sequence to the codon usage of the host organism has generally shown a beneficial impact on expression levels (reviewed in [131]). In the case of GPCRs expressed in *P. pastoris*, a codon-optimized human β_2-adrenergic receptor (β_2AR) exhibited an activity of 6 pmol/mg in total membrane preparations [96] – a figure to be compared with the 24 pmol/mg functional receptors that were obtained for a nonoptimized human β_2AR expressed in a quite similar context [19]. This codon-optimization engineering of a GPCR thus did not appear really profitable, albeit this single reported approach may probably not be representative and more data are needed. Similarly, with the double goal of improving expression levels and receptor homogeneity, direct mutagenesis of potential *N*-glycosylated residues was evaluated on several GPCRs and revealed a rather average outcome: whereas the receptor homogeneity was generally enhanced, the specific activity of the receptors was lowered in most cases [22, 95], only few of them being improved [22, 84] or remaining unchanged [90]. Larger sequence modifications were also reported, showing important beneficial effects for a C-terminally truncated adenosine A_{2A} receptor [132] and for a 47-amino-acid deletion of an internal loop for an acetylcholine muscarinic receptor [22], but with no real impact on expression levels in the case of a N-terminal deletion of a μ-opioid receptor [103, 133].

Introducing additional fusion sequences may sometimes reveal a fruitful way to increase expression of GPCRs. Several studies notably compared the benefit of secretion signals added upstream the gene of interest, showing a very substantial effect of the signal sequence of the α-factor from *S. cerevisiae* on the expression levels of a serotonergic [38], an opioid [103, 133], and a dopaminergic [90] receptor. This signal sequence is since systematically inserted for GPCR expression.

Addition of short tag sequences including the hexa- or decahistidine, FLAG or the c-Myc regularly proved very useful for the downstream detection and/or purification procedures of GPCRs, but did not result in significant changes in their expression levels. Similarly, GFP fused to several GPCRs either C-terminally [85, 98, 99] or N-terminally [103, 104] did not markedly modify their expression profile. Instead, the GFP fusion appeared a useful multipurpose tool for (i) the selection of overexpressing clones, (ii) the determination of total recombinant protein expression, (iii) the evaluation of solubilization and purification conditions, and (iv) the subcellular localization of the receptors.

Interestingly, a significantly increased production level was observed when the biotinylation domain of the transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii* was fused to the C-terminus of several receptors. For instance, for 5-HT_{5A} [19], human ETB endothelin receptor (ETBR) [85], DRD2 [90], and β_2AR (C. Reinhart, personal communication) the number of active receptors per cell was more than doubled. In addition, the absence of this sequence from the GPCR constructs used in the study of Yurugi-Kobayashi *et al.* [22] probably participated to the lower expression

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 95 2/16/2011 11:42:27 AM

levels observed for several of them when compared to the same receptors bearing this biotinylation domain [97]. Addition of this domain likely stabilized the recombinant receptor either by protecting the receptor from direct degradation or maintaining folding fidelity to avoid the unfolded protein response.

Regarding the choice of the cellular host to use, several studies compared the benefit of one strain over the others. For instance, the receptors 5-HT_{5A} and ETA were respectively expressed at higher levels in the protease-deficient strains SMD1163 [38] and SMD1168 [134] than in the GS115 strain (see Table 3.1 for the description of the strains). Similarly, the strain SMD1168 appeared a most appropriate host for the expression of a CB2 receptor when compared to the strain X-33 [101]. In several other cases, however, no significant differences were observed, and strains from the SMD series were mainly retained because of their protease-deficient properties and their inherent lower impact on protein degradation during the downstream preparative steps.

In addition, since multicopy integration events occur with a relatively high frequency in *P. pastoris* transformants, gene dosage is also an important issue that directly impacts expression levels. For instance, a panel of clones resistant to increasing concentrations of zeocin [88] and G418 (geneticine) [19, 90] was selected for its representative content of integrated GPCR gene copy number. These studies and others show that the levels of active receptors increased correlatively with the number of integrated copies up to a plateau after which additional copies had no effect. Most importantly, from our observations (unpublished data), clones bearing the highest antibiotic resistance levels (i.e., the highest copy number of GPCRs genes) were often those presenting the highest amounts of immunodetected receptors, whereas ligand-binding activities were not improved. Such clones are thus generally not desired as they display a large proportion of nonfunctional receptors. Moreover, these observations strongly suggest that the bottleneck for the production of functional receptors lies in folding and/or post-translational processing rather than in the transcription and translation steps. As a consequence, clone selection procedures have to rely both on a representative phenotypic screening followed by an appropriate evaluation of the receptor quantity and activity.

3.6.2
Optimization of the Expression Conditions

Once the most performant clones have been selected, further improvements can be implemented by appropriately adjusting some of the experimental parameters that influence the host cell physiology, and hence its performance for heterologous gene expression, correct protein folding, and proper trafficking. These external factors include culture format and procedures, temperature and time of induction, cell densities, formulation of growth media, or supplementation with stabilizing compounds or chemical chaperones.

As a first step, evaluating the production time course of a GPCR is often very useful as the outcome may vary importantly from one receptor to another. For

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 96 2/16/2011 11:42:27 AM

instance, 10 h was determined as the optimal induction time for different constructs expressing a μ-opioid receptor [87], whereas the highest expression levels were obtained in the range of 18–24 h postinduction for a majority of other receptors and up to 60 h for an engineered ACM2 muscarinic receptor [22]. Similarly, while the induction phase in methanol-containing media is usually performed using cell densities of about 5×10^7 cells/ml (1 OD_{600}/ml), we observed that this parameter was differently affecting the expression level of GPCRs, higher cell densities (up to 10 OD_{600}/ml) being actually more appropriate for several of them (unpublished data).

Formulation of the induction media is also an important issue. Adjustments in the composition of buffered media, pH values, and methanol concentration usually did not bring major benefits in GPCR expression, and a typical induction is generally performed at pH 5–7 in buffered complex media containing 0.5% methanol. Much more substantial improvements, however, can be gained by supplementing these media with some small compounds that are believed to facilitate the folding and processing of the recombinant proteins. Among these molecules, dimethyl sulfoxide (DMSO) added in the induction medium remarkably increased the production yield of 16 out of 20 tested receptors up to 6-fold relative to standard conditions [94]. Similar effects were observed in other studies evaluating GPCR expression not only in the *P. pastoris* system [21, 100], but also using mammalian [21] or insect [135] cells hosts. The precise role of DMSO here is not clear, but it has been shown to dramatically alter the membrane properties of several organisms by increasing their permeability [136], thus possibly influencing the processes of membrane protein translocation. DMSO is also thought to act as a stabilizer of folding intermediates and has been already qualified a chemical chaperone [137]. In a comparable fashion, adding ligands specific to a given GPCR proved highly beneficial for a large majority of tested receptors [19, 90, 94]. In the case of a histaminergic H_2 receptor, the expression level was improved up to 7-fold in the presence of an antagonist compound, cimetidine, in the induction medium [94]. Such small molecules are considered pharmacological chaperones as they have been shown to selectivity promote the proper folding and trafficking of the targeted GPCR [137], therefore limiting the recurrent complications related to misfolding/aggregation and misfolding/degradation pathways.

In addition, it was shown in several studies that lowering temperature during expression to a typical range of 18–24 °C was optimal for various receptors, as measured by ligand binding [22, 87, 90, 94, 95]. Possible explanations for the temperature effect include slowing down protein production and not overloading the translocation machinery, protein processing, or intracellular trafficking. Lowering temperature has also been shown to reduce proteolytic activities and upregulate cold shock proteins such as chaperones.

As illustrated in a work we conducted on a selection of 20 GPCRs [94], adjusting these different parameters at the culturing level always turned out beneficial and every tested clones revealed higher ligand binding values (B_{max}) compared with the standard condition. Strikingly, eight out of these 20 receptors revealed high B_{max} values (above 20 pmol/mg) after optimization. In addition, we and others also

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 97 2/16/2011 11:42:27 AM

found that the amount of functional receptor (in terms of ligand binding) did not scale with the total amount of receptors evaluated either by immunodetection [94] or by fluorescence [88] measurements. Most importantly, the total amount of receptors was not changed after optimization while the total number of binding sites (B_{max}) was increased from 1.3- to more than 8-fold. These data are all in agreement with the concept that GPCRs are expressed in *P. pastoris* under a functional/nonfunctional equilibrium that can be modulated with the expression conditions that are used.

3.6.3
Yeast Cell Lysis

As a common trait of budding yeasts, *P. pastoris* possesses a thick protective cell wall that requires the use of aggressive disruption methods for the recovery and preparation of the membrane protein-containing fractions. The choice of a cell lysis method suited to *P. pastoris* cultured in various volumes and formats is therefore nontrivial, albeit very few studies report on this important issue [27]. We here indicate a selection of techniques and apparatus references that we and others found the most adapted to this key step.

Shearing-based methods involving microbeads are mostly preferred as they are very efficient, compatible with a broad range of sample volumes, and directly accessible to most of the standard-equipped labs. In the simplest and widest used mode, cells are violently shaken with 500-μm diameter beads in cold buffers using a basic vortex apparatus in cycles alternating shaking and ice-cooling phases ([38, 138] among others). In order to achieve more reliable and reproducible results, programmable equipment is recommended, such as the Tissue Lyser from Qiagen [132] or the FastPrep 24 from MP Biomedicals [102] that accommodate various sample volumes and formats (up to 50 ml), or the more sophisticated and expensive grinder series from Dyno Mills [85] that can operate using large volumes both in batch or continuous modes. In addition, pressure-based instruments have also proven efficient for the lysis of *P. pastoris* cells, and besides the well-known French pressure cell press stands a panel of cell disruptors from Constant Systems that can handle from 1 to 20 ml of batch samples and more than 500 ml/min with the continuous flow models. Alternatively, methods involving glucanase enzymes (e.g., helicase from snail digestive juice; zymolyase or lyticase from microbial sources) can be used to remove the cell wall and give rise to spheroplast preparations that can be easily burst. For cost and practical reasons, however, these methods are obviously not recommended for the lysis of large cell volumes.

Noteworthy, we and others commonly observed that the longer the induction phase, the less efficient the lysis step. This is likely to be related to the very dynamic nature of the cell wall that can adapt to various physiological changes in order to maintain the integrity of yeast cells and prevent them from lysis [139]. This issue is notably to be considered when optimizing the induction time, which should ideally strike a balance between expression level and cell lysis efficiency.

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 98 2/16/2011 11:42:27 AM

3.7
Conclusions and Future Directions

Overall, *P. pastoris* appears a very efficient heterologous system for the production of a large panel of membrane proteins. Importantly, a series of various optimizations including gene and vector sequence engineering, host strains, clone selection, culture format and procedures, temperature and time of induction, cell densities, formulation of growth media, and supplementation with stabilizing compounds or chemical chaperones, always prove very helpful for improving expression levels and protein functionality. As an exemplar illustration of such improvements, the functional expression level of a dopaminergic D_{2S} GPCR was increased from about 1000 receptors per cell for an unmodified receptor up to more than 50000 receptors per cell for an ultimate engineered αFD2SBio receptor [90].

Even if some general tips emerge, the outcome is, however, often a matter of membrane protein-dependent adjustments and successes still often rely on trial-and-error strategies. An improved success rate will certainly be obtained in the coming years with a more rationalized use of *P. pastoris*, taking advantage of recent breakthroughs. Very recently, the combination of proteomics and genetics brought some mechanistic insights into the biology of recombinant production of membrane proteins both in *E. coli* [140] and *S. cerevisiae* [141], and subsequently allowed the engineering of strains presenting a specific task-adapted physiology and enhanced production properties. Such strain evolution strategies have been already applied to *P. pastoris*, notably for the production of human glycoproteins in glyco-engineered strains [23]. They will be probably further exploited with the recent release of the whole-genome sequence of *P. pastoris* [9] that is now fully accessible to proteomic analyses and genetic manipulations.

Acknowledgments

The authors are supported by the CNRS and the University of Strasbourg, and by grants from the French National Research Agency (ANR-06-PCVI-0008 and ANR- 07-PCVI-0024).

Abbreviations

β_2AR	β_2-adrenergic receptor
ABC	ATP-binding cassette
CBD	calmodulin binding domain
DMSO	dimethyl sulfoxide
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
ORF	open reading frame
TEV	tobacco etch virus

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 99 2/16/2011 11:42:27 AM

References

1 Phaff, H.J. and Starmer, W.T. (1987) Yeasts associated with plants, insects and soil, in *The Yeasts, Volume 1: Biology of Yeasts*, 2nd edn (eds A.H. Rose and J.S. Harrison), Academic Press, Orlando, FL, pp. 123–180.

2 Guilliermond, C.H. (1919) Seances. *Mem. Soc. Biol.*, **82**, 466–470.

3 Ogata, K., Nishikawa, H., and Ohsugi, M. (1969) A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1519–1520.

4 Wegner, G.H. (1990) Emerging applications of methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, **7**, 279–284.

5 Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 45–66.

6 Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., and Harvey, L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, **22**, 249–270.

7 Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., and Mikata, K. (1995) The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 439–444.

8 Kurtzman, C.P. (2009) Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffi* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1435–1438.

9 De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y., and Callewaert, N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 561–569.

10 Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., and Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 329–332.

11 Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgünes, N., and Renugopalakrishnan, V. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **142**, 105–124.

12 Eckart, M.R. and Bussineau, C.M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**, 525–530.

13 Wheatley, M. and Hawtin, S.R. (1999) Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurence and role. *Hum. Reprod.*, **5**, 356–364.

14 Duvernay, M.T., Filipeanu, C.M., and Wu, G. (2005) The regulatory mechanisms of export trafficking of G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.*, **17**, 1457–1465.

15 Cohen, D.M. (2006) Regulation of TRP channels by *N*-linked glycosylation. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **17**, 630–637.

16 Grinna, L.S. and Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of *N*-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, **5**, 107–115.

17 Wood, M.J. and Komives, E.A. (1999) Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *J. Biomol. NMR*, **13**, 149–159.

18 Whittaker, M.M. and Whittaker, J.W. (2005) Construction and characterization of *Pichia pastoris* strains for labeling aromatic amino acids in recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.*, **41**, 266–274.

19 Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., and Reilander, H. (1998) Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse $5HT_{5A}$ 5-hydroxytryptamine receptor and the human β_2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.*, **330**, 1137–1147.

20 Tate, C.G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y., and Williams, D.C. (2003) Comparison

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 100 2/16/2011 11:42:27 AM

of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1160**, 141–153.

21 Shukla, A.K., Haase, W., Reinhart, C., and Michel, H. (2007) Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 931–942.

22 Yurugi-Kobayashi, T., Asada, H., Shiroishi, M., Shimamura, T., Funamoto, S., Katsuta, N., Ito, K., Sugawara, T., Tokuda, N., Tsujimoto, H., Murata, T., Nomura, N., Haga, K., Haga, T., Iwata, S., and Kobayashi, T. (2009) Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 271–276.

23 Hamilton, S.R. and Gerngross, T.U. (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 387–392.

24 Opekarova, M. and Tanner, W. (2003) Specific lipid requirements of membrane proteins–a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1610**, 11–22.

25 Lifshitz, Y., Petrovich, E., Haviv, H., Goldshleger, R., Tal, D.M., Garty, H., and Karlish, S.J.D. (2007) Purification of the human α2 isoform of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris*. Stabilization by lipids and FXYD1. *Biochemistry*, **46**, 14937–14950.

26 Marx, H., Sauer, M., Resina, D., Vai, M., Porro, D., Valero, F., Ferrer, P., and Mattanovich, D. (2006) Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **264**, 40–47.

27 Hopkins, T.R. (1991) Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. *Bioprocess Technol.*, **12**, 57–83.

28 Resina, D., Maurer, M., Cos, O., Arnau, C., Carnicer, M., Marx, H., Gasser, B., Valero, F., Mattanovich, D., and Ferrer, P. (2009) Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 396–403.

29 Daly, R. and Hearn, M.T.W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, **18**, 119–138.

30 Gellisen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 741–750.

31 Hartner, F.S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S.N., Hyka, P., Lin-Cereghino, G.P., Lin-Cereghino, J., Kovar, K., Cregg, J.M., and Glieder, A. (2008) Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e76.

32 Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y., and Madden, K.R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3376–3385.

33 Lee, C.C., Williams, T.G., Wong, D.W.S., and Robertson, G.H. (2005) An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. *Plasmid*, **54**, 80–85.

34 Hong, I.P., Lee, S.J., Kim, Y.S., and Choi, S.G. (2007) Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 73–78.

35 Sandstrom, A.G., Engstrom, K., Nyhlen, J., Kasrayan, A., and Backvall, J.E. (2009) Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomal replicating yeast plasmid. *Protein Eng. Des. Sel.*, **22**, 413–420.

36 Pla, I.A., Damasceno, L.M., Vannelli, T., Ritter, G., Batt, C.A., and Shuler, M.L. (2006) Evaluation of Mut^+ and Mut^S *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnol. Prog.*, **22**, 881–888.

37 Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., and Valero, F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

UNCORRECTED PROOF

under different promoters: a review. *Microb. Cell Fact.*, **5**, 17.

38 Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., and Reilander, H. (1995) Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.*, **377**, 451–456.

39 Strugatsky, D., Gottschalk, K.E., Goldshleger, R., Bibi, E., and Karlish, S.J.D. (2003) Expression of Na^+, K^+-ATPase in *Pichia pastoris*: analysis of wild type and D369N mutant proteins by Fe^{2+}-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46064–46073.

40 Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D.M., Ebel, C., Le Maire, M., and Karlish, S.J.D. (2005) Purification of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid–protein interactions. *J. Biol. Chem.*, **280**, 16610–16618.

41 Haviv, H., Cohen, E., Lifshitz, Y., Tal, D.M., Goldshleger, R., and Karlish, S.J.D. (2007) Stabilization of Na^+,K^+-ATPase purified from *Pichia pastoris* membranes by specific interactions with lipids. *Biochemistry*, **46**, 12855–12867.

42 Reina, C., Padoani, G., Carotti, C., Merico, A., Tripodi, G., Ferrari, P., and Popolo, L. (2007) Expression of the α3/β1 isoform of human Na,K-ATPase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.*, **7**, 585–594.

43 Lifshitz, Y., Lindzen, M., Garty, H., and Karlish, S.J.D. (2006) Functional interactions of phospholemman (PLM) (FXYD1) with Na^+, K^+-ATPase: Purification of α1/β1/PLM complexes expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 15790–15799.

44 Parcej, D.N. and Eckhardt-Strelau, L. (2003) Structural characterization of neuronal voltage-sensitive K^+ channels heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *J. Mol. Biol.*, **333**, 103–116.

45 Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K^+ channel. *Science*, **309**, 897–903.

46 Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, **450**, 376–382.

47 Julien, M., Kajiji, S., Kaback, R.H., and Gros, P. (2000) Simple purification of highly active biotinylated P-glycoprotein: enantiomer-specific modulation of drug-stimulated ATPase activity. *Biochemistry*, **39**, 75–85.

48 Urbatsch, I.L., Gimi, K., Wilke-Mounts, S., and Senior, A.E. (2000) Conserved Walker A Ser residues in the catalytic sites of P-glycoprotein are critical for catalysis and involved primarily at the transition state step. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25031–25038.

49 Cai, J., Daoud, R., Georges, E., and Gros, P. (2001) Functional expression of multidrug resistance protein 1 in *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, **40**, 8307–8316.

50 Chiou, T.J., Liu, H., and Harrison, M.J. (2001) The spatial expression patterns of a phosphate transporter (*Mt*PT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant J.*, **25**, 281–293.

51 Theis, S., Doring, F., and Daniel, H. (2001) Expression of the Myc/His-tagged human peptide transporter hPEPT1 in yeast for protein purification and functional analysis. *Protein Expr. Purif.*, **22**, 436–442.

52 Urbatsch, I.L., Wilke-Mounts, S., Gimi, K., and Senior, A.E. (2001) Purification and characterization of *N*-glycosylation mutant mouse and human P-glycoproteins expressed in *Pichia pastoris* cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **388**, 171–177.

53 Urbatsch, I.L., Gimi, K., Wilke-Mounts, S., Lerner-Marmarosh, N., Rousseau, M.E., Gros, P., and Senior, A.E. (2001) Cysteines 431 and 1074 are responsible for inhibitory disulfide cross-linking between the two nucleotide-binding sites in human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26980–26987.

54 Zhang, H., Howard, E.M., and Roepe, P.D. (2002) Analysis of the antimalarial drug resistance protein Pfcrt expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*, **277**, 49767–49775.

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 102 2/16/2011 11:42:27 AM

55 Urbatsch, I.L., Tyndall, G.A., Tombline, G., and Senior, A.E. (2003) P-glycoprotein catalytic mechanism, studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J. Biol. Chem.*, **278**, 23171–23179.

56 Mao, Q., Conseil, G., Gupta, A., Cole, S.P.C., and Unadkat, J.D. (2004) Functional expression of the human breast cancer resistance protein in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 730–737.

57 Tyagi, N.K., Goyal, P., Kumar, A., Pandey, D., Siess, W., and Kinne, R.K.H. (2005) High-yield functional expression of human sodium/D-glucose cotransporter 1 in *Pichia pastoris* and characterization of ligand-induced conformational changes as studied by tryptophan fluorescence. *Biochemistry*, **44**, 15514–15524.

58 Aller, S.G. and Unger, V.M. (2006) Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3627–3632.

59 Diatloff, E., Forde, B.G., and Roberts, S.K. (2006) Expression and transport characterisation of the wheat low-affinity cation transporter (LCT1) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 807–813.

60 Tan, W., Gou, D.M., Tai, E., Zhao, Y.Z., and Chow, L.M.C. (2006) Functional reconstitution of purified chloroquine resistance membrane transporter expressed in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **452**, 119–128.

61 Tombline, G., Urbatsch, I.L., Virk, N., Muharemagic, A., Bartholomew White, L., and Senior, A.E. (2006) Expression, purification, and characterization of cysteine-free mouse P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**, 124–128.

62 Amoah, L.E., Lekostaj, J.K., and Roepe, P.D. (2007) Heterologous expression and ATPase activity of mutant versus wild type PfMDR1 protein. *Biochemistry*, **46**, 6060–6073.

63 Chloupková, M., Pickert, A., Lee, J.Y., Souza, S., Trinh, Y.T., Connelly, S.M., Dumont, M.E., Dean, M., and Urbatsch, I.L. (2007) Expression of 25 human ABC transporters in the yeast *Pichia pastoris* and characterization of the purified ABCC3 ATPase activity. *Biochemistry*, **46**, 7992–8003.

64 Price, D.R.G., Wilkinson, H.S., and Gatehouse, J.A. (2007) Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NlHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 1138–1148.

65 Cox, H.D., Chao, C.K., Patel, S.A., and Thompson, C.M. (2008) Efficient digestion and mass spectral analysis of vesicular glutamate transporter 1: a recombinant membrane protein expressed in yeast. *J. Proteome Res.*, **7**, 570–578.

66 Alisio, A. and Mueckler, M. (2010) Purification and characterization of mammalian glucose transporters expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **70**, 81–87.

67 Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., and Chang, G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, **323**, 1718–1722.

68 Beckham, K.S.H., Potter, J.A., and Unkles, S.E. (2010) Formate-nitrite transporters: optimisation of expression, purification and analysis of prokaryotic and eukaryotic representatives. *Protein Expr. Purif.*, **71**, 184–189.

69 Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjovall, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A., and Kjellbom, P. (2003) Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.*, **537**, 68–72.

70 Kukulski, W., Schenk, A.D., Johanson, U., Braun, T., de Groot, B.L., Fotiadis, D., Kjellbom, P., and Engel, A. (2005) The 5 Å structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J. Mol. Biol.*, **350**, 611–616.

71 Daniels, M.J., Wood, M.R., and Yeager, M. (2006) *In vivo* functional assay of a recombinant aquaporin in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1507–1514.

UNCORRECTED PROOF

72 Tornroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., and Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, **439**, 688–694.

73 Eifler, N., Duckely, M., Sumanovski, L.T., Egan, T.M., Oksche, A., Konopka, J.B., Luthi, A., Engel, A., and Werten, P.J.L. (2007) Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *J. Struct. Biol.*, **159**, 179–193.

74 Nyblom, M., Oberg, F., Lindkvist-Petersson, K., Hallgren, K., Findlay, H., Wikstrom, J., Karlsson, A., Hansson, O., Booth, P.J., Bill, R.M., Neutze, R., and Hedfalk, K. (2007) Exceptional overproduction of a functional human membrane protein. *Protein Expr. Purif.*, **56**, 110–120.

75 Hedfalk, K., Pettersson, N., Oberg, F., Hohmann, S., and Gordon, E. (2008) Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expr. Purif.*, **59**, 69–78.

76 Horsefield, R., Nordén, K., Fellert, M., Backmark, A., Tornroth-Horsefield, S., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kvassman, J., Kjellbom, P., Johanson, U., and Neutze, R. (2008) High-resolution X-ray structure of human aquaporin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13327–13332.

77 Verdoucq, L., Grondin, A., and Maurel, C. (2008) Structure–function analysis of plant aquaporin *At*PIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem. J.*, **15**, 409–416.

78 Azad, A.K., Sawa, Y., Ishikawa, T., and Shibata, H. (2009) Heterologous expression of tulip petal plasma membrane aquaporins in *Pichia pastoris* for water channel analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2792–2797.

79 Fischer, G., Kosinska-Eriksson, U., Aponte-Santamaria, C., Palmgren, M., Geijer, C., Hedfalk, K., Hohmann, S., de Groot, B.L., Neutze, R., and Lindkvist-Petersson, K. (2009) Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 Å reveals a novel gating mechanism. *PLOS Biol.*, **7**, e1000130.

80 Ho, J.D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W.E.C., Robbins, R.A., Miercke, L.J.W., and Stroud, R.M. (2009) Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7437–7442.

81 Öberg, F., Ekvall, M., Nyblom, M., Backmark, A., Neutze, R., and Hedfalk, K. (2009) Insight into factors directing high production of eukaryotic membrane proteins; production of 13 human AQPs in *Pichia pastoris*. *Mol. Membr. Biol.*, **26**, 215–227.

82 Licata, L., Haase, W., Eckhardt-Strelau, L., and Parcej, D.N. (2006) Over-expression of a mammalian small conductance calcium-activated K^+ channel in *Pichia pastoris*: effects of trafficking signals and subunit fusions. *Protein Expr. Purif.*, **47**, 171–178.

83 Tao, X., Avalos, J.L., Chen, J., and MacKinnon, R. (2009) Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K^+ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science*, **326**, 1668–1674.

84 Schiller, H., Haase, W., Molsberger, E., Janssen, P., Michel, H., and Reilander, H. (2000) The human ETB endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* shows high-affinity binding and induction of stacked membranes. *Receptors Channels*, **7**, 93–107.

85 Schiller, H., Molsberger, E., Janssen, P., Michel, H., and Reilander, H. (2001) Solubilization and purification of the human ETB endothelin receptor produced by high-level fermentation in *Pichia pastoris*. *Receptors Channels*, **7**, 453–569.

86 Feng, W., Cai, J., Pierce, W.M., Jr, and Song, Z.H. (2002) Expression of CB2 cannabinoid receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **26**, 496–505.

87 Sarramegna, V., Demange, P., Milon, A., and Talmont, F. (2002) Optimizing functional versus total expression of the human μ-opioid receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **24**, 212–220.

88 Sarramegna, V., Talmont, F., Seree de Roch, M., Milon, A., and Demange, P. (2002) Green fluorescent protein as a reporter of human μ-opioid receptor

UNCORRECTED PROOF

c03.indd 104 2/16/2011 11:42:27 AM

overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **99**, 23–39.

89 De Jong, L.A.A., Grunewald, S., Franke, J.P., Uges, D.R.A., and Bischoff, R. (2004) Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **33**, 176–184.

90 Grunewald, S., Haase, W., Molsberger, E., Michel, H., and Reilander, H. (2004) Production of the human D2S receptor in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *Receptors Channels*, **10**, 37–50.

91 De Rivoyre, M., Bonino, F., Ruel, L., Bidet, M., Thérond, P., and Mus-Veteau, I. (2005) Human receptor Smoothened, a mediator of Hedgehog signalling, expressed in its native conformation in yeast. *FEBS Lett.*, **579**, 1529–1533.

92 Kim, T.K., Zhang, R., Feng, W., Cai, J., Pierce, W., and Song, Z.H. (2005) Expression and characterization of human CB1 cannabinoid receptor in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **40**, 60–70.

93 Sarramegna, V., Muller, I., Mousseau, G., Froment, C., Monsarrat, B., Milon, A., and Talmont, F. (2005) Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **43**, 85–93.

94 André, N., Cherouati, N., Prual, C., Steffan, T., Zeder-Lutz, G., Magnin, T., Pattus, F., Michel, H., Wagner, R., and Reinhart, C. (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.*, **15**, 1115–1126.

95 Fraser, N.J. (2006) Expression and functional purification of a glycosylation deficient version of the human adenosine 2a receptor for structural studies. *Protein Expr. Purif.*, **49**, 129–137.

96 Noguchi, S. and Satow, Y. (2006) Purification of human β2-adrenergic receptor expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.*, **140**, 799–804.

97 Lundstrom, K., Wagner, R., Reinhart, C., Desmyter, A., Cherouati, N., Magnin, T., Zeder-Lutz, G., Courtot, M., Prual, C., André, N., Hassaine, G., Michel, H., Cambillau, C., and Pattus, F. (2006) Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems. *J. Struct. Funct. Genomics*, **7**, 77–91.

98 Yang, G., Liu, T., Peng, W., Sun, X., Zhang, H., Wu, C., and Shen, D. (2006) Expression and localization of recombinant human EDG-1 receptors in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1581–1586.

99 Yang, G.X., Liu, T.L., Zhang, H., Wu, C.Q., and Shen, D.L. (2006) Expression and localization of recombinant human B2 receptors in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Genetika*, **42**, 728–731.

100 Shukla, A.K., Haase, W., Reinhart, C., and Michel, H. (2007) Heterologous expression and characterization of the recombinant bradykinin B2 receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **55**, 1–8.

101 Zhang, R., Kim, T.K., Qiao, Z.H., Cai, J., Pierce, Jr, W.M., and Song, Z.H. (2007) Biochemical and mass spectrometric characterization of the human CB2 cannabinoid receptor expressed in *Pichia pastoris*–importance of correct processing of the N-terminus. *Protein Expr. Purif.*, **55**, 225–235.

102 Magnin, T., Fiez-Vandal, C., Potier, N., Coquard, A., Leray, I., Steffan, T., Logez, C., Alkhalfioui, F., Pattus, F., and Wagner, R. (2008) A novel, generic and effective method for the rapid purification of G protein-coupled receptors. *Protein Expr. Purif.*, **64**, 1–7.

103 Muller, I., Sarramégna, V., Milon, A., and Talmont, F.J. (2010) The N-terminal end truncated mu-opioid receptor: from expression to circular dichroism analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 2175–2186.

104 Talmont, F. (2009) Monitoring the human β1, β2, β3 adrenergic receptors expression and purification in *Pichia pastoris* using the fluorescence properties of the enhanced green fluorescent protein. *Biotechnol. Lett.*, **31**, 49–55.

105 Hori, H., Sato, Y., Takahashi, N., Takio, K., Yokomizo, T., Nakamura, M.,

UNCORRECTED PROOF

Shimizu, T., and Miyano, M. (2010) Expression, purification and characterization of leukotriene B_4 receptor, BLT1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **72**, 66–74.

106 Blum, A., Martin, H.J., and Maser, E. (2000) Human 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1/carbonylreductase: recombinant expression in the yeast *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Toxicology*, **144**, 113–120.

107 Newton-Vinson, P., Hubalek, F., and Edmondson, D.E. (2000) High-level expression of human liver monoamine oxidase B in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **20**, 334–345.

108 Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D.E., and Mattevi, A. (2002) Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 22–26.

109 Li, M., Hubalek, F., Newton-Vinson, P., and Edmondson, D.E. (2002) High-level expression of human liver monoamine oxidase A in *Pichia pastoris*: comparison with the enzyme expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.*, **24**, 152–162.

110 Nobel, C.S.I., Dunas, F., and Abrahmsén, L.B. (2002) Purification of full-length recombinant human and rat type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenases with retained oxidoreductase activities. *Protein Expr. Purif.*, **26**, 349–356.

111 Binda, C., Li, M., Hubalek, F., Restelli, N., Edmondson, D.E., and Mattevi, A. (2003) Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9750–9755.

112 Ruf, A., Muller, F., D'Arcy, B., Stihle, M., Kusznir, E., Handschin, C., Morand, O.H., and Thoma, R. (2004) The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 247–254.

113 De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D.E., and Mattevi, A. (2005) Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12684–12689.

114 Dietrich, M., Grundmann, L., Kurr, K., Valinotto, L., Saussele, T., Schmid, R.D., and Lange, S. (2005) Recombinant production of human microsomal cytochrome P450 2D6 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *ChemBioChem.*, **6**, 2014–2022.

115 Liu, W., Kamensky, Y., Kakkar, R., Foley, E., Kulmacz, R.J., and Palmer, G. (2005) Purification and characterization of bovine adrenal cytochrome b_{561} expressed in insect and yeast cell systems. *Protein Expr. Purif.*, **40**, 429–439.

116 Matsuzaki, F. and Wariishi, H. (2005) Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1184–1190.

117 Kolar, N.W., Swart, A.C., Mason, J.I., and Swart, P. (2007) Functional expression and characterisation of human cytochrome P45017α in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **129**, 635–644.

118 Martinez Molina, D., Wetterholm, A., Kohl, A., McCarthy, A.A., Niegowski, D., Ohlson, E., Hammarberg, T., Eshaghi, S., Haeggstrom, J.Z., and Nordlund, P. (2007) Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C_4 synthase. *Nature*, **448**, 613–617.

119 Upadhyay, A.K. and Edmondson, D.E. (2008) Characterization of detergent purified recombinant rat liver monoamine oxidase B expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **59**, 349–356.

120 Wetterholm, A., Martinez Molina, D., Nordlund, P., Eshaghi, S., and Haeggström, J.Z. (2008) High-level expression, purification, and crystallization of recombinant rat leukotriene C_4 synthase from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **60**, 1–6.

121 Wang, J. and Edmondson, D.E. (2010) High-level expression and purification of

UNCORRECTED PROOF

rat monoamine oxidase A (MAO A) in *Pichia pastoris* : comparison with human MAO A. *Protein Expr. Purif.*, **70**, 211–217.

122 Arslan, B.K. and Edmondson, D.E. (2010) Expression of zebrafish (*Danio rerio*) monoamine oxidase (MAO) in *Pichia pastoris*: purification and comparison with human MAO A and MAO B. *Protein Expr. Purif.*, **70**, 290–297.

123 Brucato, C.L., Birr, C.A., Bruguera, P., Ruiz, J.A., and Sanchez-Martınez, D. (2002) Expression of recombinant rabbit tissue factor in *Pichia pastoris*, and its application in a prothrombin time reagent. *Protein Expr. Purif.*, **26**, 386–393.

124 Gurkan, C. and Ellar, D.J. (2003) Expression in *Pichia pastoris* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin. *Protein Expr. Purif.*, **29**, 103–116.

125 Huang, Z., Zhang, T., Yang, J., Zhu, P., Du, G., and Cheng, K. (2005) Cloning and expression of human lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 49–52.

126 Labarre, C., Van Tilbeurgh, H., and Blondeau, K. (2007) *Pichia pastoris* is a valuable host for the expression of genes encoding membrane proteins from the hyperthermophilic Archeon *Pyrococcus abyssi*. *Extremophiles*, **11**, 403–413.

127 Jamshad, M., Rajesh, S., Stamataki, Z., McKeating, J.A., Dafforn, T., Overduin, M., and Bill, R.M. (2008) Structural characterization of recombinant human CD81 produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **57**, 206–216.

128 Egawa, K., Shibata, H., Yamashita, S., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, H. (2009) Overexpression and purification of rat peroxisomal membrane protein 22, PMP22, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **64**, 47–54.

129 Vos, W.L., Vaughan, S., Lall, P.Y., McCaffrey, J.G., Wysocka-Kapcinska, M., and Findlay, J.B.C. (2010) Expression and structural characterization of peripherin/RDS, a membrane protein implicated in photoreceptor outer segment morphology. *Eur. Biophys. J.*, **39**, 679–688.

130 Vlahopoulos, S., Gritzapis, A.D., Perez, S.A., Cacoullos, N., Papamichail, M., and Baxevanis, C.N. (2009) Mannose addition by yeast *Pichia Pastoris* on recombinant HER-2 protein inhibits recognition by the monoclonal antibody herceptin. *Vaccine*, **27**, 4704–4708.

131 Gustafsson, C., Govindarajan, S., and Minshull, J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.*, **22**, 346–353.

132 Singh, S., Gras, A., Fiez-Vandal, C., Ruprecht, J., Rana, R., Martinez, M., Strange, P.G., Wagner, R., and Byrne, B. (2008) Large-scale functional expression of WT and truncated human adenosine A_{2A} receptor in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb. Cell Fact.*, **7**, 28.

133 Talmont, F., Sidobre, S., Demange, P., Milon, A., and Emorine, L.J. (1996) Expression and pharmacological characterization of the human mu opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.*, **394**, 268–272.

134 Cid, G.M., Nugent, P.G., Davenport, A.P., Kuc, R.E., and Wallace, B.A. (2000) Expression and characterization of the human endothelin-A-receptor in *Pichia pastoris*: influence of N-terminal epitope tags. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, S55–S57.

135 Brillet, K., Perret, B.G., Klein, V., Pattus, F., and Wagner, R. (2008) Using EGFP fusions to monitor the functional expression of GPCRs in the *Drosophila* Schneider 2 cells. *Cytotechnology*, **57**, 101–109.

136 Yu, Z.W. and Quinn, P.J. (1994) Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci. Rep.*, **14**, 259–281.

137 Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D.G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.*, **15**, 222–228.

138 Zeder-Lutz, G., Cherouati, N., Reinhart, C., Pattus, F., and Wagner, R. (2006) Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate

UNCORRECTED PROOF

recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **50**, 118–127.

139 Aguilar-Uscanga, B. and François, J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**, 268–274.

140 Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K.J., Slotboom, D.J., Persson, J.O., and de Gier, J.W. (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14371–14376.

141 Bonander, N., Darby, R.A., Grgic, L., Bora, N., Wen, J., Brogna, S., Poyner, D.R., O'Neill, M.A., and Bill, R.M. (2009) Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. *Microb. Cell. Fact.*, **8**, 10.

142 Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D., and Villaverde, A. (2008) Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.*, **7**, 11.

6

UNCORRECTED PROOF

M

Keywords/Abstract

Dear Author,

Keywords and abstracts will not be included in the print version of your chapter but only in the online version.

Please check and/or supply keywords. If you supplied an abstract with the manuscript, please check the typeset version.

If you did not provide an abstract, the section headings will be displayed instead of an abstract text in the online version.

Keywords:
yeast; membrane protein; recombinant expression; methanol utilization; cell lysis

Abstract:
Among the most widespread, popular, effective, and inexpensive microorganisms developed for heterologous expression, *Pichia pastoris* has become a system of choice not only for the production of cytosoluble and industrially relevant proteins, but also for a growing panel of eukaryotic membrane proteins expressed at levels compatible with structural studies. Up to now indeed, more than 150 different representative membrane proteins have been expressed in *P. pastoris* and led to acquiring of high-resolution structures for a dozen of them, making *P. pastoris* one of the most performant heterologous expression system for the structural studies of eukaryotic membrane proteins. This chapter gives a global overview on (i) how the *P. pastoris* system basically operates, (ii) how it performs for the recombinant expression of membrane proteins, and (iii) the different strategies and tips that can be applied to improve the system.

UNCORRECTED PROOF

M

c03.indd 1 2/16/2011 11:42:28 AM

Publication 2 :

Logez C., Alkhalfioui F., Byrne B. and Wagner R. (2012).
"Preparation of Pichia pastoris expression plasmids."
Methods Mol Biol 866: 25-40.

Chapter 3

Preparation of *Pichia pastoris* Expression Plasmids

Christel Logez, Fatima Alkhalfioui, Bernadette Byrne, and Renaud Wagner

Abstract

When planning any heterologous expression experiment, the very first critical step is related to the design of the overall strategy, hence to the selection of the most adapted expression vector. The very flexible *Pichia pastoris* system offers a broad range of possibilities for the production of secreted, endogenous or membrane proteins thanks to a combination of various plasmid backbones, selection markers, promoters and fusion sequences introduced into dedicated host strains. The present chapter provides some guidelines on the choice of expression vectors and expression strategies. It also brings the reader a complete toolbox from which plasmids and fusion sequences can be picked and assembled to set up appropriate expression vectors. Finally, it provides standard starting protocols for the preparation of the selected plasmids and their use for host strain transformation.

Key words: Plasmid, Expression, Purification/detection tag, Promoter, *Pichia pastoris* cell strains

1. Introduction

Hundreds of proteins of various types, origins and functions have been produced in *Pichia pastoris* for many purposes and applications. Conveniently, a large set of representative examples have been listed in authoritative reviews and can advantageously serve the reader as points of reference (1–4). In these numerous studies, high yields are very often dependent on several parameters including the choice of the expression vector, the optimal gene sequence, the nature and site of insertion of any fusion tags, and the transformation and selection strategies. Thus, while no standards exist to predict which combination will enable the successful production of a given protein, we instead propose the following steps that may help in determining the appropriate tools and methods to start with, and where to find them.

Roslyn M. Bill (ed.), *Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 866, DOI 10.1007/978-1-61779-770-5_3, © Springer Science+Business Media, LLC 2012

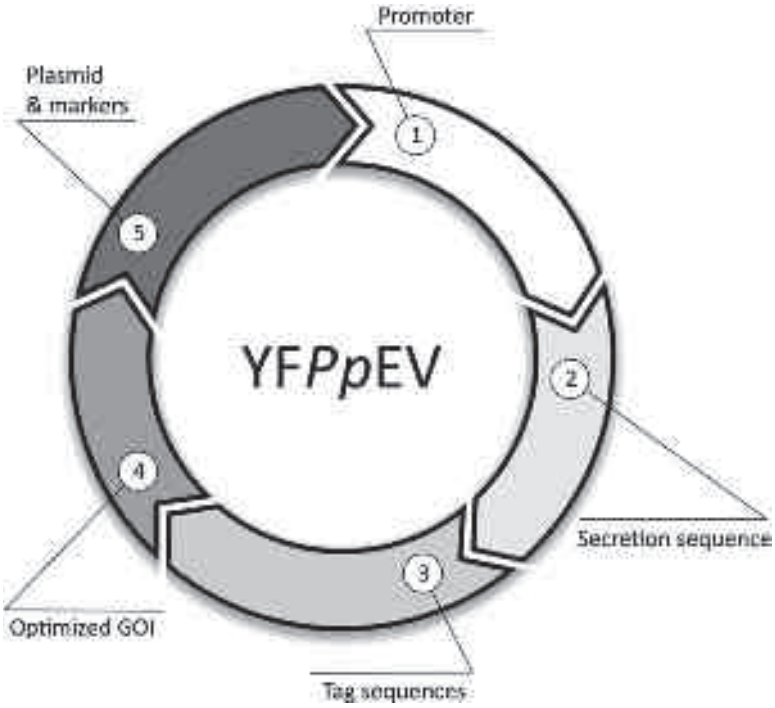


Fig. 1. Your Favourite *P. pastoris* Expression Vector (YF*Pp*EV). The five different boxes represent the main elements that must be considered when building an expression vector. *GOI* gene of interest.

1.1. What Plasmid to Select?

Except for a limited number of autoreplicative plasmids that are not yet frequently employed (5–8), the usual expression vectors are designed to be maintained as integrative elements in the genome of *P. pastoris* (see Subheading 1.6. below). They are built on a classical *E. coli*/yeast shuttle model with components required for *E. coli* amplification (classically one origin of replication and one antibiotic selection marker) and specific elements for heterologous gene expression in *P. pastoris*. These typically include selectable auxotrophy markers and/or antibiotic-resistance bacterial genes, a range of promoter and terminator sequences, a cloning cassette and supplementary fusion sequences that can be added for improving the secretion, detection and purification of the recombinant proteins. Each is schematically represented as a building block in Fig. 1, and these are further discussed in the following sections.

1.2. What Promoter to Use?

P. pastoris harbours several strong or weaker promoters that can be exploited to drive heterologous expression of recombinant genes, both in an inducible or constitutive fashion (see Table 1). Inducible expression is usually the preferred strategy since it allows a convenient control of the experimental conditions applied before expression and is ideally adapted for the production of proteins that are toxic to the host. *P. pastoris* offers a panel of promoters that can be induced in the presence of various carbon or nitrogen sources (9),

Table 1
***P. pastoris* promoters for recombinant expression**

Name	Original gene	Nature *(expression condition)*	Strength	References
P_{AOX1}	Alcohol oxidase I	Inducible (*methanol*)	Strong	(29)
P_{AOX2}	Alcohol oxidase II	Inducible (*methanol*)	Strong	(30)
P_{GAP}	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Constitutive (*glucose*, *glycerol*)	Strong	(31)
P_{FLD1}	Formaldehyde dehydrogenase	Inducible (*methanol*, *methylamine*)	Strong	(32)
P_{DHAS}	Dihydroxyacetone synthase	Inducible (*methanol*)	Weak	(33)
P_{ICL}	Isocitrate lyase	Inducible (*ethanol*)	Not determined	(34)
P_{YPT1}	GTP-binding protein	Constitutive (*glucose*, *methanol*, *mannitol*)	Weak	(35)
P_{TEF1}	Translation elongation factor 1α	Constitutive (*glucose*)	Strong	(36)
P_{PHO89}	Sodium phosphate symporter	Inducible (*phosphate starvation*)	Strong	(37)
P_{PEX8}	Peroxisomal matrix protein	Inducible (*methanol*)	Weak	(38)

the promoter P_{AOX1} from the alcohol oxidase encoding gene (*AOX1*) being predominantly employed. This promoter is tightly repressed by glucose and strongly induced by methanol (10) allowing the cells to use methanol as the sole carbon source. A P_{AOX1} synthetic promoter library was recently developed revealing enhanced P_{AOX1} variants that resulted in high levels of a recombinant GFP (11). There are numerous cases, however, where constitutive expression performs as well as inducible expression, in particular when using the strong glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase P_{GAP} promoter (9, 12). In addition, constitutive expression is more straightforward to manage since no switch of carbon source is required, which is particularly convenient when running fermentation procedures.

1.3. Do I Need a Secretion Signal?

This is a non-trivial question since the choice of intracellular or extracellular localisation can have a direct impact both on yield and integrity of the recombinant protein, as well as on the procedures required for isolation. Secreting the recombinant proteins outside the cell has several advantages: soluble protein production may be

Table 2
Signal sequences used for extracellular expression

Name	Protein signal sequence	Sequence structure	References
α factor	*S. cerevisiae* α mating factor	85 residues 3 N-glycosylation sites Kex2/Ste13 processing sites	(39)
PHO1	*P. pastoris* acid phosphatase	15 residues 6 N-glycosylation sites	(40)
SUC2	*P. pastoris* invertase	19 residues	(39, 41)
PHA-E	*Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin	21 residues	(42)
KILM1	Killer toxin type I	44 residues	(42)
pGKL	128-kDa killer protein	29 residues Kex2 processing site	(43, 44)
CLY	Chicken lysozyme signal peptide	18 residues	(45)
CLY-L8	Engineered leucine-rich signal peptide	16 residues	(45)

induced for longer periods of time since they are not accumulating in the limited volume of the cytoplasm where they might become toxic for the host. This can lead to an increased recombinant yield. Furthermore, no cell-lysis step is required and secreted proteins can be recovered directly from the culture medium, which contains far fewer contaminating proteins than the cells therefore simplifying the purification process. One limitation is the frequent degradation of the secreted proteins by extracellular proteases and proteases released from lysed cells. In addition, proteins that are not naturally secreted may not be properly folded outside the cell. In this regard, intracellular production is a valuable alternative (13, 14).

When opting for a secretion strategy, the target protein needs to be identified as secreted by the presence of a signal sequence (see Table 2). Successful secretion of many proteins from *P. pastoris* has been reported using a range of different signal sequences. These include a protein's native secretion signal, the *Saccharomyces cerevisiae* α-mating factor prepro leader sequence (α-MF), the *P. pastoris* acid phosphatase (*PHO1*) signal sequence and the invertase (*SUC2*) signal sequence (see ref. 1 for an extensive list). Further information on the range and use of prepro peptides can be found in ref. (15) and this may provide a useful resource for selecting a signal sequence.

In the case of integral membrane proteins, adding a secretion sequence may be highly beneficial for expression in *P. pastoris*. Such an approach has proved highly effective for the production of GPCRs (16, 17). However, the presence of the signal sequence has variable effects on the expression of other membrane protein-encoding genes. In the case of aquaporins for instance, where the

amino- and carboxy-termini are both located intracellularly, protein production has been evaluated with or without a fused signal sequence. In both cases high yields of high-quality protein suitable for structural studies were obtained (18, 19).

1.4. What Kind of Additional Sequences Do I Need?

Whatever the objectives to be achieved when producing a protein with *P. pastoris* (biochemical and/or biophysical characterisation, structural studies, pharmaceutical or food production), recovering the protein in its most native form is generally mandatory. There are many examples of expression and subsequent isolation of untagged proteins requiring development of specific and often tedious purification procedures. Alternatively, adding epitope tags allows detection, and isolation of the target protein using generic techniques and tools. An ideal tag should not only (1) exert a minimal effect on the tertiary structure and the biological activity of the protein it is fused to but should also (2) allow a one-step adsorption purification, (3) be easily and specifically removed to produce the native protein and (4) be applicable to a number of different proteins. While it is difficult to decide on the best fusion sequence and position to be used for a specific protein, we present in Table 3 a list of tags and protease cleavage sites to release them that have proven helpful for the production of proteins in *P. pastoris* (20).

1.5. How Can I Optimise the Sequence of My Protein-Encoding Gene?

Even if recombinant genes are most often cloned and expressed in their native form, several adjustments in their sequence can be made to best fit the transcription and translation machineries of the yeast and very often result in dramatic improvement of the protein yields. The sequence parameters that were notably shown to positively influence the expression levels include (1) an optimal translation initiation sequence (the yeast consensus is A/YAA/UAAUGUCU), (2) an adaptation to the codon usage of yeasts (21, 22), (3) an increase of the GC-content (22, 23), (4) a decreased occurrence of AT-rich regions (24) and (5) an adapted isoelectric point of the protein (24). With the very recent release of the whole genome sequence of *P. pastoris* (25), even more accurate sequence optimisations are now possible.

Answering this series of questions should help the researcher to assemble the most suitable vector(s) for production of their target protein in *P. pastoris*. A significant set of plasmids is commercially available from Invitrogen (see the Protein and Expression section in http://www.invitrogen.com and Table 4) that could either be used as is or further engineered to best suit the selected strategy.

1.6. My Construct Is Now Ready, How Do I Proceed with P. pastoris Transformation?

As for many other yeasts, transformation of *P. pastoris* is straightforward. Several robust methods are available, based on either chemically competent (spheroplasts, PEG1000, LiCl) or electrocompetent cells. Moreover, these protocols are well described and can be easily found on numerous Web sites: convenient *Pichia* manuals can be downloaded from http://www.invitrogen.com.

Table 3
Additional tag sequences and protease cleavage sites

(a) Additional tag sequences

Name	Peptidic sequence	Size
His-tag	HHHHHH(HHHH)	6–10 aa.
Flag-tag	DYKDDDDK	8 aa.
Strep II tag	WSHPQFEK	8 aa.
1D4 antibody recognition sequence	TETSQVAPA	9 aa.
HA epitope tag	YPYDVPDYAS	10 aa.
c-Myc epitope	EQKLISEEDL	11 aa.
V5 epitope	GKPIPNPLLGLDST	14 aa.
Calmodulin-binding peptide	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	26 aa.
Bio-tag	Peptide	85 aa.
GFP	Protein	35 kDa

(b) Protease cleavage sites

Name	Recognised sequence	Protease size (kDa)
Enterokinase	DDDDK	26
Tobacco etch virus (TEV) protease	ENLYFQS	28
Thrombin	LVPRGS/F	35
Factor Xa.	IE/DGR	43

The number of strains usually employed for heterologous expression is rather limited (see Table 5). They mainly differ in their auxotrophies, principally relying on a histidinol dehydrogenase deficiency (*his4*), allowing, upon transformation, for the positive selection of recombinant expression vectors. Some of them bear additional deficiencies in endogenous proteases (SMD series), while others were recently engineered to perform "human-like" N-glycosylation (26).

As already mentioned in the first section, most of the transforming expression vectors are designed to be maintained as integrative elements in the genome of *P. pastoris*. This is generally achieved through recombination events between linearised sequences borne by the plasmids (typically *HIS4* or P_{AOX1}) and their homologous sequence counterparts present on the genome, leading to the targeted insertion of the expression vectors. Moreover, such plasmid insertions frequently occur in tandem in yeasts and thus lead to multiple integration of the gene of interest with an associated impact on subsequent protein yields.

Table 4
Commercially available expression vectors

Name	Selection marker	Phenotype of transformants	Promoter	Secretion sequence	Added tags
pAO815	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	None	None
pPIC3.5 K	*HIS4*, Kan	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	None	None
pPIC9K	*HIS4*, Kan	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	α factor	None
pPICZ A, B, C	Ble	Zeo^R	P_{AOX1}	None	c-Myc/his6
pPICZα A, B, C	Ble	Zeo^R	P_{AOX1}	α factor	c-Myc/his6
pPIC6 A, B, C	Bsd	Bla^R	P_{AOX1}	None	c-Myc/his6
pHIL-D2	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	None	None
pHIL-S2	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	PHO1	None
pFLD	Ble	Zeo^R	P_{FLD1}	None	V5 epitope/his6
pFLDα	Ble	Zeo^R	P_{FLD1}	α factor	V5 epitope/his6
pGAPZ A, B, C	Ble	Zeo^R	P_{GAP}	None	c-Myc/his6
pGAPZα A, B, C	Ble	Zeo^R	P_{GAP}	α factor	c-Myc/his6
pPink-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	None	None
pPink-LC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	None	None
pPinkα-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	α factor	None

HIS4 and *ADE2* auxotrophy markers for histidine and adenine, respectively; *Kan*, *Ble* and *Bsd* bacterial genes conferring *P. pastoris* resistance to G418 (or geneticin), zeocin and blasticidin antibiotics, respectively

Alternatively, integration can be obtained by a gene replacement strategy. In this case, a double recombination event must be performed between the *AOX1* promoter and terminator sequences present on the transforming DNA (containing the gene of interest and a selection marker) and the corresponding homologous sequences present within the *P. pastoris* genome. This double recombination event results in the replacement of the *AOX1* gene by the construct of interest.

The phenotype of the resulting transformants is not solely dependent on the selection marker present in the chosen vector (auxotrophy and/or antibiotic resistance). The integration strategy itself dictates the methanol utilisation phenotype of the transformed cells since plasmid insertion results in a Mut^+ (methanol utilisation plus) phenotype, while the gene replacement of *AOX1* leads to a Mut^S (methanol utilisation slow) phenotype. In several cases, these differences in methanol utilisation have been reported as an important parameter to consider for enhancing the performance of recombinant protein production (27).

Table 5
***P. pastoris* most commonly used strains**

Strain	Genotype	Phenotype	References
Y11430	Wild-type	Mut^+	NRRL
X-33	Wild-type	Mut^+	NRRL
GS115	*his4*	Mut^+, His^-	(46)
KM71	*his4*, *arg4*, *aox1::ARG4*	Mut^s, His^-, Arg^+	(46)
MC100-3	*his4*, *arg4*, *aox1::ARG4*, *aox2::HIS4*	Mut^-, His^+, Arg^+	(47)
SMD1163	*his4*, *pep4*, *prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^-, $CarbY^-$)	(48)
SMD1165	*his4*, *prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (B^-)	(48)
SMD1168	*his4*, *ura3*, *pep4::URA3*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^s, $CarbY^-$)	(48)
PichiaPink® Strain 1	*ade2*	Mut^+, Ade^-,	Invitrogen
PichiaPink® Strain 2	*ade2*, *pep4*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (A^-, B^s, $CarbY^-$)	Invitrogen
PichiaPink® Strain 3	*ade2*, *prb1*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (B^-)	Invitrogen
PichiaPink® Strain 4	*ade2*, *pep4*, *prb1*	Mut^+, Ade^-, $Prot^-$ (A^-, B^-, $CarbY^-$)	Invitrogen

NRRL: Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL

1.7. Where Can I Find a Practical Illustration of the Construction and Preparation of an Expression Vector?

The next sections present the material and protocols needed for the cloning of the gene encoding the adenosine A_{2A} receptor (AA2AR), a G protein-coupled receptor (GPCR), into an engineered pPIC9K plasmid (see Table 1). This vector was modified by standard molecular biology procedures to incorporate a Flag-tag, a TEV protease cleavage sequence and a deca-histidine-tag (10His) upstream of the *Bam*HI and *Spe*I cloning sites for insertion of the target gene, as well as a second TEV site and a biotinylation-tag downstream (28). This combination was selected on the basis of previous studies showing enhanced yields of other GPCRs when fused to the α-MF signal sequence (present on pPIC9K) and the biotinylation-tag (16, 17). The Flag and 10His tag were inserted for detection and purification purposes, the TEV cleavage sites were added to allow cleavage of the N- and C-terminally fused sequences following purification. The brief protocols presented here illustrate a very standard way of generating the desired *P. pastoris* expression plasmid as well as preparation prior to yeast transformation.

2. Materials

2.1. Cloning the Gene of Interest into the Expression Vector

1. A cDNA template containing the full-length AA2AR_HUMAN encoding gene.
2. A 30-base-long AA2A-specific forward primer bearing an additional 5′ adapter specifically designed to introduce a ***Bam*HI** restriction site (fwd. sequence: 5′-GAAGACA**GGATCC**ATGCCCATCATGGGCTCCTCGGTGTACATC-3′), and a similar reverse primer, bearing a 5′ adapter introducing ***Spe*I** (rev. sequence: 5′-GAAGACA**ACTAGT**GGACACTCCTGCTCATCCTGGGCCAGGGG-3′) (see Note 1).
3. A high-fidelity polymerase, typically the PrimeSTAR (Takara) or the Phusion (Finnzyme) DNA polymerase, and its specific buffer and dNTP mix.
4. Standard restriction enzymes and their related buffers, here *Bam*HI and *Spe*I (Fermentas, Germany).
5. A T4 DNA ligase, here the Rapid DNA ligation kit (Fermentas).
6. *E. coli* competent cells, here the TOP10 chemically competent cells (Invitrogen).
7. Liquid and agar plates of LB media (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) supplemented with 50 μg/mL kanamycin.
8. A robust nucleic acid extraction and purification kit, here the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel).
9. Standard equipment, consumables and chemicals for routine molecular biology techniques including PCR amplification of DNA fragments, DNA separation and visualisation, UV spectrophotometry and *E. coli* culturing.

2.2. Preparation of the Expression Vector

1. Liquid LB medium.
2. NucleoSpin Plasmid kit from Macherey-Nagel.
3. Restriction enzyme *Pme*I and its specific buffer (Fermentas).
4. Phenol.
5. 24:1 (v/v) chloroform-isoamyl alcohol.
6. Ice-cold 100% ethanol.
7. Ice-cold 70% ethanol.
8. 3 M sodium acetate pH 4.8.
9. Sterile H_2O.
10. Agarose gels (1%) supplemented with ethidium bromide.

2.3. Transformation of Pichia pastoris

All materials and solutions must be sterile.

1. YPD-rich medium: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose.
2. Agar plates made with YPD-rich medium supplemented with 2% agar.
3. A fresh SMD1163 colony streaked on a YPD plate.
4. 1 M Hepes pH 8.
5. 1 M dithiothreitol (DTT).
6. 1 M cold sorbitol.
7. Sterile cold H_2O.
8. Electroporation instrument and sterile 0.2-cm electroporation cuvettes.
9. MD plates: 1.34% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, 2% dextrose, 4×10^{-5}% biotin.
10. YPD plates supplemented with 0.1 and 0.25 mg/mL geneticin.

3. Methods

3.1. Cloning the AA2AR Gene into the Modified pPIC9K Expression Vector

3.1.1. PCR Amplification and Preparation of the AA2AR Gene

1. Prepare the PCR reaction mix on ice: typically 1–10 ng of the template cDNA, 5 μL each of the 2 μM stock solution of the forward and reverse primers, 10 μL of 5× PCR buffer, 4 μL of a dNTP mixture (2.5 mM each), 1 U of high fidelity PrimeSTAR polymerase, and sterile water to a final volume of 50 μL.
2. Run the PCR reaction in a thermocycler with a standard 30-cycle protocol alternating 15 s at 98°C, 15 s at 55°C and 1 min at 72°C.
3. Pipette 25 μL of the PCR reaction, add 5 μL 6× loading dye and load the mixture on a 1% agarose gel to analyse the amplified product after migration.
4. Extract the desired DNA fragment using the protocol detailed in the NucleoSpin kit (see Note 2).

3.1.2. Preparation of the Plasmid and Ligation with the Insert DNA

1. In individual eppendorf tubes, cut the amplified insert fragment coding for the gene of interest and the pPIC9K vector with the *Bam*HI and *Spe*I enzymes.
2. Load the digestion products on a 1% agarose gel and following separation extract the cut insert and vector fragments separately (see Note 3).
3. Prepare the ligation reaction with a 5:1 ratio of insert: plasmid. Typically, 50–100 mg of linearised plasmid is used. Add 1 U of T4 DNA ligase together with the ligase buffer and make the final volume to 20 μL with sterile water.

3.1.3. Transformation, Selection and Control of E. coli Recombinant Clones

1. Use about 5 μL of the ligation mixture to transform 50 μL of TOP10 chemically competent cells. Incubate on ice for 5–30 min.
2. Heat-shock the cells for 30 s at 42°C and immediately transfer the tubes on ice.
3. Add 250 μL of regeneration medium (typically SOB or SOC medium) and let the cells regenerate for 1 h at 37°C.
4. Spread 100–200 μL of the transformation mixture on pre-warmed LB agar plates supplemented with 50 μg/mL kanamycin and incubate overnight at 37°C.
5. The following day, pick 6–12 colonies and use to inoculate 2 mL LB supplemented with 50 μg/mL kanamycin. Grow the cultures overnight at 37°C in an incubator shaker. The presence of the insert in a particular clone can also be checked using colony PCR.
6. Purify the plasmid DNA of each clone using the plasmid purification kit following the manufacturer's instructions.
7. Perform restriction digest analysis of the plasmids using the *Bam*HI and *Spe*I enzymes to confirm the presence of the insert.
8. Final check the integrity of the insert by DNA sequencing (see Note 4).
9. Store the plasmid containing the correct sequence at −20°C. In addition, prepare a glycerol stock by adding 700 μL of culture containing correct clone to 300 μL 20% glycerol LB medium in cryotubes and storing at −80°C.

3.2. Preparation of the Expression Vector

3.2.1. Amplification and Linearisation of the Expression Vector

1. Inoculate 5–10 mL LB with the *E. coli* clone containing the expression pPIC9K plasmid and incubate at 37°C overnight.
2. Extract and purify the plasmid DNA using the plasmid preparation kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.
3. Prepare a restriction digest solution by adding 5–7 μg of purified plasmid to 25 U of *Pme*I, 20 μL of 10× corresponding buffer and sterile water to a final volume of 200 μl. Incubate the reaction for 2 h at 37°C (see Note 5).

3.2.2. Phenol-Chloroform Extraction of the Linearised Plasmid

1. Add 400 μl of phenol:chloroform (1:1) to the 200 μL digestion mixture.
2. Centrifuge 5 min at 18,000 × *g* and transfer the superior phase to a new tube.
3. Add 400 μl of chloroform and vortex thoroughly.
4. Centrifuge 5 min at 18,000 × *g* and transfer the superior phase to a new tube.

5. Add 1 mL of 100% ethanol, 50 μl of 3 M sodium acetate and incubate for at least 1 h at −20°C to precipitate the DNA.
6. Centrifuge for 30 min at 4°C at 18,000 × *g*.
7. Wash the pellet with 100 μL of 70% ethanol.
8. Centrifuge for 5 min at 4°C at 18,000 × *g*.
9. Dry the pellet then resuspend in 15 μL sterile H_2O (see Note 6).
10. Check the DNA linearisation by loading 1 μL of the solution on a 1% agarose gel.

3.3. Transformation of P. pastoris

3.3.1. Preparation of Competent Cells (See Note 7)

1. Inoculate 100 mL of YPG medium with a fresh SMD1163 colony and incubate the preculture overnight at 30°C in an incubator shaker.
2. Measure the OD_{600} of the preculture, dilute it in 400 mL YPG medium in order to obtain an OD_{600} of 0.25 and incubate at 30°C.
3. When the culture reaches an OD_{600} of 1 (after approximately 4 h), harvest the cells by centrifugation in sterile tubes at 2,000 × *g* and 4°C for 5 min.
4. Resuspend the cells in 100 mL YPD, 20 mL of 1 M Hepes pH 8 and 2.5 mL of 1 M DTT; mix gently until the pellet is resuspended.
5. Incubate for 15 min at 30°C.
6. Transfer onto ice and add sterile and cold H_2O to a final volume of 500 mL.
7. Harvest the cells by centrifugation at 2,000 × *g* and 4°C for 5 min.
8. Wash the cell pellet with 250 mL of sterile and cold H_2O.
9. Harvest the cells by centrifugation at 2,000 × *g* and 4°C for 5 min.
10. Resuspend the pellet in 20 mL of cold 1 M sorbitol by gently mixing.
11. Harvest the cells by centrifugation at 2,000 × *g* and 4°C for 5 min.
12. Resuspend the pellet in 500 μl of cold 1 M sorbitol by gently mixing.

3.3.2. Electro transformation

1. Place an electroporation cuvette on ice at least 10–15 min before performing the transformation.
2. Mix 40 μL of competent cells, with 7.5 μL of the linearised DNA in the cuvettes, mix gently with the pipette and incubate for 5 min on ice.
3. Adjust the electroporation settings as follows: 1,500 V, 25 μF, 600 Ω.

4. Place the cuvette in the electroporator chamber and apply the electric pulse.
5. Immediately resuspend the electroporated mixture in 1 mL of cold 1 M sorbitol and transfer cells to a sterile tube.
6. Allow the cells to recover for about 1 h at 30°C then harvest by centrifugation at 2,000 × *g* for 10 min.
7. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 500 μL 1 M sorbitol.

3.3.3. Selection of Recombinant Clones

1. Spread 2 × 250 μL of electrotransformed cells on two MD plates and incubate for 2–3 days at 30°C.
2. Harvest the His^+ transformants by adding 1 mL of YPD onto the plates and scrape off all the clones using a sterile scraper.
3. Perform 10× and 100× dilutions and measure the OD_{600} for each dilution.
4. Spread an equivalent of 10^5 cells/plate (OD_{600} of 1 is equivalent to approximately 5×10^7 cells/mL) on YPD plates supplemented with 0.1 or 0.25 mg/mL geneticin.
5. Incubate for 2–3 days at 30°C. Colonies should only grow if the cells contain the insert together with the selection marker integrated into the genome. Those colonies which grow on plates with the higher geneticin concentration should contain more copies of the selection marker and more copies of the target gene.

4. Notes

1. In the present example, the primers are designed to amplify a gene that will be fused in frame with tag sequences at both 5′ and 3′ ends. Therefore, no stop codon is introduced in the sequence of the reverse primer.
2. If the PCR products appear as pure and single bands corresponding to the desired DNA fragment, you can directly use the PCR mixture in the next step. However, if the PCR reaction results in a number of non-specific products, optimise the reaction conditions by increasing the annealing temperature or the length of the annealing step.
3. If you use restriction enzymes that can be heat inactivated, this step is optional.
4. The sequencing step is mandatory here as the DNA insert has been obtained by PCR. This step is of course not necessary if the insert fragment is obtained from digestion of a previously validated plasmid.

5. Check for the absence of the *Pme*I site in the gene to be expressed, otherwise you will generate several fragments instead of a linearised vector. In case *Pme*I is present, select another enzyme that will cut only once in the vector (*Sac*I or *Sal*I for instance).
6. Make sure the DNA pellet is completely dried, otherwise it will be poorly resuspended and not at the concentration required for transformation.
7. This protocol describes the preparation of electrocompetent cells. Alternative protocols for chemically competent cells are also available in the Invitrogen *Pichia* manual, which is freely available at http://www.invitrogen.com.

References

1. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev 24:45–66
2. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotechnol 13:329–332
3. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 22:249–270
4. Alkhalfioui F, Logez C, Bornert O, Wagner R (2011) Expression systems: *Pichia pastoris*. In: Production of membrane proteins–strategies for expression and isolation (ed A.S. Robinson) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, DOI: 10.1002/9783527634521
5. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. Mol Cell Biol 5:3376–3385
6. Lee CC, Williams TG, Wong DWS, Robertson GH (2005) An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. Plasmid 54:80–85
7. Hong IP, Lee SJ, Kim YS, Choi SG (2007) Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett 29:73–78
8. Sandstrom AG, Engstrom K, Nyhlen J, Kasrayan A, Backvall JE (2009) Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomal replicating yeast plasmid. Protein Eng Des Sel 22:413–420
9. Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, Pan YW, Tan YH, Fu CY, Tu FZ (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. Mol Biol Rep 36:1611–1619
10. Hartner FS, Glieder A (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. Microb Cell Fact 5:39
11. Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, Johnson SN, Hyka P, Lin-Cereghino GP, Lin-Cereghino J, Kovar K, Cregg JM, Glieder A (2008) Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res 36:e76
12. Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. Microb Cell Fact 5:17
13. Fantoni A, Bill RM, Gustafsson L, Hedfalk K (2007) Improved yields of full-length functional human FGF1 can be achieved using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 52:31–39
14. Delroisse JM, Dannau M, Gilsoul JJ, El Mejdoub T, Destain J, Portetelle D, Thonart P, Haubruge E, Vandenbol M (2005) Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 42:286–294
15. Daly R, Hearn MTW (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit 18:119–138
16. Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H (1995) Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. FEBS Lett 377:451–456
17. 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

18. Fischer G, Kosinska-Eriksson U, Aponte-Santamaria C, Palmgren M, Geijer C, Hedfalk K, Hohmann S, de Groot BL, Neutze R, Lindkvist-Petersson K (2009) Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 Å reveals a novel gating mechanism. PLoS Biol 7:e1000130
19. Tornroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. Nature 439:688–694
20. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 60:523–533
21. Woo JH, Liu YY, Mathias A, Stavrou S, Wang Z, Thompson J, Neville DM Jr (2002) Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 25:270–282
22. Sinclair G, Choy FY (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 26:96–105
23. Tull D, Gottschalk TE, Svendsen I, Kramhøft B, Phillipson BA, Bisgård-Frantzen H, Olsen O, Svensson B (2001) Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic bacillus alpha-amylase produced in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 21:13–23
24. Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, Stahl U, Lang C (2007) Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris* – a comparative view on 79 human genes. J Biotechnol 130:1–10
25. De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouze P, Van de Peer Y, Callewaert N (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. Nat Biotechnol 27:561–569
26. Hamilton SR, Gerngross TU (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. Curr Opin Biotechnol 18:387–392
27. Pla IA, Damasceno LM, Vannelli T, Ritter G, Batt CA, Shuler ML (2006) Evaluation of Mut$^+$ and MutS *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. Biotechnol Prog 22:881–888
28. André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, Wagner R, Reinhart C (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. Protein Sci 15:1115–1126
29. Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol Cell Biol 5:1111–1121
30. Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K (2000) Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. J Biosci Bioeng 89:479–484
31. Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186:37–44
32. Shen SG, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. Gene 216:93–102
33. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res 15:3859–3876
34. Menendez J, Valdes I, Cabrera N (2003) The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. Yeast 20:1097–1108
35. Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast 14:783–790
36. Ahn J, Hong J, Lee H, Park M, Lee E, Kim C, Choi E, Jung J, Lee H (2007) Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. Appl Microbiol Biotechnol 74:601–608
37. Ahn J, Hong J, Park M, Lee H, Lee E, Kim C, Lee J, Choi E, Jung J, Lee H (2009) Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter. Appl Environ Microbiol 75:3528–3534
38. Liu H, Tan XQ, Russell KA, Veenhuis M, Cregg JM (1995) PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane-protein involved in protein import. J Biol Chem 270:10940–10951
39. Hashimoto Y, Koyabu N, Imoto T (1998) Effects of signal sequences on the secretion of hen lysozyme by yeast, construction of four secretion cassette vectors. Protein Eng 11:75–77
40. Payne WE, Gannon PM, Kaiser CA (1995) An inducible acid phosphatase from the yeast *Pichia pastoris* – characterisation of the gene and its product. Gene 163:19–26

41. Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM (1994) Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. Yeast 10:1415–1419
42. Raemaekers RJM, de Muro L, Gatehouse JA, Fordham-Skelton AP (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* – correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. Eur J Biochem 265:394–403
43. Kato S, Ishibashi M, Tatsuda D, Tokunaga H, Tokunaga M (2001) Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary alpha-amylase secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Yeast 18:643–655
44. Tokunaga M, Kawamura A, Omor A, Hishinuma F (1992) Structure of yeast pGKL 128-kDa killer-toxin secretion signal sequence: processing of the 128-kDa killer-toxin-secretion-signal – α-amylase fusion protein. Eur J Biochem 203:415–423
45. Oka C, Tanaka M, Muraki M, Harata K, Suzuki K, Jigami Y (1999) Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. Biosci Biotechnol Biochem 63:1977–1983
46. Cregg JM, Madden KR (1987) Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* gene disruption. Biol Res Yeasts, II, pp 1–18
47. Cregg JM, Madden KR (1989) Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. Mol Gen Genet 219:320–323
48. White CE, Hunter MJ, Meininger DP, White LR, Komives EA (1995) Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. Protein Eng 8:1177–1187

Publication 3 :

Bornert O., Alkhalfioui F., **Logez C**. and Wagner R. (2012).
"Overexpression of membrane proteins using Pichia pastoris."
Curr Protoc Protein Sci Chapter 29: Unit 29 22.

Overexpression of Membrane Proteins Using *Pichia pastoris*

Olivier Bornert,[1] Fatima Alkhalfioui,[1] Christel Logez,[1] and Renaud Wagner[1]

[1]Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, University of Strasbourg—CNRS, Illkirch, France

ABSTRACT

Among the small number of expression systems validated for the mass production of eukaryotic membrane proteins (EMPs), the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* stands as one of the most efficient hosts. This system has been used to produce crystallization-grade proteins for a variety of EMPs, from which high-resolution 3D structures have been determined. This unit describes a set of guidelines and instructions to overexpress membrane proteins using the *P. pastoris* system. Using a G protein–coupled receptor (GPCR) as a model EMP, these protocols illustrate the necessary steps, starting with the design of the DNA sequence to be expressed, through the preparation and analysis of samples containing the corresponding membrane protein of interest. In addition, recommendations are given on a series of experimental parameters that can be optimized to substantially improve the amount and/or the functionality of the expressed EMPs. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 67:29.2.1-29.2.24. © 2012 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: *Pichia pastoris* • recombinant expression • membrane proteins • G protein–coupled receptors • membrane preparation • immunodetection • ligand binding

INTRODUCTION

Already known as a system of choice for the production of cytosoluble and secreted proteins (see UNIT 5.7), the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* also proves highly efficient for the overexpression of difficult-to-express proteins and complexes, including a large number of eukaryotic membrane proteins (EMPs). As of 2011, more than 150 EMPs have been successfully expressed in *P. pastoris* (references in Alkhalfioui et al., 2011), a dozen of them having been produced and purified to sufficiently high quantity and quality levels to allow determination of their crystallographic structure. These structure-solved EMPs include enzymes (Binda et al., 2002; Martinez Molina et al., 2007), transporters (Aller and Unger, 2006; Aller et al., 2009), aquaporins (Tornroth-Horsefield et al., 2006; Horsefield et al., 2008), and ion channels (Long et al., 2005, 2007; Tao et al., 2009) that are representative of various membrane-spanning topologies, oligomeric states and key cellular functions, thus illustrating the remarkable efficacy and versatility of this overexpression system.

The main advantages of *P. pastoris* as a system for the overexpression of EMPs are the handling simplicity of a unicellular microbe and the cellular sophistication of a eukaryotic organism. While the former aspect has a positive and direct impact on the experimental timing and on cost and scale-up issues, the latter endows this host with the majority of the cellular machineries needed to achieve the synthesis, maturation, and trafficking of complex proteins, including membrane proteins from mammals. In addition, *P. pastoris* is one of the few types of yeast that have developed a singular methanol utilization pathway relying on some of the strongest and most tightly regulated known promoters that can be used for very-high-level expression of recombinant genes.

Current Protocols in Protein Science 29.2.1-29.2.24, February 2012
Published online February 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/0471140864.ps2902s67
Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Inc.

This unit is intended to give general guidelines and instructions to utilize the *P. pastoris* system to (over)express EMPs. Included are details on DNA sequence design, conditions for expression, and the preparation and analysis of membrane samples containing the proteins of interest. The initial and crucial step is the choice of the expression vector and selected fusion sequences that impact not only the yields and activity of the recombinant EMPs, but also the subsequent detection and purification strategies. The main objective of Basic Protocol 1 is to provide the reader with some guidance on the important sequence elements required to assemble EMP-adapted expression vectors. As an example, the design of one vector for the expression of G protein–coupled receptors (GPCRs) is described, together with an illustrative standard protocol for introducing one target gene in this vector.

Basic Protocol 2 describes the integrative transformation of *P. pastoris* and the subsequent selection of recombinant clones. This section first gives a global overview on existing strains and transforming strategies and then focuses on the most frequently used methods for generating and selecting recombinant clones based on phenotypic criteria.

Once these clones have been obtained, the operator is then ready to proceed to the expression of the foreign EMP. Basic Protocol 3 outlines methods to culture the yeast cells, both at the analytical scale to evaluate several clones in parallel, and at the preparative scale to generate larger amounts of cells for further analyses.

In contrast with cytosoluble recombinant proteins that can be easily secreted outside the cells and purified from the culture media, preparing EMPs for analyses requires a cell disruption phase followed by the recovery of the membrane fractions. Efficient methods to lyse this yeast are described in Basic Protocol 4, together with an optimized protocol for preparing the total membrane fractions before analysis.

A panel of approaches that assess both the yields and functionality of the expressed EMPs are then illustrated using GPCRs as model EMPs. Whereas Basic Protocol 5 exemplifies an immunodetection method to evaluate the overall amounts of the produced EMPs, Basic Protocol 6 describes a radiometric assay that confirms their activity. Finally, tips are given in the Commentary section on the major parameters that can be modulated to potentiate the expression level of EMPs.

BASIC PROTOCOL 1

DESIGNING AND CLONING A *P. PASTORIS* EXPRESSION VECTOR

P. pastoris expression vectors are built on a classical *E. coli*/yeast shuttle model with components required for *E. coli* amplification (classically one origin of replication and one antibiotic selection marker) and specific elements for heterologous gene expression in *P. pastoris*. These typically include a selectable auxotrophy marker and/or an antibiotic resistance bacterial gene, as well as a promoter and a terminator sequence that surround a cloning cassette and optional fusion sequences added to improve the yields of the expressed proteins and to facilitate their detection and their purification. Most of these vectors are commercially available (e.g., from Invitrogen). Table 29.2.1 summarizes the vectors most frequently employed for the expression of EMPs.

Designing the expression vector

The first decision in setting up a *P. pastoris* expression system is the choice of the expression vector(s) that will be best adapted to a specific EMP. Usually there are two scenarios: no information is available in the literature, or similar proteins have already been successfully produced in this system and the published data can serve as a useful starting point. In the latter case, it is advisable to consult the few authoritative surveys that have been conducted on EMPs expressed in *P. pastoris* (Sarramegna et al., 2003;

Table 29.2.1 *Pichia pastoris* Expression Vectors[a]

Name	Selection markers	Phenotype of transformants	Promoter	Secretion sequence	Added tags
pAO815	*HIS4*	His^+	P_{AOX1}	None	None
pPIC3.5K	*HIS4, Kan*	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	None	None
pPIC9K	*HIS4, Kan*	His^+, $G418^R$	P_{AOX1}	α Factor	None
pPICZ A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{AOX1}	None	c-Myc/His_6
pPICZα A, B, C	*Ble*	Zeo^R	P_{AOX1}	α Factor	c-Myc/His_6
pPIC6 A, B, C	*Bsd*	Bla^R	P_{AOX1}	None	c-Myc/His_6
pPink-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	None	None
pPinkα-HC	*ADE2*	Ade^+	P_{AOX1}	α Factor	None

[a]*HIS4* gene from *P. pastoris*, encodes a histidinol dehydrogenase, restoring histidine prototrophy (His^+); *Kan* gene, confers resistance to G418 ($G418^R$); *Ble* gene from *Streptoalloteichus hindustanus*, confers resistance to Zeocin (Zeo^R); *Bsd* gene, confers resistance to Blasticidin (Bla^R); *ADE2* gene from *P. pastoris*, encodes a phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, restoring adenine prototrophy; P_{AOX1}, promoter sequence of the *AOX1* gene from *P. pastoris* encoding an alcohol oxidase; α Factor, encodes the native *S. cerevisiae* α factor secretion signal; c-Myc, C-terminal myc epitope, EQKLISEEDL; His_6, hexahistidine tag.

Reinhart and Krettler, 2006; Alkhalfioui et al., 2011). When no published information is available, a combination of vectors that comprise the sequence elements *HIS4*/*Kan* and *ble* selection markers are generally preferred. Similarly, the inducible P_{AOX1} promoter from the alcohol oxidase *AOX1* gene of *P. pastoris* is also favored. Among the panel of constitutive and inducible promoters that are available in expression vectors, P_{AOX1} is actually the most tightly repressed by glucose and strongly induced by methanol (Hartner and Glieder, 2006), allowing fine control of the expression of EMPs that are often toxic to the host.

The sequences that can be fused to the EMP gene are usually very dependent on the particular protein. For instance, adding a secretion sequence, such as the alpha-factor secretion signal from *S. cerevisiae*, may be highly beneficial for some EMPs, such as the seven transmembrane (7TM) GPCRs (Weiss et al., 1995; Grunewald et al., 2004). Alternatively, in the 6TM aquaporins where the N and C termini are both located intracellularly, protein expression with or without a fused signal sequence led to high yields of high-quality protein suitable for structural studies (Tornroth-Horsefield et al., 2006; Fischer et al., 2009).

Similarly, various tag sequences can be inserted to improve downstream detection and purification steps. While it is difficult to decide on the best sequence and position to use, the rules of thumb for an ideal tag are to have (1) no effect on the tertiary structure and the biological activity of the protein; (2) suitability with a one-step adsorption purification; and (3) easy and specific removal to recover the native protein. A large panel of such tags has been used with EMPs, ranging from hexa- or decahistidine (the most widely employed tags), c-Myc, Flag, HA, and StrepII epitopes, to larger peptidic domains such as a biotinylation domain (bio) and even the green fluorescent protein GFP. It is noteworthy that C-terminal bio fusions have enhanced the functional expression of GPCRs (Weiss et al., 1998; Grunewald et al., 2004). In addition, protease cleavage sequences, such as the factor-Xa or TEV sequences, are sometimes included in the constructs to eliminate the fused tags during or after the purification step.

Cloning into the expression vector

Once the expression vector(s) has been chosen, the next step is cloning. Basically, cloning is achieved by directly introducing the gene of interest into either a standard ready-made expression vector (see Table 29.2.1) or into a modified vector containing alternate fusion sequence(s). In both cases, the final constructs can be obtained by standard cloning strategies such as those described in Struhl (2000) and Elion et al. (2007).

As an illustration of how to handle such a task, the following sections present the information and protocols needed for the cloning of the gene encoding the alpha-1A adrenergic receptor (ADRA1A), a member of the large G protein–coupled receptor (GPCR) family, into an engineered pPIC9K plasmid. This vector was modified to incorporate a Flag-tag, a TEV protease cleavage sequence, and a deca histidine-tag (His_{10}) upstream of the *Bam*HI and *Spe*I cloning sites for insertion of the target gene, as well as a second TEV site and a bio-tag downstream (André et al., 2006). This combination was selected on the basis of previous studies showing dramatically enhanced expression levels of other GPCRs when fused to the α-MF signal sequence and the bio-tag (Weiss et al., 1998; Grunewald et al., 2004). The FLAG and His_{10} tags were inserted for detection and purification purposes; the TEV cleavage sites were added to allow cleavage of the N- and C-terminally fused sequences following purification. The protocols below illustrate a standard way to generate the desired *P. pastoris* expression plasmid, as well as its preparation prior to yeast transformation. The human alpha-1A adrenergic receptor is employed as an example.

Materials

cDNA template containing the full-length ADRA1A_HUMAN encoding gene (Missouri S&T cDNA Resource Center, cat. no. AR0A1A0001)
ADRA1A-specific forward primer bearing an additional 5′ adapter specifically designed to introduce a *Bam*HI restriction site (5′-GGATCCATGGTGTTTCTCTCGGGAAATGCTTCCGAC-3′), and a similar reverse primer, bearing a 5′ adapter introducing *Spe*I (5′-ACTAGTGACTTCCTCCCCGTTCTCACTGAGGGAGAT-3′)
High-fidelity DNA polymerase, e.g., Phusion (Finnzyme), and its specific buffer
dNTP mix, 2.5 mM each
Sterile water
Commercially available loading dye, e.g., 6× DNA loading dye from Fermentas
1% (w/v) agarose gels supplemented with ethidium bromide (0.5 μg/ml)
Nucleic acid extraction and purification kit, e.g., NucleoSpin kit (Macherey-Nagel)
Standard restriction enzymes and their related buffers, e.g., *Bam*HI and *Spe*I and *Pme*I
T4 DNA ligase, e.g., Rapid DNA ligation kit from Fermentas
SOC medium (see recipe)
E. coli competent cells, e.g., TOP10 chemically competent cells from Invitrogen
Liquid and agar plates of LB medium (see recipe) supplemented with 50 μg/ml kanamycin
80% (v/v) glycerol, autoclave-sterilized

Thermal cycler
1.5- and 2-ml microcentrifuge tubes
37°C incubator
37°C shaking incubator
Cryotubes
−20°C and −80°C freezers

Additional reagents and equipment for polymerase chain reaction (*APPENDIX 4J*), DNA separation and visualization, UV spectrophotometry, and *E. coli* culturing (Struhl, 2000), and agarose gel electrophoresis (*APPENDIX 4F*)

Perform PCR amplification and prepare the ADRA1A gene

1. Prepare the PCR reaction mix on ice: typically 1 to 10 ng of the cDNA template, 5 µl each of the 2 µM stock solution of the forward and reverse primers, 10 µl of 5× PCR buffer, 4 µl of a dNTP mixture (2.5 mM each), 1 U of high-fidelity polymerase, and sterile water to a final volume of 50 µl.

2. Run the PCR reaction in a thermal cycler (*APPENDIX 4J*) with a standard 30-cycle protocol alternating 15 sec at 98°C, 15 sec at 55°C, and 1 min at 72°C.

3. Mix 25 µl of the PCR reaction with 5 µl of 6× loading dye and load the mixture into a 1% (w/v) agarose gel to analyze the amplified product after migration (*APPENDIX 4F*).

4. Extract the desired DNA fragment using the NucleoSpin kit.

Ligate the pPIC9K plasmid with the insert DNA

5. In 15-ml microcentrifuge tubes, digest in parallel the amplified insert fragment coding for the gene of interest and the pPIC9K vector with *Bam*HI and *Spe*I enzymes (according to the manufacturer's instructions).

6. Load the digestion products on a 1% (w/v) agarose gel, electrophorese (*APPENDIX 4F*), and extract them separately using the NucleoSpin kit.

7. Prepare the ligation reaction with a 5:1 molar ratio of insert over plasmid. Typically, 50 to 100 ng of linearized plasmid is used. Add 1 U of T4 DNA ligase together with the ligase buffer and adjust to 20 µl with sterile water. Incubate the mixture for 5 min at 22°C.

Transform E. coli cells and analyze recombinant clones

8. Mix about 5 µl of the ligation mixture with 50 µl of chemically competent *E. coli* cells. Incubate on ice for 5 to 30 min.

9. Heat-shock the cells for 30 sec at 42°C and immediately transfer the tubes to wet ice.

10. Add 250 µl SOC medium and let the cells regenerate for 1 hr at 37°C.

11. Spread 100 to 200 µl of the transformation mixture on prewarmed LB agar plates supplemented with 50 µg/ml kanamycin and incubate overnight at 37°C.

12. The following day, pick six to twelve colonies and use the colonies to inoculate 2 ml LB medium supplemented with 50 µg/ml kanamycin. Grow the cultures overnight at 37°C in an shaking incubator.

13. Purify the plasmid DNA of each clone using a plasmid purification kit (e.g., NucleoSpin kit from Macherey Nagel) following the manufacturer's instructions.

14. Perform restriction digest of the plasmids using the *Bam*HI and *Spe*I enzymes. After electrophoresis on a 1% agarose gel (*APPENDIX 4F*), verify the presence of two bands of sizes corresponding to the pPIC9K plasmid and the insert DNA used for the ligation.

15. Confirm the integrity of the insert by DNA sequencing.

16. Store the plasmid containing the correct sequence up to 6 months at −20°C. In addition, prepare a glycerol stock by adding 800 µl of the LB culture of the corresponding bacterial clone to 200 µl of 80% (v/v) sterile glycerol in cryotubes. Thoroughly mix by vortexing and store up to several years at −80°C.

BASIC PROTOCOL 2

INTEGRATIVE TRANSFORMATION OF *P. PASTORIS* AND SELECTION OF RECOMBINANT CLONES

For the majority of the available expression vectors, those used for EMP expression are designed to be integrated in the genome of *P. pastoris*. Following yeast transformation, recombination events between linearized, plasmid-borne sequences (typically *HIS4* or P_{AOX1}) and their homologous sequence counterparts in the genome result in targeted insertion of the expression vectors into the *P. pastoris* genome. Moreover, such plasmid insertions frequently occur in tandem in yeasts and thus lead to multiple integration of the gene of interest with an associated impact on subsequent expression levels.

In an alternative strategy, integration can be achieved by replacing the *P. pastoris AOX1* gene by the construct of interest, leading to clones exhibiting a reduced growth rate on methanol-containing media (methanol utilization slow – Mut^S – phenotype). Such a gene replacement strategy is, however, not recommended for EMP expression. For a complete overview of the different existing integration possibilities and methods, see *UNIT 5.7* and Cregg et al. (2010).

The strains usually employed for heterologous expression of EMPs (see Table 29.2.2) are all histidine auxotrophs due to a deficiency in the histidinol dehydrogenase gene (*his4*). The prototrophy for histidine could be restored upon transformation with pPIC vectors bearing the *HIS4* gene, thereby serving as a positive selection marker. Strains from the SMD series bear additional deficiencies in endogeneous proteases and are often preferred for this convenient phenotype. Additional engineered strains have been described, notably for their capacity in performing "human-like" N-glycosylation (Hamilton and Gerngross, 2007), but none has yet been used for over-expressing EMPs.

Several robust methods are available for transforming *P. pastoris*, using either chemically competent or electrocompetent cells. While a number of reliable procedures can be found in other publications [see *UNIT 5.7* and Cregg et al. (2010)], described here is a protocol for the electroporation of yeast cells, which is the method of choice for most researchers. It is convenient to carry out, it yields transformants at high frequencies, and is compatible with multicopy integration events. In the present example, the previously cloned pPIC9K vector bearing the ADRA1A GPCR gene is used to transform a SMD1163 strain (*his4, pep4, prb1*).

Table 29.2.2 Most Commonly Used *P. pastoris* Strains for EMP Expression[a]

Strain	Genotype	Phenotype	Reference
GS115	*his4*	Mut^+, His^-	Cregg and Madden (1987)
KM71	*his4, arg4, aox1::ARG4*	Mut^S, His^-, Arg^+	Cregg and Madden (1987)
SMD1163	*his4, pep4, prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^-, $CarbY^-$)	White et al. (1995)
SMD1165	*his4, prb1*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (B^-)	White et al. (1995)
SMD1168	*his4, ura3, pep4::URA3*	Mut^+, His^-, $Prot^-$ (A^-, B^S, $CarbY^-$)	White et al. (1995)

[a] *his4*: deficient histidinol dehydrogenase encoding gene (responsible for the histidine auxotrophy, His^-, phenotype); Mut^+: methanol utilization plus; *ARG4/arg4*: wild-type/deficient arginosuccinate lyase encoding genes; *aox1*: deficient alcohol oxidase encoding gene (responsible for the methanol utilization slow, Mut^S, phenotype); *pep4*: deficient aspartyl protease encoding gene (responsible for the proteinase A minus, $ProtA^-$, and carboxypeptidase minus, $CarbY^-$, phenotype); *prb1*: deficient proteinase B encoding gene (responsible for the proteinase B minus, $ProtB^-$, and carboxypeptidase minus, $CarbY^-$, phenotype); *URA3/ura3*: wild-type/deficient orotidine 5′-phosphate decarboxylase encoding genes.

Materials

Purified expression vector (from Basic Protocol 1)
Restriction enzyme *Pme*I and its specific buffer
Sterile water
24:24:1 (v/v/v) chloroform:phenol:isoamyl alcohol
Chloroform
100% (v/v) ethanol, ice-cold
3 M sodium acetate, pH 4.8
70% (v/v) ethanol, ice-cold
1% (w/v) agarose gel supplemented with ethidium bromide (*APPENDIX 4F*)
YPD medium (see recipe)
A fresh SMD1163 colony streaked on a YPD plate (see recipe for YPD plates)
1 M HEPES, pH 8
1 M dithiothreitol (DTT)
Ice-cold sterile water
1 M sorbitol, ice-cold
MD plates (see recipe)
YPD plates supplemented with 0.1 and 0.25 mg/ml geneticin sulfate (G418 sulfate)

37°C incubator
Centrifuge
Vortex mixer
−20°C freezer
30°C shaking incubator
Spectrophotometer
Sterile 0.2-cm electroporation cuvettes
Electroporation instrument, e.g., Gene Pulser system from BioRad Scraper, sterile

Additional reagents and equipment for agarose gel electrophoresis (*APPENDIX 4F*)

NOTE: All materials and solutions must be sterile.

Prepare the expression vector prior to transformation

1. Prepare a restriction digest solution by adding 5 to 7 µg of purified expression vector to 25 U of *Pme*I, 20 µl of 10× corresponding buffer, and sterile water to a final volume of 200 µl. Incubate the reaction for 2 hr at 37°C.

   PmeI is used to linearize the expression vector in the P_{AOX1} promoter. Check for the absence of the PmeI site in the gene to be expressed; otherwise, several fragments will be generated instead of a linearized vector. If PmeI is present, select another enzyme that will cut only once in the P_{AOX1} or HIS4 sequences of the vector (SacI or SalI for instance).

2. Add 400 µl of 24:24:1 (v/v/v) chloroform:phenol:isoamyl alcohol to the 200 µl digestion mixture.

3. Centrifuge 5 min at 18,000 × *g*, room temperature, and transfer the upper aqueous phase into a new 15-ml microcentrifuge tube.

4. Add 400 µl chloroform and vortex thoroughly for ~20 sec.

5. Centrifuge 5 min at 18,000 × *g*, room temperature, and transfer the upper aqueous phase into a new 1.5-ml microcentrifuge tube.

6. Add 1 ml of 100% ethanol, 50 µl of 3 M sodium acetate and incubate for at least 1 hr at −20°C to precipitate the DNA.

7. Centrifuge 30 min at 18,000 × *g*, 4°C. Discard the supernatant.

8. Wash the pellet with 100 µl of 70% (v/v) ethanol and centrifuge for 5 min at 18,000 × *g*, 4°C. Discard the supernatant.

9. Air dry the pellet for 15 min and then resuspend in 15 µl sterile H_2O.

10. Check the DNA linearization by loading 1 µl of the solution on a 1% (w/v) agarose gel (*APPENDIX 4F*).

    When the plasmid is correctly linearized, one single DNA band of the corresponding size should be observed. If additional bands of nonlinearized plasmids are present, proceed back to step 1 and double the amount of PmeI restriction enzyme.

Prepare P. pastoris electrocompetent cells

11. Inoculate 100 ml YPD medium with a fresh SMD1163 colony and incubate overnight at 30°C in a shaking incubator.

12. Measure the OD_{600} of the culture with a spectrophotometer, dilute the culture in 400 ml fresh YPD to obtain an OD_{600} of 0.25, and incubate at 30°C.

    One OD_{600} unit approximately corresponds to 5×10^7 cells/ml. It is important to keep the cells in the appropriate stage of growth so OD_{600} values should not exceed 0.3. In case of higher values, the cell density will be underestimated. To avoid this, measure the OD_{600} of a 10- or 100- fold diluted solution.

13. When the culture reaches an OD_{600} of 1 (approximately after 4 hr), harvest the cells by centrifuging in sterile tubes for 5 min at 2000 × *g*, 4°C.

14. Decant the supernatant and resuspend the cells in 100 ml YPD, 20 ml of 1 M HEPES, pH 8, and 2.5 ml of 1 M DTT. Mix gently until the pellet is resuspended.

15. Incubate for 15 min at 30°C.

16. Transfer onto ice and add ice-cold sterile H_2O to a final volume of 500 ml.

17. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at 2000 × *g*, 4°C.

18. Decant the supernatant and wash the cell pellet with 250 ml ice-cold sterile H_2O.

19. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at 2000 × *g*, 4°C.

20. Decant the supernatant and resuspend the pellet in 20 ml ice-cold 1 M sorbitol by gently mixing.

21. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at 2000 × *g*, 4°C.

22. Decant the supernatant and resuspend the pellet in 500 µl ice-cold 1 M sorbitol by gently mixing.

Electrotransform

23. Place an electroporation cuvette on ice at least 10 to 15 min before performing the transformation.

24. Mix 40 µl of competent cells (from step 22) with 7.5 µl of the linearized DNA (see step 10) in the cuvettes, mix gently with the pipet, and incubate for 5 min on ice.

25. Adjust the electroporation settings as follows: 1 500 V, 25 µF, 600 Ω.

26. Place the cuvette in the electroporator chamber and apply the electric pulse.

27. Immediately resuspend the electroporated mixture in 1 ml ice-cold 1 M sorbitol and transfer into a sterile tube.

28. Allow the cells to recover for about 1 hr at 30°C, then pellet the cells by centrifuging 10 min at 2000 × *g*, room temperature.

29. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 500 µl of 1 M sorbitol. Proceed to step 30.

Select the recombinant clones

The selection is realized in two steps, the first corresponding to the selection of His^+ transformants, the second dedicated to the identification of multicopy transformants on YPD plates containing a range of G418 sulfate concentrations usually between 0.25 and 2 mg/ml. In the present case, as the strain SMD1163 is more sensitive to G418 sulfate, the range of G418 sulfate concentrations should be reduced to 0.05 to 0.25 mg/ml. In addition, whatever the strain used, direct selection of transformants on G418 sulfate is not recommended. The level of resistance is dependent on the cell density and false-positive clones may be isolated.

30. Spread 250 µl of electrotransformed cells on each of two MD plates and incubate for 2 to 3 days at 30°C.

31. Harvest the His+ transformants by adding 1 ml YPD medium onto the plates and scrape off all the clones using a sterile scraper.

32. Perform 10× and 100× dilutions and measure the OD_{600} for each dilution.

33. Spread an equivalent of 10^5 cells/plate (OD_{600} of 1 is equivalent to approximately 5×10^7 cells/ml) on YPD plates supplemented with 0.1 or 0.25 mg/ml G418 sulfate.

34. Incubate for 2 to 3 days at 30°C.

35. Pick six to twelve representative colonies from the different G418 sulfate concentration plates, streak them onto fresh YPD plates, and let them grow for 1 to 2 days at 30°C.

36. Directly use these colonies for further expression tests (see Basic Protocol 3) and/or resuspend them in 1 ml sterile YPD supplemented with 20% (v/v) glycerol and store them up to several years at −80°C.

CULTURING TRANSFORMED *P. PASTORIS* FOR MEMBRANE PROTEIN EXPRESSION

BASIC PROTOCOL 3

Once transformants have been obtained, the next step involves screening for the clones exhibiting the best expression levels of the recombinant EMPs. Actually, a high number of integrated copies does not necessarily correlate with higher expression levels, so several representative clones typically need to be assayed. For expression based on P_{AOX1}-dependent vectors, this is practically achieved by growing the clones in repressive medium to an appropriate cell density and growth phase before starting the expression phase by transferring the cells to a methanol-containing induction medium. For clones and expression condition screenings, small-scale culturing most often involves shaken baffled-flasks or tubes of smaller volumes, provided appropriate aeration is maintained. Such a standard procedure is described below.

For the production of large amounts of EMPs (in the milligram range), shake-flask culturing is often used. Alternatively, and in particular for large volumes of culture (>10 liters), bioreactors can be employed and notably allow efficient monitoring of several experimental factors (oxygen transfer, pH, substrate feeding). Accordingly, a number of robust fermentation processes, including fed-batch techniques or continuous culturing procedures, have been developed. Detailed descriptions of these methods with their benefits and limitations can be found in several excellent and comprehensive reviews (Cereghino et al., 2002; Cos et al., 2006; Li et al., 2007).

Materials

BMGY medium (see recipe)
Recombinant clones (from Basic Protocol 2) freshly streaked on a YPD agar plate
BMMY medium (see recipe)
Phosphate-buffered saline (PBS; *APPENDIX 2E*)

500-ml baffled-flasks
30°C shaking incubator
Spectrophotometer

1. Inoculate 50 ml of freshly prepared BMGY medium in a 500-ml baffled-flask with a fresh recombinant colony isolated on a YPD agar plate. Incubate overnight on a shaker at 250 rpm, 30°C.

2. On the next day, measure OD_{600} of the culture. Dilute the cells into 50 ml fresh BMGY medium in a 500-ml flask to achieve an OD_{600} of 0.2 (about 10^7 cells/ml) and incubate on a shaker at 250 rpm, at 30°C.

3. When the culture reaches ~1 OD_{600} (about 4 to 5 hr later), pellet the cells by centrifuging in sterile tubes for 5 min at 2000 × *g*, room temperature.

4. Decant the supernatant and resuspend the cell pellet with 50 ml fresh BMMY medium. Incubate 18 to 24 hr in a shaker at 30°C, 250 rpm.

5. After induction, harvest the cells by centrifuging for 10 min at 3000 × *g*, 4°C.

6. Decant the supernatant and wash the cell pellet with 50 ml PBS, pH 7. Centrifuge the suspension for 10 min at 3000 × *g*, 4°C.

7. Discard the supernatant and weigh the cell pellet.

   The yeast pellet can either be snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C, or kept on ice to be directly utilized for membrane preparation (see Basic Protocol 4).

   This protocol can be applied to other culturing formats, including conical 50-ml tubes or baffled-flask of volumes up to 5 liters. For optimal aeration of the clones during induction, it is important to maintain a 1:10 ratio between the volume of the yeast culture and the total volume of the selected vessel.

BASIC PROTOCOL 4

YEAST CELL LYSIS AND MEMBRANE PREPARATION

The first critical step when preparing *P. pastoris* membranes is a robust cell lysis method that effectively disrupts the thick protective cell wall. Shearing-based methods involving microbeads are preferred since they are very efficient, compatible with a broad range of sample volumes, and directly accessible to most laboratories. In the simplest and widest-used mode, cells in cold buffers are violently shaken with 500-µm diameter beads using a basic vortex apparatus in 4 to 8 cycles of alternating shaking (30 sec) and ice-cooling (30 sec) phases. To achieve the most reliable and reproducible results, programmable equipment is recommended, such as the Tissue Lyser from Qiagen or the FastPrep 24 from MP Biomedicals that accommodate various sample volumes and formats (up to 50 ml), or the more sophisticated and expensive grinder series from Dyno Mills that can handle large volumes in batch or continuous modes. In addition, pressure-based instruments have also proven efficient for the lysis of *P. pastoris* cells, and besides the well-known French pressure cell press, a panel of cell disruptors is available from Constant Systems that can handle from 1 to 20 ml of batch samples and more than 500 ml/min with the continuous flow models. Here again, programmable equipment is recommended for reproducible results. Alternative methods can involve glucanase enzymes (e.g., Helicase from snail digestive juice, Zymolyase or Lyticase from microbial sources) to remove the cell wall

and yield spheroplast preparations that can be easily burst. For cost and practical reasons, however, these methods are not recommended for the lysis of large volumes of cells.

Keep in mind that the longer the induction phase, the thicker the cell wall and the less efficient the lysis step. This issue must be considered when optimizing the induction time in order to strike a balance between expression level and cell lysis efficiency.

Following cell disruption in the presence of protease inhibitors (typically PMSF or other commercially available cocktails), the unbroken cells and large debris are separated from the lysate with a low-speed centrifugation (typically 10 min at 2000 × *g*). The membrane fraction in the supernatant is then pelleted by ultracentrifugation before being resuspended in an appropriate buffer for further analysis. Optionally, cycles of ultracentrifugation and stringent washes may be applied to eliminate unwanted membrane-associated proteins, resulting in samples enriched with the EMP of interest.

Described below is a protocol optimized for the preparation of membranes of *P. pastoris* expressing the ADRA1A receptor, using a bead-based disruption method and a series of ultracentrifugation and membrane washes.

Materials

Yeast cell pellet (from Basic Protocol 3)
TNE buffer (see recipe)
Acid-washed glass beads (425- to 600-µm diameter; Sigma-Aldrich)
4 M urea
NaOH
TN buffer (see recipe)

High-speed benchtop homogenizer (e.g., FastPrep 24 from MP Biomedicals)
26-ml polycarbonate bottles for ultracentrifuge
Ultracentrifuge equipped with an appropriate fixed-angle rotor
Dounce or Potter homogenizer

Additional reagents and equipment for the determination of protein concentration (*UNIT 3.4*), e.g., BCA assay

Yeast cell lysis

1. Resuspend 2 g of the yeast pellet obtained in Basic Protocol 3 with 10 ml of ice-cold TNE buffer.

2. Add 10 ml of acid-washed glass beads and proceed as follows:

   a. Place the tubes on the cell breaker device and proceed to cell lysis by alternating shaking and cooling steps (2 cycles of 20 sec each at 4 m/sec on a FastPrep 24).

   b. Centrifuge the samples 10 min at 2000 × *g*, 4°C, and collect the supernatant in a flask.

   c. Dissolve the remaining pellet in 10 ml of ice-cold TNE buffer and repeat steps 2a to 2c four times (or until the supernatant is clear).

3. Centrifuge the collected supernatants for an additional 5 min at 3000 × *g*, 4°C.

Membrane fractionation

4. Transfer the supernatant from the above step into ultracentrifugation bottles and centrifuge them 30 min at 100,000 × *g*, 4°C.

   Carefully weigh the bottles and check that the rotor is properly balanced.

5. Discard the supernatant and use a Dounce homogenizer to resuspend the pelleted whole membranes in 50 ml ice-cold TNE buffer containing 4 M urea.

6. Centrifuge 30 min at 100,000 × *g*, 4°C. Decant the supernatant.

7. Resuspend the pellet with a Dounce homogenizer in 50 ml ice-cold TNE buffer containing 20 mM NaOH and centrifuge again 30 min at 100,000 × *g*, 4°C. Decant the supernatant.

8. Carefully resuspend the pellet of washed membrane in 20 ml ice-cold TN buffer to obtain a homogeneous suspension.

9. Determine the protein concentration following the BCA assay procedure described in *UNIT 3.4*.

   The membrane preparation can be directly used for analyzing the expression level of the EMP of interest or stored up to 6 months at −80°C.

BASIC PROTOCOL 5

ANALYSIS OF MEMBRANES EXPRESSING A GPCR: IMMUNOBLOT AND IMMUNODETECTION

Expression levels of EMPs are usually assessed through specific immunodetection tests and activity assays. Immunodetection methods, such as immunoblot, dot-blot, or ELISA, are straightforward and allow determination of the overall amounts of produced EMP. Moreover, if no specific antibody targeted against the EMP of interest is available, a panel of useful tag epitopes can be fused to the EMP to facilitate such analyses (see Basic Protocol 1).

This protocol illustrates analysis of the expression level of the ADRA1A receptor with an immunoblot protocol where the expressed FLAG-tagged receptors are immunodetected after a denaturing SDS-PAGE.

Materials

Membrane preparation samples (from Basic Protocol 4)
Blocking buffer (see recipe)
Monoclonal anti-FLAG antibody from mouse (Sigma-Aldrich)
Blotting buffer (see recipe)
HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody
ECL immunoblotting reagents (e.g., ECL Prime kit from GE Healthcare used in this protocol)

Nitrocellulose membrane
Orbital shaker
Plastic wrap
Amersham Hyperfilm ECL

Additional reagents and equipment for SDS-PAGE (*UNIT 10.1*) and electrotransfer of proteins (*UNIT 10.7*)

1. Prepare a 10% SDS-polyacrylamide gel as described in *UNIT 10.1* and load 10 μg of membrane preparation pre-incubated in a standard Laemmli buffer.

2. After electrophoresis and protein separation, transfer the proteins from the gel to a nitrocellulose membrane by electroblotting in a tank unit (see *UNIT 10.7*) for 1 hr at 300 mA.

3. Transfer the membrane in a new tank and incubate in 50 ml blocking buffer for 1 hr at room temperature on an orbital shaker. Alternatively, incubate the membrane overnight at 4°C.

4. Remove the blocking buffer and incubate the membrane with the monoclonal anti-FLAG antibody diluted in the blotting buffer (1:8000, v/v) for 1 hr at room temperature on an orbital shaker.

5. Wash the membrane three times, each time with 50 ml blotting buffer on an orbital shaker for 10 min at room temperature.

6. Remove the blotting buffer and incubate the membrane with the anti-mouse IgG antibody diluted in the blotting buffer (1:10,000, v/v) for 1 hr at room temperature on an orbital shaker.

7. Drain the excess blotting buffer and place the membrane with protein side up on a sheet of plastic wrap or other suitable clean surface.

8. Prepare the ECL detection solution according to the manufacturer's instructions, cover the entire surface with the detection solution (about 0.1 ml of solution per cm^2 of membrane), and incubate for 5 min at room temperature.

9. Drain off the excess detection solution and wrap the membrane, protein side down, in a fresh piece of plastic wrap, gently smoothing out any air bubbles.

10. Place the wrapped membrane, protein side up, in an X-ray film cassette.

11. In a dark room using red safe lights, place a sheet of autoradiography film on top of the membrane for 15 sec. Do not move the film during exposure.

12. Remove the film and replace it with a second sheet of unexposed film.

13. Develop the first film and, on the basis of its appearance, estimate how long to continue the exposure of the second film.

Figure 29.2.1 illustrates representative immunoblot signals that can be detected when analyzing a series of membrane preparations from different P. pastoris clones expressing a FLAG-tagged ADRA1A receptor. This FLAG-specific immunodetection identifies various intensities of a principal band corresponding to the monomeric ADRA1A (see arrow), plus additional bands of SDS-resistant oligomeric forms of the receptor.

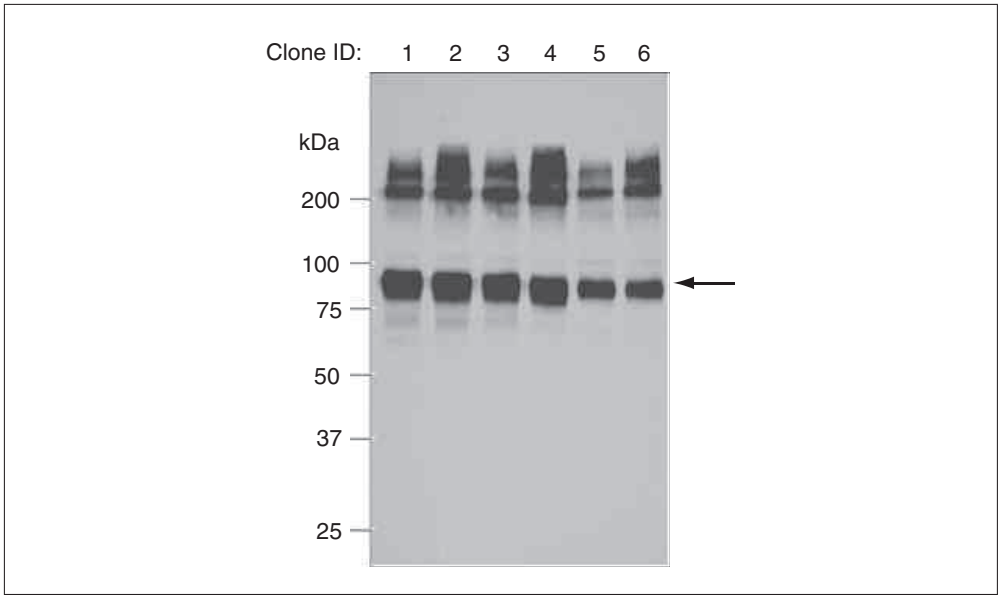


Figure 29.2.1 Immunoblot analysis of membrane proteins isolated from six different recombinant *P. pastoris* clones expressing a FLAG-tagged human ADRA1A receptor. Equal amounts of membrane proteins were loaded in each lane (10 μg). Proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel and immunoblotted with an M2 anti-FLAG antibody (1/8000 v/v). Molecular masses (kDa) are indicated on the left. The band corresponding to the immunodetected ADRA1A receptor is indicated by the arrow on the right. Bands of higher molecular weight most likely correspond to SDS-resistant oligomeric forms of the receptor.

ALTERNATE PROTOCOL

ANALYSIS OF MEMBRANES EXPRESSING A GPCR: DOT-BLOT IMMUNODETECTION

While immunoblot analysis (Basic Protocol 5) yields useful information on both the expression levels and the size and integrity of the immunodetected protein of interest, the throughput is generally low. Actually, SDS-PAGE separation and protein transfer onto membranes require a number of handling steps that are not really adapted for the comparison of dozens of samples obtained from a large panel of recombinant EMP-expressing clones. In such a situation, screening for the best expressing clones can be more readily achieved by a dot-blot approach such as that described below.

Additional Materials *(also see Basic Protocol 5)*

Phosphate-buffered saline (PBS; *APPENDIX 2E*)
Membrane preparation samples (from Basic Protocol 4)

Nitrocellulose membrane
Microfiltration-blotting device (e.g., Bio-Dot apparatus from Bio-Rad)

1. Prewet a piece of nitrocellulose membrane with PBS and fix it tightly it into the microfiltration-blotting device following the manufacturer's instructions.
2. Pipet 100 µl PBS into each well of the blotting device and let it flow through the nitrocellulose membrane by applying the vacuum.
3. Turn the vacuum off and pipet 5 to 10 µg of membrane protein samples into the appropriate wells. Incubate 5 min at room temperature before applying the vacuum.
4. Turn the vacuum on and wash the wells three times, each time with 100 µl PBS.
5. Remove the nitrocellulose membrane from the blotting device and proceed to the blocking and immunodetection reactions as described in Basic Protocol 5, steps 3 to 13.

Figure 29.2.2 exemplifies how such a protocol could be helpful for comparing the expression levels not only between different GPCRs expressed in P. pastoris, but also between different clones expressing the same GPCR and between different expression conditions assayed.

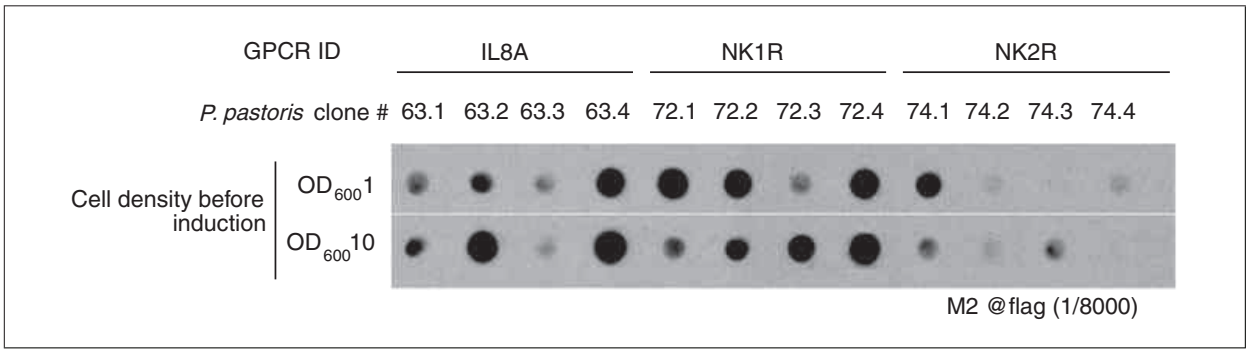


Figure 29.2.2 Dot-blot comparison of membrane proteins from different *P. pastoris* clones expressing three different FLAG-tagged human GPCRs (IL8A, NK1R, and NK2R). For each of the three GPCRs, four different clones were grown in parallel to two different cell densities before induction (OD_{600} 1 and OD_{600} 10, i.e., 5×10^7 and 5×10^8 cells/ml, respectively). Equal amounts of corresponding membrane proteins (5 µg) were then loaded in each well of the blotting device and immunoblotted with M2 anti-FLAG antibody (1/8000, v/v).

LIGAND-BINDING ANALYSIS OF MEMBRANES EXPRESSING A GPCR

BASIC PROTOCOL 6

Contrary to the immunodetection tests, activity assays are often complicated to set up with membrane samples. This is particularly true for EMPs such as transporters or channels that necessitate two close compartments to exert their function, so activity assays are usually not applicable to membrane preparations. However, when available, such assays are of great interest since they provide clues about both the yields and the functionality of the expressed EMP. In the case of GPCRs, ligand-binding assays are valuable to determine the amounts of active receptors (B_{max}) in a membrane preparation and their affinity (K_d) for specific ligands. This protocol assesses the ligand-binding parameters of the ADRA1A receptor toward a specific radiolabeled antagonist. In brief, membrane preparations are incubated in triplicate with a given concentration of radioactive ligands until equilibrium is reached. For determination of nonspecific binding, similar incubations are performed in parallel in the presence of an excess of unlabeled specific ligand. Bound and free ligands are separated by rapid filtration on glass-fiber filters and the retained radioactivity is measured by liquid-scintillation counting. Saturation curves are obtained with increasing concentrations of radioligand and data are analyzed by nonlinear regression with appropriate software (Prism4 from GraphPad Software or KaleidaGraph from Synergy Software). For a more detailed description of the theoretical aspects of ligand binding assays, see Bylund (2007).

Materials

Membrane preparation samples (from Basic Protocol 4)
Ice-cold binding buffer (see recipe)
Prasozin
[^{3}H]-Prasozin (Perkin Elmer, cat. no. NET823250UC)
Filter buffer (see recipe)
Ice-cold wash buffer (see recipe)
Scintillation cocktail (e.g., Ultima Gold scintillation fluid from Perkin Elmer)

Low-protein-binding polyethylene tubes (e.g., MiniSorp tubes from Nunc)
Shaking incubator
GF/B grade glass-fiber filters (the format will depend on the filtration apparatus employed)
Manifold vacuum filtration apparatus or larger harvester (e.g., 48-sample semi-auto harvester from Brandel)
Scintillation vials (e.g., 6.5-ml vials from Symport)
Scintillation counter
Software (e.g., Prism4 from GraphPad Software or KaleidaGraph from Synergy Software)

Incubate membranes and ADRA1A-specific ligands

1. Thaw and homogenize membrane preparations on ice.

2. For each concentration of [^{3}H]-Prasozin assayed (e.g., 1, 2, 5, 10, and 20 nM), label three tubes for total (T) binding and three additional tubes for nonspecific (NS) binding.

   Ligand-binding experiments are usually performed in triplicate, but can alternatively be conducted in duplicate when appropriate (e.g., for cost considerations).

3. Add 160 µl binding buffer containing 10 µg of membrane proteins to each T- and NS-labeled tube.

4. Add 20 µl binding buffer to the T tubes and 20 µl of 100 µM nonradioactive prazosin (final concentration 10 µM) to the NS tubes so that the total volume in each case is 180 µl.

5. Finally, add to each tube 20 µl of 10-fold concentrated radioactive [^{3}H]-Prasozin to attain 1, 2, 5, 10, and 20 nM in a final volume of 200 µl.

6. Carefully mix the solutions by pipetting.

7. Incubate at room temperature on a shaker for 1 hr to achieve ligand-binding equilibrium.

8. During the incubation or at least 15 min prior to filtration, presoak the GF/B filters in filter buffer.

Separate free from bound ligands and analyze

9. Terminate the reactions by a rapid filtration of the samples through the presoaked GF/B filters using a vacuum manifold according to the manufacturer's instructions.

10. Wash the filters three times, each time with 5 ml of ice-cold wash buffer.

11. Transfer the filters into scintillation vials and add 3 ml of scintillation cocktails.

12. Incubate the vials 2 hr in the dark at room temperature before proceeding to counting.

13. Subtract the NS from the T values to determine specific binding values. Analyze the data by nonlinear regression using appropriate software.

Figure 29.2.3 depicts a ligand-binding saturation curve obtained with Prism4 (GraphPad) using membranes of a P. pastoris clone expressing the ADRA1A receptor.

When the ligand-binding assay is properly set up, NS binding should be 10% to 20% of the T values. If the NS binding is elevated and makes up more than 50% of the T binding, the assay needs to be refined (see useful troubleshooting guides in Bylund, 2007). If the T binding remains low and close to the NS values regardless of the radioligand concentration, this signifies a low specific binding representative of an expressed receptor with poor activity. In this case, several parameters can be adjusted for optimal expression, such as the duration and the temperature of the induction phase, as well as the media formulation, including the methanol concentration and the use of additive compounds. These different aspects are discussed in the Commentary.

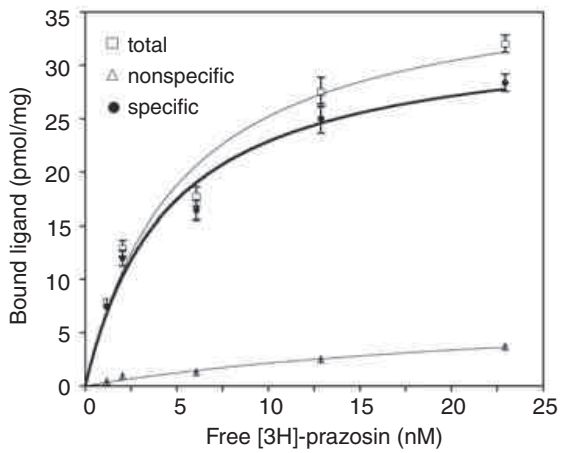


Figure 29.2.3 Radioligand binding saturation curve determined on membranes of *P. pastoris* cells expressing a FLAG-tagged human ADRA1A receptor. The specific binding curve (black circles) was calculated by subtracting nonspecific (triangles) from total (squares) binding values. The results shown are from three independent experiments. Data were fitted using the one-site saturation binding model.

REAGENTS AND SOLUTIONS

Use Milli-Q-purified water or equivalent in all recipes and protocol steps. For common stock solutions, see ***APPENDIX 2E****; for suppliers, see* ***SUPPLIERS APPENDIX****.*

Binding buffer

30 mM HEPES, pH 7.5
150 mM NaCl
1 mg/ml BSA
Prepare fresh

Blocking solution

Blotting buffer (see recipe) with 5% (w/v) nonfat dry milk
Prepare fresh

Blotting buffer

25 mM Tris·Cl, pH 7.4 (*APPENDIX 2E*)
0.15 M NaCl
0.1 % (v/v) Tween 20
Prepare fresh

BMGY medium

For 1 liter of BMGY solution, prepare 700 ml of YEP (10 g yeast extract, 20 g peptone and complete with deionized water) and sterilize by autoclaving.
Just before use, sterilely add the following volumes of filter-sterilized stock solutions:
100 ml of 13.4% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acid (10× stock solution)
100 ml of 10 % (v/v) glycerol (10× stock solution)
100 ml of 1 M phosphate buffer, pH 6 (10× stock solution)
2 ml of 0.02 % (w/v) biotin (500× stock solution)

YEP and other 10× stock solutions can be stored up to 6 months at 4°C

BMMY medium

For 1 liter of BMMY, proceed the same as for BMGY with 100 ml of 5% methanol (10× stock solution) instead of glycerol

Filter buffer

50 mM Tris·Cl, pH 7.4 (*APPENDIX 2E*)
0.3 % (v/v) polyethylenimine
Prepare fresh

LB medium

10 g tryptone
5 g yeast extract
10 g NaCl
Bring to a final volume of 1 liter with water
Heat sterilize in an autoclave
Store up to 6 months at 4°C

MD plates

1.34 g yeast nitrogen base w/o amino acids
2 g dextrose
2 g agar

continued

Bring to a final volume of 100 ml with water
Heat sterilize in an autoclave
Let the solution cool to about 50°C and sterilely pour into petri dishes
Store up to 1 month at 4°C

SOC medium

5 g yeast extract
20 g tryptone
580 mg NaCl
186 mg KCl
940 mg $MgCl_2$
1.2 g $MgSO_4$
3.6 g glucose
Bring to a final volume of 1 liter with water
Heat sterilize in autoclave
Divide into 5- to 10-ml sterile aliquots
Store up to 6 months at 4°C

TN buffer

50 mM Tris·Cl, pH 7.4 (*APPENDIX 2E*)
0.5 M NaCl
2 mM DTT
1 mM PMSF
5% (v/v) glycerol
Prepare fresh

TNE buffer

50 mM Tris·Cl, pH 7.4 (*APPENDIX 2E*)
0.5 M NaCl
5 mM EDTA
2 mM DTT
1 mM PMSF
5 % (v/v) glycerol
Prepare fresh

Wash buffer

50 mM Tris·Cl, pH 7.4 (*APPENDIX 2E*)
Prepare fresh from a 1 M Tris·Cl, pH 7.4 stock solution

YPD agar plate

10 g yeast extract
20 g peptone
20 g dextrose
20 g bacto agar
Bring to a final volume of 1 liter with water
Heat sterilize in autoclave
Let the solution cool to about 50°C and sterilely pour into petri dishes
Store up to 1 month at 4°C

YPD rich medium

10 g yeast extract
20 g peptone

continued

20 g dextrose
Bring to a final volume of 1 liter with water
Heat sterilize in an autoclave
Store up to 6 months at 4°C

COMMENTARY

Background Information

The success of *P. pastoris* as an efficient protein production factory is attributable to a series of advantages related to both its yeast nature and its particular methylotrophic metabolism. This organism has a short generation time (2 hr), grows on very simple and inexpensive media, and is very easy to handle. A comprehensive panel of plasmids and strategies is available for the expression of recombinant genes, and genetic manipulation is nearly as straightforward as for *Saccharomyces cerevisiae*. As a methylotroph, *P. pastoris* possesses a peculiar methanol utilization pathway relying on some of the strongest and most tightly regulated known promoters that can be used to obtain very high levels of expression of recombinant genes. In addition, *P. pastoris* can reach very high cell densities (up to 130 g/liter dry cell weight; Cereghino and Cregg, 2000). Also, a variety of fermentation processes and formats has been developed in the industry so that scale-up of protein production is easily achievable. Contrary to *E. coli*, *P. pastoris* is a eukaryotic microorganism capable of complex post-translational modifications including disulfide isomerization, sulfation, phosphorylation, amino-terminal acetylation, carboxy-terminal methylation, myristoylation, farnesylation, and glycosylation (reviewed in Eckart, and Bussineau, 1996), which are often essential for proper targeting, biological activity and stability of the expressed recombinant proteins. Regarding glycosylation, which is particularly critical for many EMPs, *P. pastoris* has been shown to graft shorter and more authentic oligosaccharide chains to proteins than does *S. cerevisiae* (Grinna and Tschopp, 1989), and therefore often appears as a more appropriate system (Li et al., 2007). Finally, ^{15}N and ^{13}C isotopic labeling of recombinant proteins for NMR or spectrometric studies is also achievable with *P. pastoris*, both in a uniform mode using isotopically enriched nitrogen and carbon sources (Wood and Komives, 1999), or more selectively using amino acid isotopes and engineered auxotroph strains (Whittaker and Whittaker, 2005).

There are a few disadvantages to the use of *P. pastoris* as an expression system for EMPs. First, a common characteristic for eukaryotic systems that efficiently overproduce proteins, an overload of the translocation and folding machineries in *P. pastoris* often creates a stress that triggers the activation of sorting and degradation processes and results in lowered expression levels and heterogeneity of recombinant proteins. Moreover, if glycosylation processes occur in a fashion acceptable for many recombinant proteins, *P. pastoris* is not able to graft the complex carbohydrate motifs that are sometimes critical for the functionality of mammalian proteins. In addition, nonhomogeneous N-glycosylation of recombinant proteins is frequently observed, leading to some degrees of heterogeneity (Weiss et al., 1998; Tate et al., 2003; Shukla et al., 2007) that can be detrimental in various applications, including structural studies. Recently, several strains have been engineered to generate more complex and more homogeneous N-glycosylations (reviewed in Hamilton and Gerngross, 2007). These strains exhibited protein-dependent but promising outcomes, thereby also demonstrating all the potential and possibilities that could be gained from these genetic engineering approaches.

Another characteristic that can have a direct impact on the expression of mammalian membrane proteins is related to the lipidic composition of yeast membranes, which varies significantly from that of higher eukaryotes membranes (Opekarova and Tanner, 2003). As MPs require specific lipids for their proper functions or for correct folding and stability, these differences may influence both the expression level and functionality of recombinant membrane proteins. This was reported in studies where the absence of cholesterol in *P. pastoris* membranes was shown to alter the activity and stability of recombinant EMPs (Lifshitz et al., 2007).

The first use of *P. pastoris* as a host for the expression of an integral EMP was reported in 1995 when Helmut Reilander and his colleagues successfully expressed the mouse serotonin receptor 5-HT_{5A} (Weiss et al., 1995), a member of the GPCR family. Since then, hundreds of references reported on the expression of more than 150 different EMPs in *P. pastoris* (Alkhalfioui et al., 2011). In this

list where only integral EMPs are considered, all classes of EMPs are equally represented. This includes monotopic receptors and enzymes, several aquaporins and ion channels, many members of the GPCR family, as well as large polytopic transporters bearing up to 17 putative transmembrane domains. This survey also highlights the great potential of *P. pastoris* for co-expression approaches, including studies on membrane subunits of multimeric protein complexes and several EMP-protein interactions, in strategies where the co-expressed genes are either borne on a same vector or on two distinct vectors. Successful co-expression was actually recorded for the α and β subunits of Na/K-ATPase (Cohen et al., 2005; Haviv et al., 2007; Reina et al., 2007) and for α/β and phospholemman (a membrane modulator of the enzyme; Lifshitz et al., 2007). Similarly, co-expression strategies were also reported for Kv1.2, a membrane subunit, and Kvβ2, a cytosoluble partner, of the rat voltage-dependent K^+ channel (Parcej and Eckhardt-Strelau, 2003; Long et al., 2005, 2007).

Remarkably, a dozen high-resolution structures were obtained, which represent about one-fourth of the recombinantly produced EMPs for which a 3D structure is available as of January 2011 (*http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html*). Overall, these records highlight *P. pastoris* as one of the better performing heterologous expression systems for structural studies of EMPs.

Critical Parameters and Troubleshooting

As is true for many other expression systems, the performance of the system not only depends on the expressed EMP but also on the experimental conditions applied. Therefore, optimization of expression conditions is often very helpful for the recovery of higher amounts of functional recombinant EMPs. From the seminal work of Weiss et al. (1995), more than 30 original articles relative to a hundred different GPCRs expressed in *P. pastoris* have been published thus far, representing an ideal source of data to exemplify the different directions that can be undertaken to enhance the expression levels of EMPs.

First, as mentioned in Basic Protocol 1, adjustments of the coding sequence, the fused tags and the gene dosage are often beneficial for improving the expression levels of functional GPCRs (Weiss et al., 1998; Sarramegna et al., 2002; Grunewald et al., 2004). Importantly, it is often observed for a given GPCR that clones presenting the highest amounts of immunodetected receptors rarely exhibit the highest ligand-binding activities. This strongly suggests that bottlenecks for production of functional receptors not only lie in the transcription and translation steps, but also in folding and/or posttranslational processing.

Accordingly, further improvements can be implemented by appropriately adjusting some of the experimental parameters that influence the host cell physiology, hence its performance for heterologous gene expression, correct protein folding, and proper trafficking.

As a first step, evaluating the production time-course of a GPCR often reveals very useful information, as the outcome may vary significantly from one receptor to another. For instance, 10 hr was determined as the optimal induction time for different constructs expressing a mu opioid receptor (Sarramegna et al., 2002), whereas the highest expression levels were obtained in the range of 18 to 24 hr post-induction for a majority of other receptors, and up to 60 hr for an engineered ACM2 muscarinic receptor (Yurugi-Kobayashi et al., 2009). Similarly, while the induction phase in methanol-containing media is usually performed using cell densities of about 5×10^7 cells/ml (1 OD_{600}/ml), we observed that this parameter differentially affected the expression level of GPCRs, with higher cell densities (up to 10 OD_{600}/ml) actually being more appropriate for several of them (see Fig. 29.2.2).

Formulation of the induction media is also an important issue. Adjustments in the composition of buffered media, pH values, and methanol concentration usually do not yield major increases in GPCR expression, and a typical induction is generally performed at pH 5-7 in buffered complex-media containing 0.5% (v/v) methanol. Much more substantial improvements, however, can be gained by supplementing these media with some small compounds that are believed to facilitate the folding and processing of the recombinant proteins. Among these molecules, dimethyl sulfoxide (DMSO) added in the induction medium remarkably increased the production yield of 16 out of 20 tested receptors up to six-fold relative to standard conditions (André et al., 2006). DMSO possibly influences the translocation of membrane proteins and is also believed to act as a stabilizer of folding intermediates, therefore, qualifying as a chemical chaperone (Bernier et al., 2004). In a comparable fashion, adding ligands specific

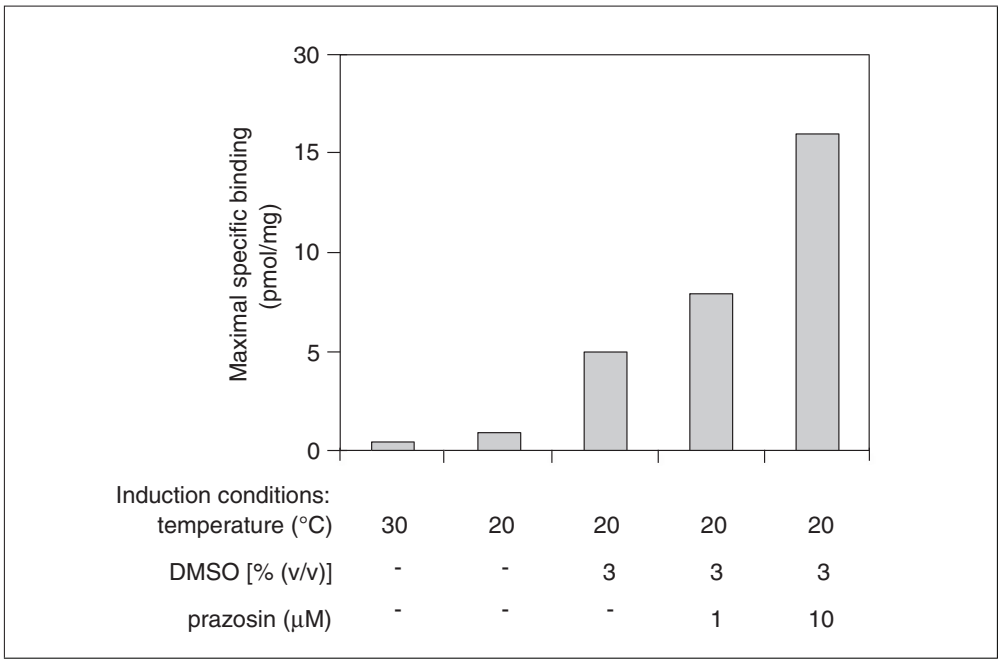


Figure 29.2.4 Impact of three induction parameters on the total number of binding sites of the human ADRA1A receptor expressed in *P. pastoris*. The different parameters were applied in parallel experiments during the induction phase (see Basic Protocol 3) with the same *P. pastoris* clone expressing ADRA1A receptors. After cell lysis and membrane preparation (Basic Protocol 4), maximal specific ligand binding sites (B_{max}) were assessed (Basic Protocol 6) and compared. DMSO (dimethyl sulfoxide) and/or prazosin, an ADRA1-selective antagonist, were directly added to the BMMY induction medium.

to a given GPCR proved highly beneficial for a large majority of tested receptors (André et al., 2006). Such small molecules are considered pharmacological chaperones, as they have been shown to selectivity promote the proper folding and trafficking of the targeted GPCR (Bernier et al., 2004). In addition, it was shown in several studies that lowering temperature during expression to a typical range of 18° to 24°C was optimal for various receptors, as measured by ligand binding. Possible explanations for the temperature effect include slowing of protein production and no overload of the translocation machinery, protein processing, or intracellular trafficking. Lowering the temperature has also been shown to reduce proteolytic activities and up-regulate cold-shock proteins such as chaperones.

Adjusting these different parameters can allow determination of culture conditions that enhance expression levels of active GPCRs. Figure 29.2.4 illustrates how a restricted array of culturing conditions dramatically improved the amount of active ADRA1A receptors in *P. pastoris* membranes, raising the total number of binding sites (B_{max}) from less than 0.5 pmol/mg in the standard context (30°C) to more than 15 pmol/mg in optimized conditions.

Importantly, when the B_{max} is significantly increased upon optimization, it is usually observed that the total amount of receptors remains unchanged (André et al., 2006). This recurrent observation with GPCRs and other membrane proteins strongly suggests that EMPs are expressed in *P. pastoris* under a functional/nonfunctional equilibrium that can be modulated as a function of the expression conditions that are used.

Accordingly, and aside from the improvements that could be applied at the genetic level (optimization of the coding sequence, fused tags and gene dosage), a systematic approach for the successful expression of a given EMP in *P. pastoris* is to perform a primary screen for a set of separate expression conditions by varying time, temperature, and additives (DMSO, ligand, etc.). Further improvement could then be gained by combining and refining every positive parameter as a subsequent screen.

Anticipated Results

The protocols described in this unit provide a convenient starting point for expression of any EMP in *P. pastoris*. As mentioned, more than 150 EMPs of various origins and types have been successfully overexpressed with this system, and the related reports can

serve as good starting references. Using such methodologies along with the optimizations mentioned above, the authors have contributed to successful expression of dozens of GPCRs (André et al., 2006; Lundstrom et al., 2006), a number of them being produced at levels greater than 25 pmol of active receptors per mg of membranes, which roughly corresponds to about 1 mg of active receptor per liter of yeast culture (Sarramegna et al., 2003).

Time Considerations

When employing *P. pastoris* for the recombinant expression of EMPs, the required time between DNA cloning and getting a validated expressing clone is somewhat longer than with cell-free or bacterial systems, but the system is much more straightforward compared to other stable eukaryotic expression systems. Actually, once the expression vector has been designed, it typically takes less than one month to perform all the steps for identification of an expressing clone, with a time schedule that can be summarized as follows:

1. *Yeast transformation:* Starting from a freshly streaked colony, 1 day is needed for the preparation of yeast competent cells and their subsequent electro-transformation, and 2 to 4 days are required for the growth of recombinant clones on an agar plate. The second step of phenotypic selection for multicopy transformants then requires 2 to 3 additional days;

2. *Expression step:* Starting from a recombinant colony freshly isolated on a YPD agar plate, cultures of small to large volumes of cells (10 ml to 10 liters) need around 3 days, including 2 days for preculturing in a BMGY medium plus another 1 day for methanol induction in a BMMY medium;

3. *Sample preparation and analysis:* Yeast cell lysis and membrane preparation can be performed in one day, and analyses by immunoblotting and ligand-binding activity assays generally takes 2 to 3 more days in the case of GPCR expression.

Accordingly, a clone evaluated in standard expression conditions can be obtained in 2 to 3 weeks. From there, the number of conditions that can be further screened for optimizing the yield and functionality of the expressed EMP will determine the additional time needed.

Acknowledgements

The authors are supported by the CNRS and the University of Strasbourg, and by grants from French research agencies (ANR-07-PCVI-0024, CIFRE 706/2009, and CIFRE 651/2010).

Literature Cited

Alkhalfioui, F., Logez, C., Bornert, O., and Wagner, R. 2011. Expression systems: *Pichia pastoris*. *In* Production of Membrane Proteins—Strategies for Expression and Isolation (A.S. Robinson, ed.) pp. 75-108. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Aller, S.G. and Unger, V.M. 2006. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:3627-3632.

Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., and Chang, G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323:1718-1722.

André, N., Cherouati, N., Prual, C., Steffan, T., Zeder-Lutz, G., Magnin, T., Pattus, F., Michel, H., Wagner, R., and Reinhart, C. 2006. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* 15:1115-1126.

Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D.G., and Bouvier, M. 2004. Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* 15:222-228.

Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D.E., and Mattevi, A. 2002. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* 9:22-26.

Bylund, D.B. 2007. Characterization of Adrenoceptors. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 36:1.5.1-1.5.18.

Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.

Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., and Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:329-332.

Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D.M., Ebel, C., Le Maire, M., and Karlish, S.J.D. 2005. Purification of Na, K-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 280:16610-16618.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., and Valero, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb. Cell Fact.* 5:17.

Cregg, J.M. and Madden, K.R. 1987. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants

of *Pichia pastoris* gene disruption. *Biol. Res. Yeasts* II:1-18.

Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, A. J., Madden, K., and Chappell, T. 2010. Expression of recombinant genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Protoc. Essential Lab. Techn.* 4:13.2.1-13.2.14.

Eckart, M.R. and Bussineau, C.M. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:525-530.

Elion, E. A., Marina, P., and Yu, L. 2007. Constructing recombinant DNA molecules by PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 78:3.17.1-3.17.12.

Fischer, G., Kosinska-Eriksson, U., Aponte-Santamaria, C., Palmgren, M., Geijer, C., Hedfalk, K., Hohmann, S., de Groot, B.L., Neutze, R., and Lindkvist-Petersson, K. 2009. Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 Å reveals a novel gating mechanism. *PLOS Biol.* 7:e1000130.

Grinna, L.S. and Tschopp, J.F. 1989. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* 5:107-115.

Grunewald, S., Haase, W., Molsberger, E., Michel, H., and Reilander, H. 2004. Production of the human D2S receptor in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *Receptors Channels* 10:37-50.

Hamilton, S.R. and Gerngross, T.U. 2007. Glycosylation engineering in yeast: The advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:387-392.

Hartner, F.S. and Glieder, A. 2006. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb. Cell Fact.* 5:39.

Haviv, H., Cohen, E., Lifshitz, Y., Tal, D.M., Goldshleger, R., and Karlish, S.J.D. 2007. Stabilization of Na^+,K^+-ATPase purified from *Pichia pastoris* membranes by specific interactions with lipids. *Biochemistry* 46:12855-12867.

Horsefield, R., Nordén, K., Fellert, M., Backmark, A., Tornroth-Horsefield, S., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kvassman, J., Kjellbom, P., Johanson, U., and Neutze, R. 2008. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:13327-13332.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgünes, N., and Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142:105-124.

Lifshitz, Y., Petrovich, E., Haviv, H., Goldshleger, R., Tal, D.M., Garty, H., and Karlish, S.J.D. 2007. Purification of the human α2 isoform of Na, K-ATPase expressed in *Pichia pastoris*. Stabilization by lipids and FXYD1. *Biochemistry* 46:14937-14950.

Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. *Science* 309:897-903.

Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. 2007. Atomic structure of a voltage dependent K+ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376-382.

Lundstrom, K., Wagner, R., Reinhart, C., Desmyter, A., Cherouati, N., Magnin, T., Zeder-Lutz, G., Courtot, M., Prual, C., André, N., Hassaine, G., Michel, H., Cambillau, C., and Pattus, F. 2006. Structural genomics on membrane proteins : Comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems. *J. Struct. Funct. Genomics* 7:77-91.

Martinez Molina, D., Wetterholm, A., Kohl, A., McCarthy, A.A., Niegowski, D., Ohlson, E., Hammarberg, T., Eshaghi, S., Haeggstrom, J.Z., and Nordlund, P. 2007. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature* 448:613-617.

Opekarova, M. and Tanner, W. 2003. Specific lipid requirements of membrane protein—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1610:11-22.

Parcej, D.N. and Eckhardt-Strelau, L. 2003. Structural characterization of neuronal voltage-sensitive K^+ channels heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *J. Mol. Biol.* 333:103-116.

Reina, C., Padoani, G., Carotti, C., Merico, A., Tripodi, G., Ferrari, P., and Popolo, L. 2007. Expression of the α3/β1 isoform of human Na,K-ATPase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.*FEMS Yeast Res.* 7:585-594.

Reinhart, C. and Krettler, C. 2006. Expression of membrane proteins in yeasts. *In* Structural Genomics and Rational Drug Design in Membrane Proteins (K. Lundstrom, ed.) pp. 115-152. Marcel Dekker, New York.

Sarramegna, V., Talmont, F., Seree de Roch, M., Milon, A., and Demange, P. 2002. Green fluorescent protein as a reporter of human μ-opioid receptor overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 99:23-39.

Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., and Milon, A. 2003. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems fron the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol. Life Sci.* 60:1529-1546.

Shukla, A.K., Haase, W., Reinhart, C., and Michel, H. 2007. Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:931-942.

Struhl, K. 2000. Subcloning of DNA fragments. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 13:3.16.1-3.16.2.

Tao, X., Avalos, J.L., Chen, J., and MacKinnon, R. 2009. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K^+ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 326:1668-1674.

Tate, C.G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y., and Williams, D.C. 2003.

Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1160:141-153.

Tornroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., and Kjellbom, P. 2006. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439:688-694.

Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., and Reilander, H. 1995. Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.* 377:451-456.

Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., and Reilander, H. 1998. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human β2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* 330:1137-1147.

White, C.E., Hunter, M.J., Meininger, D.P., White, L.R., and Komives, E.A. 1995. Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: The roles of the sixth domain and of methionine 388. *Protein Eng.* 8:1177-1187.

Whittaker, M.M. and Whittaker, J.W. 2005. Construction and characterization of *Pichia pastoris* strains for labeling aromatic amino acids in recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 41:266-274.

Wood, M.J. and Komives, E.A. 1999. Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *J. Biomol. NMR* 13:149-159.

Yurugi-Kobayashi, T., Asada, H., Shiroishi, M., Shimamura, T., Funamoto, S., Katsuta, N., Ito, K., Sugawara, T., Tokuda, N., Tsujimoto, H., Murata, T., Nomura, N., Haga, K., Haga, T., Iwata, S., and Kobayashi, T. 2009. Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380:271-276.

Références Bibliographiques

Acuna-Castroviejo D., Reiter R. J., Menendez-Pelaez A., Pablos M. I. and Burgos A. (1994). "Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver." J Pineal Res **16**(2): 100-112.

Adler E., Hoon M. A., Mueller K. L., Chandrashekar J., Ryba N. J. and Zuker C. S. (2000). "A novel family of mammalian taste receptors." Cell **100**(6): 693-702.

Akermoun M., Koglin M., Zvalova-Iooss D., Folschweiller N., Dowell S. J. and Gearing K. L. (2005). "Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells." Protein Expr Purif **44**(1): 65-74.

Alexandrov A. I., Mileni M., Chien E. Y., Hanson M. A. and Stevens R. C. (2008). "Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins." Structure **16**(3): 351-359.

Andre N., Cherouati N., Prual C., Steffan T., Zeder-Lutz G., Magnin T., Pattus F., Michel H., Wagner R. and Reinhart C. (2006). "Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in Pichia pastoris to levels required for structural studies via a single expression screen." Protein Sci **15**(5): 1115-1126.

Arcemisbehere L., Sen T., Boudier L., Balestre M. N., Gaibelet G., Detouillon E., Orcel H., Mendre C., Rahmeh R., Granier S., Vives C., Fieschi F., Damian M., Durroux T., Baneres J. L. and Mouillac B. (2010). "Leukotriene BLT2 receptor monomers activate the G(i2) GTP-binding protein more efficiently than dimers." J Biol Chem **285**(9): 6337-6347.

Arendt J. (1998). "Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology." Rev Reprod **3**(1): 13-22.

Arendt J. and Skene D. J. (2005). "Melatonin as a chronobiotic." Sleep Med Rev **9**(1): 25-39.

Armitage R. and Hoffmann R. F. (2001). "Sleep EEG, depression and gender." Sleep Med Rev **5**(3): 237-246.

Attwood T. K. and Findlay J. B. (1994). "Fingerprinting G-protein-coupled receptors." Protein Eng **7**(2): 195-203.

Audinot V., Bonnaud A., Grandcolas L., Rodriguez M., Nagel N., Galizzi J. P., Balik A., Messager S., Hazlerigg D. G., Barrett P., Delagrange P. and Boutin J. A. (2008). "Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors." Biochem Pharmacol **75**(10): 2007-2019.

Audinot V., Mailliet F., Lahaye-Brasseur C., Bonnaud A., Le Gall A., Amosse C., Dromaint S., Rodriguez M., Nagel N., Galizzi J. P., Malpaux B., Guillaumet G., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P., Delagrange P. and Boutin J. A. (2003). "New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**(6): 553-561.

Ayoub M. A., Couturier C., Lucas-Meunier E., Angers S., Fossier P., Bouvier M. and Jockers R. (2002). "Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(24): 21522-21528.

Ayoub M. A., Levoye A., Delagrange P. and Jockers R. (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Mol Pharmacol **66**(2): 312-321.

Baldwin J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." EMBO J **12**(4): 1693-1703.

Balik A., Kretschmannova K., Mazna P., Svobodova I. and Zemkova H. (2004). "Melatonin action in neonatal gonadotrophs." Physiol Res **53 Suppl 1**: S153-166.

Baneres J. L., Martin A., Hullot P., Girard J. P., Rossi J. C. and Parello J. (2003a). "Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1." J Mol Biol **329**(4): 801-814.

Baneres J. L., Mesnier D., Martin A., Joubert L., Dumuis A. and Bockaert J. (2005). "Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy." J Biol Chem **280**(21): 20253-20260.

Baneres J. L. and Mouillac B. (2012). "[Handling G-protein-coupled receptors: expression, purification and in vitro stabilization]." Med Sci (Paris) **28**(10): 837-844.

Baneres J. L. and Parello J. (2003b). "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**(4): 815-829.

Baneres J. L., Popot J. L. and Mouillac B. (2011). "New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors." Trends Biotechnol **29**(7): 314-322.

Barrett R. J., Lamson M. J., Johnson J. and Smith W. B. (2005). "Pharmacokinetics and safety of binodenoson after intravenous dose escalation in healthy volunteers." J Nucl Cardiol **12**(2): 166-171.

Barthelemy P., Ameduri B., Chabaud E., Popot J. L. and Pucci B. (1999). "Synthesis and preliminary assessments of ethyl-terminated perfluoroalkyl nonionic surfactants derived from tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane." Org Lett **1**(11): 1689-1692.

Bayburt T. H., Leitz A. J., Xie G., Oprian D. D. and Sligar S. G. (2007). "Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins." J Biol Chem **282**(20): 14875-14881.

Bayburt T. H. and Sligar S. G. (2010). "Membrane protein assembly into Nanodiscs." FEBS Lett **584**(9): 1721-1727.

Bazzacco P., Billon-Denis E., Sharma K. S., Catoire L. J., Mary S., Le Bon C., Point E., Baneres J. L., Durand G., Zito F., Pucci B. and Popot J. L. (2012). "Nonionic homopolymeric amphipols: application to membrane protein folding, cell-free synthesis, and solution nuclear magnetic resonance." Biochemistry **51**(7): 1416-1430.

Bazzacco P., Sharma K. S., Durand G., Giusti F., Ebel C., Popot J. L. and Pucci B. (2009). "Trapping and stabilization of integral membrane proteins by hydrophobically grafted glucose-based telomers." Biomacromolecules **10**(12): 3317-3326.

Becamel C., Alonso G., Galeotti N., Demey E., Jouin P., Ullmer C., Dumuis A., Bockaert J. and Marin P. (2002). "Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach." EMBO J **21**(10): 2332-2342.

Blum D., Galas M. C., Pintor A., Brouillet E., Ledent C., Muller C. E., Bantubungi K., Galluzzo M., Gall D., Cuvelier L., Rolland A. S., Popoli P. and Schiffmann S. N. (2003). "A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists." J Neurosci **23**(12): 5361-5369.

Bockaert J. (2012). "[G-protein coupled receptors. Nobel Prize 2012 for chemistry to Robert J. Lefkowitz and Brian Kobilka]." Med Sci (Paris) **28**(12): 1133-1137.

Bockaert J., Claeysen S., Becamel C., Pinloche S. and Dumuis A. (2002). "G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication." Int Rev Cytol **212**: 63-132.

Bockaert J., Perroy J., Becamel C., Marin P. and Fagni L. (2010). "GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies." Annu Rev Pharmacol Toxicol **50**: 89-109.

Bockaert J. and Pin J. P. (1998). "[Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]." C R Acad Sci III **321**(7): 529-551.

Bockaert J. and Pin J. P. (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-1729.

Bond R. A. and Ijzerman A. P. (2006). "Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery." Trends Pharmacol Sci **27**(2): 92-96.

Bornert O., Alkhalfioui F., Logez C. and Wagner R. (2012). "Overexpression of membrane proteins using Pichia pastoris." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 29**: Unit 29 22.

Bornert O., Moller T. C., Boeuf J., Candusso M. P., Wagner R., Martinez K. L. and Simonin F. (2013). "Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors." PLoS One **8**(2): e56336.

Bradbury A. R., Sidhu S., Dubel S. and McCafferty J. (2011). "Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies." Nat Biotechnol **29**(3): 245-254.

Breyton C., Pucci B. and Popot J. L. (2010). "Amphipols and fluorinated surfactants: Two alternatives to detergents for studying membrane proteins in vitro." Methods Mol Biol **601**: 219-245.

Brown A. J., Jupe S. and Briscoe C. P. (2005). "A family of fatty acid binding receptors." DNA Cell Biol **24**(1): 54-61.

Brown E. M., Pollak M. and Hebert S. C. (1998). "The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease." Annu Rev Med **49**: 15-29.

Browning C., Beresford I., Fraser N. and Giles H. (2000). "Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors." Br J Pharmacol **129**(5): 877-886.

Brydon L., Petit L., de Coppet P., Barrett P., Morgan P. J., Strosberg A. D. and Jockers R. (1999b). "Polymorphism and signalling of melatonin receptors." Reprod Nutr Dev **39**(3): 315-324.

Brydon L., Roka F., Petit L., de Coppet P., Tissot M., Barrett P., Morgan P. J., Nanoff C., Strosberg A. D. and Jockers R. (1999a). "Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins." Mol Endocrinol **13**(12): 2025-2038.

Bubenik G. A. (2002). "Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance." Dig Dis Sci **47**(10): 2336-2348.

Burgueno J., Blake D. J., Benson M. A., Tinsley C. L., Esapa C. T., Canela E. I., Penela P., Mallol J., Mayor F., Jr., Lluis C., Franco R. and Ciruela F. (2003). "The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin." J Biol Chem **278**(39): 37545-37552.

Cabrera-Vera T. M., Vanhauwe J., Thomas T. O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M. R. and Hamm H. E. (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." Endocr Rev **24**(6): 765-781.

Canas P. M., Porciuncula L. O., Cunha G. M., Silva C. G., Machado N. J., Oliveira J. M., Oliveira C. R. and Cunha R. A. (2009). "Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway." J Neurosci **29**(47): 14741-14751.

Cappuccio J. A., Blanchette C. D., Sulchek T. A., Arroyo E. S., Kralj J. M., Hinz A. K., Kuhn E. A., Chromy B. A., Segelke B. W., Rothschild K. J., Fletcher J. E., Katzen F., Peterson T. C., Kudlicki W. A., Bench G., Hoeprich P. D. and Coleman M. A. (2008). "Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles." Mol Cell Proteomics **7**(11): 2246-2253.

Catoire L. J., Damian M., Giusti F., Martin A., van Heijenoort C., Popot J. L., Guittet E. and Baneres J. L. (2010). "Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2." J Am Chem Soc **132**(26): 9049-9057.

Celinski K., Konturek S. J., Konturek P. C., Brzozowski T., Cichoz-Lach H., Slomka M., Malgorzata P., Bielanski W. and Reiter R. J. (2011). "Melatonin or L-tryptophan accelerates healing of gastroduodenal ulcers in patients treated with omeprazole." J Pineal Res **50**(4): 389-394.

Chabaud E., Barthelemy P., Mora N., Popot J. L. and Pucci B. (1998). "Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants." Biochimie **80**(5-6): 515-530.

Chae P. S., Rasmussen S. G., Rana R. R., Gotfryd K., Chandra R., Goren M. A., Kruse A. C., Nurva S., Loland C. J., Pierre Y., Drew D., Popot J. L., Picot D., Fox B. G., Guan L., Gether U., Byrne B., Kobilka B. and Gellman S. H. (2010). "Maltose-neopentyl glycol (MNG)

amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins." Nat Methods **7**(12): 1003-1008.

Charvolin D., Perez J. B., Rouviere F., Giusti F., Bazzacco P., Abdine A., Rappaport F., Martinez K. L. and Popot J. L. (2009). "The use of amphipols as universal molecular adapters to immobilize membrane proteins onto solid supports." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(2): 405-410.

Chaudhary S., Pak J. E., Gruswitz F., Sharma V. and Stroud R. M. (2012). "Overexpressing human membrane proteins in stably transfected and clonal human embryonic kidney 293S cells." Nat Protoc **7**(3): 453-466.

Chelikani P., Reeves P. J., Rajbhandary U. L. and Khorana H. G. (2006). "The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line." Protein Sci **15**(6): 1433-1440.

Chen J. F., Eltzschig H. K. and Fredholm B. B. (2013). "Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?" Nat Rev Drug Discov **12**(4): 265-286.

Chen J. F., Huang Z., Ma J., Zhu J., Moratalla R., Standaert D., Moskowitz M. A., Fink J. S. and Schwarzschild M. A. (1999). "A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice." J Neurosci **19**(21): 9192-9200.

Chen J. F., Xu K., Petzer J. P., Staal R., Xu Y. H., Beilstein M., Sonsalla P. K., Castagnoli K., Castagnoli N., Jr. and Schwarzschild M. A. (2001). "Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease." J Neurosci **21**(10): RC143.

Chen Z., Hague C., Hall R. A. and Minneman K. P. (2006). "Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction." J Biol Chem **281**(18): 12414-12420.

Cherezov V., Rosenbaum D. M., Hanson M. A., Rasmussen S. G., Thian F. S., Kobilka T. S., Choi H. J., Kuhn P., Weis W. I., Kobilka B. K. and Stevens R. C. (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." Science **318**(5854): 1258-1265.

Chien E. Y., Liu W., Zhao Q., Katritch V., Han G. W., Hanson M. A., Shi L., Newman A. H., Javitch J. A., Cherezov V. and Stevens R. C. (2010). "Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist." Science **330**(6007): 1091-1095.

Chou S. Y., Lee Y. C., Chen H. M., Chiang M. C., Lai H. L., Chang H. H., Wu Y. C., Sun C. N., Chien C. L., Lin Y. S., Wang S. C., Tung Y. Y., Chang C. and Chern Y. (2005). "CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model." J Neurochem **93**(2): 310-320.

Christoffers K. H., Li H. and Howells R. D. (2005). "Purification and mass spectrometric analysis of the delta opioid receptor." Brain Res Mol Brain Res **136**(1-2): 54-64.

Christoffers K. H., Li H., Keenan S. M. and Howells R. D. (2003). "Purification and mass spectrometric analysis of the mu opioid receptor." Brain Res Mol Brain Res **118**(1-2): 119-131.

Chun E., Thompson A. A., Liu W., Roth C. B., Griffith M. T., Katritch V., Kunken J., Xu F., Cherezov V., Hanson M. A. and Stevens R. C. (2012). "Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors." Structure **20**(6): 967-976.

Chun J., Goetzl E. J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K. R., Moolenaar W., Pyne S. and Tigyi G. (2002). "International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature." Pharmacol Rev **54**(2): 265-269.

Chung S., Funakoshi T. and Civelli O. (2008). "Orphan GPCR research." Br J Pharmacol **153 Suppl 1**: S339-346.

Dahlitz M., Alvarez B., Vignau J., English J., Arendt J. and Parkes J. D. (1991). "Delayed sleep phase syndrome response to melatonin." Lancet **337**(8750): 1121-1124.

Dahmane T., Damian M., Mary S., Popot J. L. and Baneres J. L. (2009). "Amphipol-assisted in vitro folding of G protein-coupled receptors." Biochemistry **48**(27): 6516-6521.

Dai S. S., Zhou Y. G., Li W., An J. H., Li P., Yang N., Chen X. Y., Xiong R. P., Liu P., Zhao Y., Shen H. Y., Zhu P. F. and Chen J. F. (2010). "Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury." J Neurosci **30**(16): 5802-5810.

Daly C. J. and McGrath J. C. (2003). "Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors." Pharmacol Ther **100**(2): 101-118.

Damian M., Marie J., Leyris J. P., Fehrentz J. A., Verdie P., Martinez J., Baneres J. L. and Mary S. (2012). "High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs." J Biol Chem **287**(6): 3630-3641.

Damian M., Martin A., Mesnier D., Pin J. P. and Baneres J. L. (2006). "Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins." EMBO J **25**(24): 5693-5702.

Daulat A. M., Maurice P., Froment C., Guillaume J. L., Broussard C., Monsarrat B., Delagrange P. and Jockers R. (2007). "Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions." Mol Cell Proteomics **6**(5): 835-844.

Daulat A. M., Maurice P. and Jockers R. (2009). "Recent methodological advances in the discovery of GPCR-associated protein complexes." Trends Pharmacol Sci **30**(2): 72-78.

Davenport A. P., Alexander S. P., Sharman J. L., Pawson A. J., Benson H. E., Monaghan A. E., Liew W. C., Mpamhanga C. P., Bonner T. I., Neubig R. R., Pin J. P., Spedding M. and Harmar A. J. (2013). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands." Pharmacol Rev **65**(3): 967-986.

Day P. W., Rasmussen S. G., Parnot C., Fung J. J., Masood A., Kobilka T. S., Yao X. J., Choi H. J., Weis W. I., Rohrer D. K. and Kobilka B. K. (2007). "A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography." Nat Methods **4**(11): 927-929.

de Jong L. A., Grunewald S., Franke J. P., Uges D. R. and Bischoff R. (2004). "Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from Pichia pastoris." Protein Expr Purif **33**(2): 176-184.

De Martelaere K., Lintermans B., Haegeman G. and Vanhoenacker P. (2007). "Novel interaction between the human 5-HT7 receptor isoforms and PLAC-24/eIF3k." Cell Signal **19**(2): 278-288.

Delagrange P. and Boutin J. A. (2006). "Therapeutic potential of melatonin ligands." Chronobiol Int **23**(1-2): 413-418.

Deupi X. and Kobilka B. K. (2010). "Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function." Physiology (Bethesda) **25**(5): 293-303.

Deupi X. and Standfuss J. (2011). "Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors." Curr Opin Struct Biol **21**(4): 541-551.

Devavry S., Legros C., Brasseur C., Cohen W., Guenin S. P., Delagrange P., Malpaux B., Ouvry C., Coge F., Nosjean O. and Boutin J. A. (2012). "Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT(1) and MT(2)." Eur J Pharmacol **677**(1-3): 15-21.

Diviani D., Lattion A. L., Abuin L., Staub O. and Cotecchia S. (2003). "The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis." J Biol Chem **278**(21): 19331-19340.

Dodevski I. and Pluckthun A. (2011). "Evolution of three human GPCRs for higher expression and stability." J Mol Biol **408**(4): 599-615.

Dore A. S., Robertson N., Errey J. C., Ng I., Hollenstein K., Tehan B., Hurrell E., Bennett K., Congreve M., Magnani F., Tate C. G., Weir M. and Marshall F. H. (2011). "Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine." Structure **19**(9): 1283-1293.

Drazen D. L., Bilu D., Bilbo S. D. and Nelson R. J. (2001). "Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(5): R1476-1482.

Drazen D. L. and Nelson R. J. (2001). "Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity." Neuroendocrinology **74**(3): 178-184.

Drechsler N., Frobel J., Jahreis G., Gopalswamy M., Balbach J., Bosse-Doenecke E. and Rudolph R. (2011). "Binding specificity of the ectodomain of the parathyroid hormone receptor." Biophys Chem **154**(2-3): 66-72.

Dubocovich M. L. (2006). "Agomelatine targets a range of major depressive disorder symptoms." Curr Opin Investig Drugs **7**(7): 670-680.

Dubocovich M. L., Delagrange P., Krause D. N., Sugden D., Cardinali D. P. and Olcese J. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors." Pharmacol Rev **62**(3): 343-380.

Dubocovich M. L. and Markowska M. (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." Endocrine **27**(2): 101-110.

Dufourny L., Levasseur A., Migaud M., Callebaut I., Pontarotti P., Malpaux B. and Monget P. (2008). "GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals." BMC Evol Biol **8**: 105.

Eltzschig H. K. (2009). "Adenosine: an old drug newly discovered." Anesthesiology **111**(4): 904-915.

Eltzschig H. K. and Carmeliet P. (2011). "Hypoxia and inflammation." N Engl J Med **364**(7): 656-665.

Eltzschig H. K. and Eckle T. (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." Nat Med **17**(11): 1391-1401.

Eltzschig H. K., Sitkovsky M. V. and Robson S. C. (2012). "Purinergic signaling during inflammation." N Engl J Med **367**(24): 2322-2333.

Erdmann A. A., Gao Z. G., Jung U., Foley J., Borenstein T., Jacobson K. A. and Fowler D. H. (2005). "Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo." Blood **105**(12): 4707-4714.

Fam S. R., Paquet M., Castleberry A. M., Oller H., Lee C. J., Traynelis S. F., Smith Y., Yun C. C. and Hall R. A. (2005). "P2Y1 receptor signaling is controlled by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 8042-8047.

Fernando H., Nagle G. T. and Rajarathnam K. (2007). "Thermodynamic characterization of interleukin-8 monomer binding to CXCR1 receptor N-terminal domain." FEBS J **274**(1): 241-251.

Foord S. M., Bonner T. I., Neubig R. R., Rosser E. M., Pin J. P., Davenport A. P., Spedding M. and Harmar A. J. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacol Rev **57**(2): 279-288.

Fraser N. J. (2006). "Expression and functional purification of a glycosylation deficient version of the human adenosine 2a receptor for structural studies." Protein Expr Purif **49**(1): 129-137.

Fredholm B. B. (2007). "Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair." Cell Death Differ **14**(7): 1315-1323.

Fredholm B. B., AP I. J., Jacobson K. A., Klotz K. N. and Linden J. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev **53**(4): 527-552.

Fredholm B. B., Chen J. F., Masino S. A. and Vaugeois J. M. (2005). "Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 385-412.

Fredholm B. B., Chern Y., Franco R. and Sitkovsky M. (2007). "Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling." Prog Neurobiol **83**(5): 263-276.

Fredriksson R., Lagerstrom M. C., Lundin L. G. and Schioth H. B. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.

Gan L., Alexander J. M., Wittelsberger A., Thomas B. and Rosenblatt M. (2006). "Large-scale purification and characterization of human parathyroid hormone-1 receptor stably expressed in HEK293S GnTI- cells." Protein Expr Purif **47**(1): 296-302.

Garcia-Maurino S., Pozo D., Calvo J. R. and Guerrero J. M. (2000). "Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines." J Pineal Res **29**(3): 129-137.

Garfinkel D., Laudon M., Nof D. and Zisapel N. (1995). "Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin." Lancet **346**(8974): 541-544.

Gether U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.

Gether U., Ballesteros J. A., Seifert R., Sanders-Bush E., Weinstein H. and Kobilka B. K. (1997). "Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility." J Biol Chem **272**(5): 2587-2590.

Gimpl G. and Fahrenholz F. (2002). "Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor." Biochim Biophys Acta **1564**(2): 384-392.

Girouard H., Chulak C., Lejossec M., Lamontagne D. and de Champlain J. (2001). "Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **19**(8): 1369-1377.

Gluck J. M., Koenig B. W. and Willbold D. (2011). "Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies." Anal Biochem **408**(1): 46-52.

Gohon Y., Dahmane T., Ruigrok R. W., Schuck P., Charvolin D., Rappaport F., Timmins P., Engelman D. M., Tribet C., Popot J. L. and Ebel C. (2008). "Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties." Biophys J **94**(9): 3523-3537.

Gohon Y., Giusti F., Prata C., Charvolin D., Timmins P., Ebel C., Tribet C. and Popot J. L. (2006). "Well-defined nanoparticles formed by hydrophobic assembly of a short and polydisperse random terpolymer, amphipol A8-35." Langmuir **22**(3): 1281-1290.

Gohon Y., Pavlov G., Timmins P., Tribet C., Popot J. L. and Ebel C. (2004). "Partial specific volume and solvent interactions of amphipol A8-35." Anal Biochem **334**(2): 318-334.

Gomez-Moreno G., Guardia J., Ferrera M. J., Cutando A. and Reiter R. J. (2010). "Melatonin in diseases of the oral cavity." Oral Dis **16**(3): 242-247.

Gorfine T. and Zisapel N. (2007). "Melatonin and the human hippocampus, a time dependent interplay." J Pineal Res **43**(1): 80-86.

Granier S., Kim S., Shafer A. M., Ratnala V. R., Fung J. J., Zare R. N. and Kobilka B. (2007). "Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies." J Biol Chem **282**(18): 13895-13905.

Granier S., Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Weis W. I. and Kobilka B. K. (2012). "Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole." Nature **485**(7398): 400-404.

Grenz A., Bauerle J. D., Dalton J. H., Ridyard D., Badulak A., Tak E., McNamee E. N., Clambey E., Moldovan R., Reyes G., Klawitter J., Ambler K., Magee K., Christians U., Brodsky K. S., Ravid K., Choi D. S., Wen J., Lukashev D., Blackburn M. R., Osswald H., Coe I. R., Nurnberg B., Haase V. H., Xia Y., Sitkovsky M. and Eltzschig H. K. (2012). "Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) regulates postischemic blood flow during acute kidney injury in mice." J Clin Invest **122**(2): 693-710.

Grisshammer R. (2009). "Purification of recombinant G-protein-coupled receptors." Methods Enzymol **463**: 631-645.

Gsandtner I., Charalambous C., Stefan E., Ogris E., Freissmuth M. and Zezula J. (2005). "Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. Direct binding of ARNO/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A2A adenosine receptor is necessary for sustained activation of the ERK/MAP kinase pathway." J Biol Chem **280**(36): 31898-31905.

Guillaume J. L., Daulat A. M., Maurice P., Levoye A., Migaud M., Brydon L., Malpaux B., Borg-Capra C. and Jockers R. (2008). "The PDZ protein mupp1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor." J Biol Chem **283**(24): 16762-16771.

Hamilton S. R. and Gerngross T. U. (2007). "Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast." Curr Opin Biotechnol **18**(5): 387-392.

Hanson M. A., Cherezov V., Griffith M. T., Roth C. B., Jaakola V. P., Chien E. Y., Velasquez J., Kuhn P. and Stevens R. C. (2008). "A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 A structure of the human beta2-adrenergic receptor." Structure **16**(6): 897-905.

Hardeland R., Pandi-Perumal S. R. and Cardinali D. P. (2006). "Melatonin." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 313-316.

Hasko G., Linden J., Cronstein B. and Pacher P. (2008). "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases." Nat Rev Drug Discov **7**(9): 759-770.

Hassaine G., Wagner R., Kempf J., Cherouati N., Hassaine N., Prual C., Andre N., Reinhart C., Pattus F. and Lundstrom K. (2006). "Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells." Protein Expr Purif **45**(2): 343-351.

He W., Miao F. J., Lin D. C., Schwandner R. T., Wang Z., Gao J., Chen J. L., Tian H. and Ling L. (2004). "Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors." Nature **429**(6988): 188-193.

Hermans E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **99**(1): 25-44.

Herxheimer A. (2005). "Jet lag." Clin Evid(13): 2178-2183.

Heydorn A., Sondergaard B. P., Ersboll B., Holst B., Nielsen F. C., Haft C. R., Whistler J. and Schwartz T. W. (2004). "A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP)." J Biol Chem **279**(52): 54291-54303.

Hill C. A., Fox A. N., Pitts R. J., Kent L. B., Tan P. L., Chrystal M. A., Cravchik A., Collins F. H., Robertson H. M. and Zwiebel L. J. (2002). "G protein-coupled receptors in Anopheles gambiae." Science **298**(5591): 176-178.

Hino T., Arakawa T., Iwanari H., Yurugi-Kobayashi T., Ikeda-Suno C., Nakada-Nakura Y., Kusano-Arai O., Weyand S., Shimamura T., Nomura N., Cameron A. D., Kobayashi T., Hamakubo T., Iwata S. and Murata T. (2012). "G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody." Nature **482**(7384): 237-240.

Holdgate G. A. and Ward W. H. (2005). "Measurements of binding thermodynamics in drug discovery." Drug Discov Today **10**(22): 1543-1550.

Hollenstein K., Kean J., Bortolato A., Cheng R. K., Dore A. S., Jazayeri A., Cooke R. M., Weir M. and Marshall F. H. (2013). "Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1." Nature **499**(7459): 438-443.

Hong W. X., Baker K. A., Ma X., Stevens R. C., Yeager M. and Zhang Q. (2010). "Design, synthesis, and properties of branch-chained maltoside detergents for stabilization and crystallization of integral membrane proteins: human connexin 26." Langmuir **26**(11): 8690-8696.

Horn F., Bettler E., Oliveira L., Campagne F., Cohen F. E. and Vriend G. (2003). "GPCRDB information system for G protein-coupled receptors." Nucleic Acids Res **31**(1): 294-297.

Horuk R. (2001). "Chemokine receptors." Cytokine Growth Factor Rev **12**(4): 313-335.

Huang H., Wang Z., Weng S. J., Sun X. H. and Yang X. L. (2013). "Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing." Prog Retin Eye Res **32**: 64-87.

Huang Z. L., Qu W. M., Eguchi N., Chen J. F., Schwarzschild M. A., Fredholm B. B., Urade Y. and Hayaishi O. (2005). "Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine." Nat Neurosci **8**(7): 858-859.

Hunt A. E., Al-Ghoul W. M., Gillette M. U. and Dubocovich M. L. (2001). "Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock." Am J Physiol Cell Physiol **280**(1): C110-118.

Inagaki S., Ghirlando R., White J. F., Gvozdenovic-Jeremic J., Northup J. K. and Grisshammer R. (2012). "Modulation of the interaction between neurotensin receptor NTS1 and Gq protein by lipid." J Mol Biol **417**(1-2): 95-111.

Insel P. A., Tang C. M., Hahntow I. and Michel M. C. (2007). "Impact of GPCRs in clinical medicine: monogenic diseases, genetic variants and drug targets." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 994-1005.

Jaakola V. P., Griffith M. T., Hanson M. A., Cherezov V., Chien E. Y., Lane J. R., Ijzerman A. P. and Stevens R. C. (2008). "The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist." Science **322**(5905): 1211-1217.

Jacobson K. A. (2009). "Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets." Handb Exp Pharmacol(193): 1-24.

Jacobson K. A. and Gao Z. G. (2006). "Adenosine receptors as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 247-264.

Jacoby E., Bouhelal R., Gerspacher M. and Seuwen K. (2006). "The 7 TM G-protein-coupled receptor target family." ChemMedChem **1**(8): 761-782.

Janecka A., Fichna J. and Janecki T. (2004). "Opioid receptors and their ligands." Curr Top Med Chem **4**(1): 1-17.

Jockers R., Maurice P., Boutin J. A. and Delagrange P. (2008). "Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?" Br J Pharmacol **154**(6): 1182-1195.

Johansson S. M., Yang J. N., Lindgren E. and Fredholm B. B. (2007). "Eliminating the antilipolytic adenosine A1 receptor does not lead to compensatory changes in the antilipolytic actions of PGE2 and nicotinic acid." Acta Physiol (Oxf) **190**(1): 87-96.

Josefsson L. G. (1999). "Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors." Gene **239**(2): 333-340.

Junge F., Luh L. M., Proverbio D., Schafer B., Abele R., Beyermann M., Dotsch V. and Bernhard F. (2010). "Modulation of G-protein coupled receptor sample quality by modified cell-free expression protocols: a case study of the human endothelin A receptor." J Struct Biol **172**(1): 94-106.

Kim T. K., Zhang R., Feng W., Cai J., Pierce W. and Song Z. H. (2005). "Expression and characterization of human CB1 cannabinoid receptor in methylotrophic yeast Pichia pastoris." Protein Expr Purif **40**(1): 60-70.

King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D. and Baldwin S. A. (2006). "Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets." Trends Pharmacol Sci **27**(8): 416-425.

Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Piehler J., Haase W., Hahn S., Dotsch V. and Bernhard F. (2007). "Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies." J Struct Biol **158**(3): 482-493.

Kobilka B. K. (1995). "Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor." Anal Biochem **231**(1): 269-271.

Kobilka B. K. (2007). "G protein coupled receptor structure and activation." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 794-807.

Kolakowski L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." Receptors Channels **2**(1): 1-7.

Korkmaz A., Topal T., Tan D. X. and Reiter R. J. (2009). "Role of melatonin in metabolic regulation." Rev Endocr Metab Disord **10**(4): 261-270.

Krause D. N., Barrios V. E. and Duckles S. P. (1995). "Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery." Eur J Pharmacol **276**(3): 207-213.

Kull B., Svenningsson P. and Fredholm B. B. (2000). "Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum." Mol Pharmacol **58**(4): 771-777.

Kumari T., Pant B. and Pardasani K. R. (2009). "A model for the evaluation of domain based classification of GPCR." Bioinformation **4**(4): 138-142.

Kuszak A. J., Pitchiaya S., Anand J. P., Mosberg H. I., Walter N. G. and Sunahara R. K. (2009). "Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2." J Biol Chem **284**(39): 26732-26741.

Lagane B., Gaibelet G., Meilhoc E., Masson J. M., Cezanne L. and Lopez A. (2000). "Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **275**(43): 33197-33200.

Lagerstrom M. C. and Schioth H. B. (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **7**(4): 339-357.

Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chissoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R. A., Muzny D. M., Scherer S. E., Bouck J. B., Sodergren E. J., Worley K. C., Rives C. M., Gorrell J. H., Metzker M. L., Naylor S. L., Kucherlapati R. S., Nelson D. L., Weinstock G. M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D. R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H. M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R. W., Federspiel N. A., Abola A. P., Proctor M. J., Myers R. M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D. R., Olson M. V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G. A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B. A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W. R., de la Bastide M., Dedhia N., Blocker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J. A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D. G., Burge C. B., Cerutti L., Chen H. C., Church D., Clamp M., Copley R. R., Doerks T., Eddy S. R., Eichler E. E., Furey T. S., Galagan J., Gilbert J. G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L. S., Jones T. A., Kasif S., Kaspryzk A., Kennedy S., Kent W. J., Kitts P., Koonin E. V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T. M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J. V., Mulder N., Pollara V. J., Ponting C. P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A. F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y. I., Wolfe K. H., Yang S. P., Yeh R. F., Collins F., Guyer M. S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K. A., Patrinos A., Morgan M. J., de Jong P., Catanese J. J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S. and Chen Y. J. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.

Lazarus M., Shen H. Y., Cherasse Y., Qu W. M., Huang Z. L., Bass C. E., Winsky-Sommerer R., Semba K., Fredholm B. B., Boison D., Hayaishi O., Urade Y. and Chen J. F. (2011).

"Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens." J Neurosci **31**(27): 10067-10075.

Lebon G., Bennett K., Jazayeri A. and Tate C. G. (2011a). "Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor." J Mol Biol **409**(3): 298-310.

Lebon G., Warne T., Edwards P. C., Bennett K., Langmead C. J., Leslie A. G. and Tate C. G. (2011b). "Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation." Nature **474**(7352): 521-525.

Lebon G., Warne T. and Tate C. G. (2012). "Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors." Curr Opin Struct Biol **22**(4): 482-490.

Ledent C., Vaugeois J. M., Schiffmann S. N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J. J., Costentin J., Heath J. K., Vassart G. and Parmentier M. (1997). "Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor." Nature **388**(6643): 674-678.

Leger D., Laudon M. and Zisapel N. (2004). "Nocturnal 6-sulfatoxymelatonin excretion in insomnia and its relation to the response to melatonin replacement therapy." Am J Med **116**(2): 91-95.

Legros C., Matthey U., Grelak T., Pedragona-Moreau S., Hassler W., Yous S., Thomas E., Suzenet F., Folleas B., Lefoulon F., Berthelot P., Caignard D. H., Guillaumet G., Delagrange P., Brayer J. L., Nosjean O. and Boutin J. A. (2013). "New Radioligands for Describing the Molecular Pharmacology of MT1 and MT2 Melatonin Receptors." Int J Mol Sci **14**(5): 8948-8962.

Leitz A. J., Bayburt T. H., Barnakov A. N., Springer B. A. and Sligar S. G. (2006). "Functional reconstitution of Beta2-adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology." Biotechniques **40**(5): 601-602, 604, 606, passim.

Leja-Szpak A., Jaworek J., Pierzchalski P. and Reiter R. J. (2010). "Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1)." J Pineal Res **49**(3): 248-255.

Lemoine P., Nir T., Laudon M. and Zisapel N. (2007). "Prolonged-release melatonin improves sleep quality and morning alertness in insomnia patients aged 55 years and older and has no withdrawal effects." J Sleep Res **16**(4): 372-380.

Leppamaki S., Partonen T., Vakkuri O., Lonnqvist J., Partinen M. and Laudon M. (2003). "Effect of controlled-release melatonin on sleep quality, mood, and quality of life in subjects with seasonal or weather-associated changes in mood and behaviour." Eur Neuropsychopharmacol **13**(3): 137-145.

Leproult R., Van Onderbergen A., L'Hermite-Baleriaux M., Van Cauter E. and Copinschi G. (2005). "Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(3): 298-304.

Levoye A., Dam J., Ayoub M. A., Guillaume J. L., Couturier C., Delagrange P. and Jockers R. (2006a). "The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization." EMBO J **25**(13): 3012-3023.

Levoye A., Jockers R., Ayoub M. A., Delagrange P., Savaskan E. and Guillaume J. L. (2006). "Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors." Chronobiol Int **23**(1-2): 419-426.

Lewy A. J., Bauer V. K., Cutler N. L. and Sack R. L. (1998). "Melatonin treatment of winter depression: a pilot study." Psychiatry Res **77**(1): 57-61.

Li W., Dai S., An J., Xiong R., Li P., Chen X., Zhao Y., Liu P., Wang H., Zhu P., Chen J. and Zhou Y. (2009). "Genetic inactivation of adenosine A2A receptors attenuates acute traumatic brain injury in the mouse cortical impact model." Exp Neurol **215**(1): 69-76.

Li Y., Oskouian R. J., Day Y. J., Rieger J. M., Liu L., Kern J. A. and Linden J. (2006). "Mouse spinal cord compression injury is reduced by either activation of the adenosine A2A

receptor on bone marrow-derived cells or deletion of the A2A receptor on non-bone marrow-derived cells." Neuroscience **141**(4): 2029-2039.

Linden J. (2005). "Adenosine in tissue protection and tissue regeneration." Mol Pharmacol **67**(5): 1385-1387.

Liu W., Chun E., Thompson A. A., Chubukov P., Xu F., Katritch V., Han G. W., Roth C. B., Heitman L. H., AP I. J., Cherezov V. and Stevens R. C. (2012). "Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions." Science **337**(6091): 232-236.

Liu W., Hanson M. A., Stevens R. C. and Cherezov V. (2010). "LCP-Tm: an assay to measure and understand stability of membrane proteins in a membrane environment." Biophys J **98**(8): 1539-1548.

Liu X. L., Zhou R., Pan Q. Q., Jia X. L., Gao W. N., Wu J., Lin J. and Chen J. F. (2010). "Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates pathologic but not developmental angiogenesis in the mouse retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(12): 6625-6632.

Logez C., Alkhalfioui F., Byrne B. and Wagner R. (2012). "Preparation of Pichia pastoris expression plasmids." Methods Mol Biol **866**: 25-40.

Loo H., Hale A. and D'Haenen H. (2002). "Determination of the dose of agomelatine, a melatoninergic agonist and selective 5-HT(2C) antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study." Int Clin Psychopharmacol **17**(5): 239-247.

Luca S., White J. F., Sohal A. K., Filippov D. V., van Boom J. H., Grisshammer R. and Baldus M. (2003). "The conformation of neurotensin bound to its G protein-coupled receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10706-10711.

Lujan R., Shigemoto R. and Lopez-Bendito G. (2005). "Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain." Neuroscience **130**(3): 567-580.

Lyssand J. S., DeFino M. C., Tang X. B., Hertz A. L., Feller D. B., Wacker J. L., Adams M. E. and Hague C. (2008). "Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome." J Biol Chem **283**(27): 18792-18800.

Mackrill J. J. (2004). "Generation, use, and validation of receptor-selective antibodies." Methods Mol Biol **259**: 47-65.

Maeda S. and Schertler G. F. (2013). "Production of GPCR and GPCR complexes for structure determination." Curr Opin Struct Biol **23**(3): 381-392.

Maestroni G. J. (2001). "The immunotherapeutic potential of melatonin." Expert Opin Investig Drugs **10**(3): 467-476.

Maestroni G. J., Sulli A., Pizzorni C., Villaggio B. and Cutolo M. (2002). "Melatonin in rheumatoid arthritis: synovial macrophages show melatonin receptors." Ann N Y Acad Sci **966**: 271-275.

Magnani F., Shibata Y., Serrano-Vega M. J. and Tate C. G. (2008). "Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 10744-10749.

Maillet F., Buzelin J. M., Bouchot O. and Karam G. (2004). "Management of artificial urinary sphincter dysfunction." Eur Urol **46**(2): 241-245; discussion 246.

Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Mathiesen J. M., Sunahara R. K., Pardo L., Weis W. I., Kobilka B. K. and Granier S. (2012). "Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist." Nature **485**(7398): 321-326.

Markovic D. and Challiss R. A. (2009). "Alternative splicing of G protein-coupled receptors: physiology and pathophysiology." Cell Mol Life Sci **66**(20): 3337-3352.

Mary S., Damian M., Louet M., Floquet N., Fehrentz J. A., Marie J., Martinez J. and Baneres J. L. (2012). "Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(21): 8304-8309.

Mary S., Fehrentz J. A., Damian M., Gaibelet G., Orcel H., Verdie P., Mouillac B., Martinez J., Marie J. and Baneres J. L. (2013). "Heterodimerization with its splice variant blocks the

ghrelin receptor 1a in a nonsignaling conformation. A study with a purified heterodimer assembled into lipid discs." J Biol Chem.

Masana M. I., Doolen S., Ersahin C., Al-Ghoul W. M., Duckles S. P., Dubocovich M. L. and Krause D. N. (2002). "MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery." J Pharmacol Exp Ther **302**(3): 1295-1302.

Maurice P., Daulat A. M., Broussard C., Mozo J., Clary G., Hotellier F., Chafey P., Guillaume J. L., Ferry G., Boutin J. A., Delagrange P., Camoin L. and Jockers R. (2008). "A generic approach for the purification of signaling complexes that specifically interact with the carboxyl-terminal domain of G protein-coupled receptors." Mol Cell Proteomics **7**(8): 1556-1569.

Mazina K. E., Strader C. D., Tota M. R., Daniel S. and Fong T. M. (1996). "Purification and reconstitution of a recombinant human neurokinin-1 receptor." J Recept Signal Transduct Res **16**(3-4): 191-207.

Mesangeau C., Peres B., Descamps-Francois C., Chavatte P., Audinot V., Coumailleau S., Boutin J. A., Delagrange P., Bennejean C., Renard P., Caignard D. H., Berthelot P. and Yous S. (2010). "Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel naphthalenic derivatives as selective MT(1) melatoninergic ligands." Bioorg Med Chem **18**(10): 3426-3436.

Michalke K., Graviere M. E., Huyghe C., Vincentelli R., Wagner R., Pattus F., Schroeder K., Oschmann J., Rudolph R., Cambillau C. and Desmyter A. (2009). "Mammalian G-protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies." Anal Biochem **386**(2): 147-155.

Millan M. J. (2005). "Serotonin 5-HT2C receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies." Therapie **60**(5): 441-460.

Millar R. P. and Newton C. L. (2010). "The year in G protein-coupled receptor research." Mol Endocrinol **24**(1): 261-274.

Miller J. L. and Tate C. G. (2011). "Engineering an ultra-thermostable beta(1)-adrenoceptor." J Mol Biol **413**(3): 628-638.

Milligan G. and Kostenis E. (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S46-55.

Milojevic T., Reiterer V., Stefan E., Korkhov V. M., Dorostkar M. M., Ducza E., Ogris E., Boehm S., Freissmuth M. and Nanoff C. (2006). "The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A2A receptor." Mol Pharmacol **69**(4): 1083-1094.

Milovnik P., Ferrari D., Sarkar C. A. and Pluckthun A. (2009). "Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1." Protein Eng Des Sel **22**(6): 357-366.

Mitra N., Liu Y., Liu J., Serebryany E., Mooney V., DeVree B. T., Sunahara R. K. and Yan E. C. (2013). "Calcium-dependent ligand binding and G-protein signaling of family B GPCR parathyroid hormone 1 receptor purified in nanodiscs." ACS Chem Biol **8**(3): 617-625.

Montesinos M. C., Gadangi P., Longaker M., Sung J., Levine J., Nilsen D., Reibman J., Li M., Jiang C. K., Hirschhorn R., Recht P. A., Ostad E., Levin R. I. and Cronstein B. N. (1997). "Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors." J Exp Med **186**(9): 1615-1620.

Moreau J. L. and Huber G. (1999). "Central adenosine A(2A) receptors: an overview." Brain Res Brain Res Rev **31**(1): 65-82.

Moukhametzianov R., Warne T., Edwards P. C., Serrano-Vega M. J., Leslie A. G., Tate C. G. and Schertler G. F. (2011). "Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a beta1-adrenergic receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(20): 8228-8232.

Nagtegaal J. E., Laurant M. W., Kerkhof G. A., Smits M. G., van der Meer Y. G. and Coenen A. M. (2000). "Effects of melatonin on the quality of life in patients with delayed sleep phase syndrome." J Psychosom Res **48**(1): 45-50.

Navratilova I., Dioszegi M. and Myszka D. G. (2006b). "Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology." Anal Biochem **355**(1): 132-139.

Navratilova I., Pancera M., Wyatt R. T. and Myszka D. G. (2006a). "A biosensor-based approach toward purification and crystallization of G protein-coupled receptors." Anal Biochem **353**(2): 278-283.

Navratilova I., Sodroski J. and Myszka D. G. (2005). "Solubilization, stabilization, and purification of chemokine receptors using biosensor technology." Anal Biochem **339**(2): 271-281.

Nisius L., Rogowski M., Vangelista L. and Grzesiek S. (2008). "Large-scale expression and purification of the major HIV-1 coreceptor CCR5 and characterization of its interaction with RANTES." Protein Expr Purif **61**(2): 155-162.

Noguchi S. and Satow Y. (2006). "Purification of human beta2-adrenergic receptor expressed in methylotrophic yeast Pichia pastoris." J Biochem **140**(6): 799-804.

Nonno R., Lucini V., Spadoni G., Pannacci M., Croce A., Esposti D., Balsamini C., Tarzia G., Fraschini F. and Stankov B. M. (2000). "A new melatonin receptor ligand with mt1-agonist and MT2-antagonist properties." J Pineal Res **29**(4): 234-240.

Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrange P., Canet E. and Boutin J. A. (2000). "Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2." J Biol Chem **275**(40): 31311-31317.

O'Malley M. A., Lazarova T., Britton Z. T. and Robinson A. S. (2007). "High-level expression in Saccharomyces cerevisiae enables isolation and spectroscopic characterization of functional human adenosine A2a receptor." J Struct Biol **159**(2): 166-178.

O'Malley M. A., Naranjo A. N., Lazarova T. and Robinson A. S. (2010). "Analysis of adenosine A(2)a receptor stability: effects of ligands and disulfide bonds." Biochemistry **49**(43): 9181-9189.

Odashima M., Bamias G., Rivera-Nieves J., Linden J., Nast C. C., Moskaluk C. A., Marini M., Sugawara K., Kozaiwa K., Otaka M., Watanabe S. and Cominelli F. (2005). "Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **129**(1): 26-33.

Ohta A. and Sitkovsky M. (2001). "Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage." Nature **414**(6866): 916-920.

Okada T., Ernst O. P., Palczewski K. and Hofmann K. P. (2001). "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies." Trends Biochem Sci **26**(5): 318-324.

Okuno Y., Yang J., Taneishi K., Yabuuchi H. and Tsujimoto G. (2006). "GLIDA: GPCR-ligand database for chemical genomic drug discovery." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D673-677.

Olah M. E. (1997). "Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors." J Biol Chem **272**(1): 337-344.

Osborne N. N. and Chidlow G. (1994). "The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye." Exp Eye Res **59**(1): 3-9.

Overington J. P., Al-Lazikani B. and Hopkins A. L. (2006). "How many drug targets are there?" Nat Rev Drug Discov **5**(12): 993-996.

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. and Miyano M. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-745.

Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Cardinali D. P. and Monti M. J. (2006b). "Could agomelatine be the ideal antidepressant?" Expert Rev Neurother **6**(11): 1595-1608.

Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Maestroni G. J., Cardinali D. P., Poeggeler B. and Hardeland R. (2006a). "Melatonin: Nature's most versatile biological signal?" FEBS J **273**(13): 2813-2838.

Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Poeggeler B., Hardeland R. and Cardinali D. P. (2007). "Drug Insight: the use of melatonergic agonists for the treatment of insomnia-focus on ramelteon." Nat Clin Pract Neurol **3**(4): 221-228.

Pandi-Perumal S. R., Trakht I., Srinivasan V., Spence D. W., Maestroni G. J., Zisapel N. and Cardinali D. P. (2008). "Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways." Prog Neurobiol **85**(3): 335-353.

Paquet M., Asay M. J., Fam S. R., Inuzuka H., Castleberry A. M., Oller H., Smith Y., Yun C. C., Traynelis S. F. and Hall R. A. (2006). "The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity." J Biol Chem **281**(40): 29949-29961.

Park P., Sum C. S., Hampson D. R., Van Tol H. H. and Wells J. W. (2001). "Nature of the oligomers formed by muscarinic m2 acetylcholine receptors in Sf9 cells." Eur J Pharmacol **421**(1): 11-22.

Park P. S. and Wells J. W. (2003). "Monomers and oligomers of the M2 muscarinic cholinergic receptor purified from Sf9 cells." Biochemistry **42**(44): 12960-12971.

Park S. H., Das B. B., Casagrande F., Tian Y., Nothnagel H. J., Chu M., Kiefer H., Maier K., De Angelis A. A., Marassi F. M. and Opella S. J. (2012). "Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers." Nature **491**(7426): 779-783.

Paulis L., Pechanova O., Zicha J., Barta A., Gardlik R., Celec P., Kunes J. and Simko F. (2010). "Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension." J Pineal Res **48**(2): 102-108.

Peirce S. M., Skalak T. C., Rieger J. M., Macdonald T. L. and Linden J. (2001). "Selective A(2A) adenosine receptor activation reduces skin pressure ulcer formation and inflammation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(1): H67-74.

Petit L., Lacroix I., de Coppet P., Strosberg A. D. and Jockers R. (1999). "Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway." Biochem Pharmacol **58**(4): 633-639.

Pevet P. (1998). "[Melatonin and biological rhythms]." Therapie **53**(5): 411-420.

Picard M., Dahmane T., Garrigos M., Gauron C., Giusti F., le Maire M., Popot J. L. and Champeil P. (2006). "Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca2+-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study." Biochemistry **45**(6): 1861-1869.

Pierce K. L., Premont R. T. and Lefkowitz R. J. (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-650.

Pioszak A. A. and Xu H. E. (2008). "Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5034-5039.

Pocanschi C. L., Dahmane T., Gohon Y., Rappaport F., Apell H. J., Kleinschmidt J. H. and Popot J. L. (2006). "Amphipathic polymers: tools to fold integral membrane proteins to their active form." Biochemistry **45**(47): 13954-13961.

Popoli P., Pintor A., Domenici M. R., Frank C., Tebano M. T., Pezzola A., Scarchilli L., Quarta D., Reggio R., Malchiodi-Albedi F., Falchi M. and Massotti M. (2002). "Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum." J Neurosci **22**(5): 1967-1975.

Popot J. L. (2010). "Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions." Annu Rev Biochem **79**: 737-775.

Popot J. L., Althoff T., Bagnard D., Baneres J. L., Bazzacco P., Billon-Denis E., Catoire L. J., Champeil P., Charvolin D., Cocco M. J., Cremel G., Dahmane T., de la Maza L. M., Ebel C., Gabel F., Giusti F., Gohon Y., Goormaghtigh E., Guittet E., Kleinschmidt J. H., Kuhlbrandt W., Le Bon C., Martinez K. L., Picard M., Pucci B., Sachs J. N., Tribet C., van Heijenoort C., Wien F., Zito F. and Zoonens M. (2011). "Amphipols from A to Z." Annu Rev Biophys **40**: 379-408.

Popot J. L., Berry E. A., Charvolin D., Creuzenet C., Ebel C., Engelman D. M., Flotenmeyer M., Giusti F., Gohon Y., Hong Q., Lakey J. H., Leonard K., Shuman H. A., Timmins P., Warschawski D. E., Zito F., Zoonens M., Pucci B. and Tribet C. (2003). "Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1559-1574.

Rada J. A. and Wiechmann A. F. (2006). "Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(1): 25-33.

Rahmeh R., Damian M., Cottet M., Orcel H., Mendre C., Durroux T., Sharma K. S., Durand G., Pucci B., Trinquet E., Zwier J. M., Deupi X., Bron P., Baneres J. L., Mouillac B. and Granier S. (2012). "Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(17): 6733-6738.

Rajarathnam K. and Rosgen J. (2013). "Isothermal titration calorimetry of membrane proteins - Progress and challenges." Biochim Biophys Acta.

Rasmussen S. G., Choi H. J., Fung J. J., Pardon E., Casarosa P., Chae P. S., Devree B. T., Rosenbaum D. M., Thian F. S., Kobilka T. S., Schnapp A., Konetzki I., Sunahara R. K., Gellman S. H., Pautsch A., Steyaert J., Weis W. I. and Kobilka B. K. (2011a). "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor." Nature **469**(7329): 175-180.

Rasmussen S. G., Choi H. J., Rosenbaum D. M., Kobilka T. S., Thian F. S., Edwards P. C., Burghammer M., Ratnala V. R., Sanishvili R., Fischetti R. F., Schertler G. F., Weis W. I. and Kobilka B. K. (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." Nature **450**(7168): 383-387.

Rasmussen S. G., DeVree B. T., Zou Y., Kruse A. C., Chung K. Y., Kobilka T. S., Thian F. S., Chae P. S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J. M., Shah S. T., Lyons J. A., Caffrey M., Gellman S. H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W. I., Sunahara R. K. and Kobilka B. K. (2011b). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex." Nature **477**(7366): 549-555.

Ratnala V. R., Swarts H. G., VanOostrum J., Leurs R., DeGroot H. J., Bakker R. A. and DeGrip W. J. (2004). "Large-scale overproduction, functional purification and ligand affinities of the His-tagged human histamine H1 receptor." Eur J Biochem **271**(13): 2636-2646.

Reed R. R. (2004). "After the holy grail: establishing a molecular basis for Mammalian olfaction." Cell **116**(2): 329-336.

Reilander H. and Weiss H. M. (1998). "Production of G-protein-coupled receptors in yeast." Curr Opin Biotechnol **9**(5): 510-517.

Reppert S. M. and Weaver D. R. (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." Nature **418**(6901): 935-941.

Reppert S. M., Weaver D. R. and Godson C. (1996). "Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes." Trends Pharmacol Sci **17**(3): 100-102.

Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B. and Prossnitz E. R. (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science **307**(5715): 1625-1630.

Rich R. L., Errey J., Marshall F. and Myszka D. G. (2011). "Biacore analysis with stabilized G-protein-coupled receptors." Anal Biochem **409**(2): 267-272.

Rich R. L., Miles A. R., Gale B. K. and Myszka D. G. (2009). "Detergent screening of a G-protein-coupled receptor using serial and array biosensor technologies." Anal Biochem **386**(1): 98-104.

Rigaud J. L. and Levy D. (2003). "Reconstitution of membrane proteins into liposomes." Methods Enzymol **372**: 65-86.

Ritchie T. K., Grinkova Y. V., Bayburt T. H., Denisov I. G., Zolnerciks J. K., Atkins W. M. and Sligar S. G. (2009). "Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs." Methods Enzymol **464**: 211-231.

Robertson N., Jazayeri A., Errey J., Baig A., Hurrell E., Zhukov A., Langmead C. J., Weir M. and Marshall F. H. (2011). "The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery." Neuropharmacology **60**(1): 36-44.

Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V. and Reiter R. J. (2004). "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin." J Pineal Res **36**(1): 1-9.

Rosenbaum D. M., Cherezov V., Hanson M. A., Rasmussen S. G., Thian F. S., Kobilka T. S., Choi H. J., Yao X. J., Weis W. I., Stevens R. C. and Kobilka B. K. (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." Science **318**(5854): 1266-1273.

Rosenbaum D. M., Zhang C., Lyons J. A., Holl R., Aragao D., Arlow D. H., Rasmussen S. G., Choi H. J., Devree B. T., Sunahara R. K., Chae P. S., Gellman S. H., Dror R. O., Shaw D. E., Weis W. I., Caffrey M., Gmeiner P. and Kobilka B. K. (2011). "Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex." Nature **469**(7329): 236-240.

Rosenberger P., Schwab J. M., Mirakaj V., Masekowsky E., Mager A., Morote-Garcia J. C., Unertl K. and Eltzschig H. K. (2009). "Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia." Nat Immunol **10**(2): 195-202.

Roth T., Seiden D., Sainati S., Wang-Weigand S., Zhang J. and Zee P. (2006). "Effects of ramelteon on patient-reported sleep latency in older adults with chronic insomnia." Sleep Med **7**(4): 312-318.

Roth T., Stubbs C. and Walsh J. K. (2005). "Ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2-receptor agonist, reduces latency to persistent sleep in a model of transient insomnia related to a novel sleep environment." Sleep **28**(3): 303-307.

Rothlisberger D., Pos K. M. and Pluckthun A. (2004). "An antibody library for stabilizing and crystallizing membrane proteins - selecting binders to the citrate carrier CitS." FEBS Lett **564**(3): 340-348.

Roy D., Angelini N. L., Fujieda H., Brown G. M. and Belsham D. D. (2001). "Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin." Endocrinology **142**(11): 4711-4720.

Ryzhov S., Goldstein A. E., Biaggioni I. and Feoktistov I. (2006). "Cross-talk between G(s)- and G(q)-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A(2B) adenosine receptors in human mast cells." Mol Pharmacol **70**(2): 727-735.

Sack R. L., Brandes R. W., Kendall A. R. and Lewy A. J. (2000). "Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people." N Engl J Med **343**(15): 1070-1077.

Sansuk K., Balog C. I., van der Does A. M., Booth R., de Grip W. J., Deelder A. M., Bakker R. A., Leurs R. and Hensbergen P. J. (2008). "GPCR proteomics: mass spectrometric and functional analysis of histamine H1 receptor after baculovirus-driven and in vitro cell free expression." J Proteome Res **7**(2): 621-629.

Sarkar C. A., Dodevski I., Kenig M., Dudli S., Mohr A., Hermans E. and Pluckthun A. (2008). "Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14808-14813.

Sarramegna V., Muller I., Mousseau G., Froment C., Monsarrat B., Milon A. and Talmont F. (2005). "Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in Pichia pastoris." Protein Expr Purif **43**(2): 85-93.

Sarramegna V., Talmont F., Demange P. and Milon A. (2003). "Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1529-1546.

Savaskan E., Ayoub M. A., Ravid R., Angeloni D., Fraschini F., Meier F., Eckert A., Muller-Spahn F. and Jockers R. (2005). "Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease." J Pineal Res **38**(1): 10-16.

Savaskan E., Olivieri G., Meier F., Brydon L., Jockers R., Ravid R., Wirz-Justice A. and Muller-Spahn F. (2002). "Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients." J Pineal Res **32**(1): 59-62.

Schaeffer H. J. and Sirotkin A. V. (1995). "Melatonin and serotonin directly regulate oxytocin, insulin-like growth factor-I and progesterone secretion by cultured human granulosa cells." Adv Exp Med Biol **395**: 547-548.

Schindler C. W., Karcz-Kubicha M., Thorndike E. B., Muller C. E., Tella S. R., Ferre S. and Goldberg S. R. (2005). "Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A1 and A2A subtype receptor agonists." Br J Pharmacol **144**(5): 642-650.

Schioth H. B. and Fredriksson R. (2005). "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective." Gen Comp Endocrinol **142**(1-2): 94-101.

Seddon A. M., Curnow P. and Booth P. J. (2004). "Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 105-117.

Serrano-Vega M. J., Magnani F., Shibata Y. and Tate C. G. (2008). "Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 877-882.

Sharma K. S., Durand G., Giusti F., Olivier B., Fabiano A. S., Bazzacco P., Dahmane T., Ebel C., Popot J. L. and Pucci B. (2008). "Glucose-based amphiphilic telomers designed to keep membrane proteins soluble in aqueous solutions: synthesis and physicochemical characterization." Langmuir **24**(23): 13581-13590.

Shi C., Paige M. F., Maley J. and Loewen M. C. (2009). "In vitro characterization of ligand-induced oligomerization of the S. cerevisiae G-protein coupled receptor, Ste2p." Biochim Biophys Acta **1790**(1): 1-7.

Shibata Y., White J. F., Serrano-Vega M. J., Magnani F., Aloia A. L., Grisshammer R. and Tate C. G. (2009). "Thermostabilization of the neurotensin receptor NTS1." J Mol Biol **390**(2): 262-277.

Shimamura T., Shiroishi M., Weyand S., Tsujimoto H., Winter G., Katritch V., Abagyan R., Cherezov V., Liu W., Han G. W., Kobayashi T., Stevens R. C. and Iwata S. (2011). "Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin." Nature **475**(7354): 65-70.

Shoichet B. K. and Kobilka B. K. (2012). "Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **33**(5): 268-272.

Silber B. M. (2010). "Driving drug discovery: the fundamental role of academic labs." Sci Transl Med **2**(30): 30cm16.

Simonin F., Karcher P., Boeuf J. J., Matifas A. and Kieffer B. L. (2004). "Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins." J Neurochem **89**(3): 766-775.

Singh S., Zhang M., Bertheleme N., Kara E., Strange P. G. and Byrne B. (2012). "Radioligand binding analysis as a tool for quality control of GPCR production for structural characterization: adenosine A(2a)R as a template for study." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 29**: Unit 29 23.

Sitkovsky M. V., Lukashev D., Apasov S., Kojima H., Koshiba M., Caldwell C., Ohta A. and Thiel M. (2004). "Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors." Annu Rev Immunol **22**: 657-682.

Slominski A., Fischer T. W., Zmijewski M. A., Wortsman J., Semak I., Zbytek B., Slominski R. M. and Tobin D. J. (2005). "On the role of melatonin in skin physiology and pathology." Endocrine **27**(2): 137-148.

Slominski A., Tobin D. J., Zmijewski M. A., Wortsman J. and Paus R. (2008). "Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions." Trends Endocrinol Metab **19**(1): 17-24.

Slominski R. M., Reiter R. J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R. S. and Slominski A. T. (2012). "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions." Mol Cell Endocrinol **351**(2): 152-166.

Smith N. J. and Milligan G. (2010). "Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes." Pharmacol Rev **62**(4): 701-725.

Spiegel A. M. (1996). "Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease." Annu Rev Physiol **58**: 143-170.

Srinivasan V., Maestroni G. J., Cardinali D. P., Esquifino A. I., Perumal S. R. and Miller S. C. (2005). "Melatonin, immune function and aging." Immun Ageing **2**: 17.

Srinivasan V., Pandi-Perumal S. R., Cardinali D. P., Poeggeler B. and Hardeland R. (2006b). "Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." Behav Brain Funct **2**: 15.

Srinivasan V., Smits M., Spence W., Lowe A. D., Kayumov L., Pandi-Perumal S. R., Parry B. and Cardinali D. P. (2006a). "Melatonin in mood disorders." World J Biol Psychiatry **7**(3): 138-151.

Stiffler M. A., Chen J. R., Grantcharova V. P., Lei Y., Fuchs D., Allen J. E., Zaslavskaia L. A. and MacBeath G. (2007). "PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome." Science **317**(5836): 364-369.

Suda K., Filipek S., Palczewski K., Engel A. and Fotiadis D. (2004). "The supramolecular structure of the GPCR rhodopsin in solution and native disc membranes." Mol Membr Biol **21**(6): 435-446.

Sugden D., Yeh L. K. and Teh M. T. (1999). "Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists." Reprod Nutr Dev **39**(3): 335-344.

Sullivan G. W., Fang G., Linden J. and Scheld W. M. (2004). "A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis." J Infect Dis **189**(10): 1897-1904.

Sun D., Samuelson L. C., Yang T., Huang Y., Paliege A., Saunders T., Briggs J. and Schnermann J. (2001). "Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9983-9988.

Takeda S., Kadowaki S., Haga T., Takaesu H. and Mitaku S. (2002). "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence." FEBS Lett **520**(1-3): 97-101.

Talmont F., Mouledous L., Boue J., Mollereau C. and Dietrich G. (2012). "Denatured G-protein coupled receptors as immunogens to generate highly specific antibodies." PLoS One **7**(9): e46348.

Tamura H., Nakamura Y., Korkmaz A., Manchester L. C., Tan D. X., Sugino N. and Reiter R. J. (2009). "Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications." Fertil Steril **92**(1): 328-343.

Tamura H., Nakamura Y., Terron M. P., Flores L. J., Manchester L. C., Tan D. X., Sugino N. and Reiter R. J. (2008). "Melatonin and pregnancy in the human." Reprod Toxicol **25**(3): 291-303.

Tan D. X., Manchester L. C., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J. C., Sainz R. M. and Reiter R. J. (2003). "Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin." J Pineal Res **34**(1): 75-78.

Tan D. X., Manchester L. C., Terron M. P., Flores L. J. and Reiter R. J. (2007). "One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" J Pineal Res **42**(1): 28-42.

Tate C. G. (2010). "Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation." Methods Mol Biol **601**: 187-203.

Tate C. G. (2012). "A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures." Trends Biochem Sci **37**(9): 343-352.

Thompson A. A., Liu J. J., Chun E., Wacker D., Wu H., Cherezov V. and Stevens R. C. (2011). "GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles." Methods **55**(4): 310-317.

Thompson A. A., Liu W., Chun E., Katritch V., Wu H., Vardy E., Huang X. P., Trapella C., Guerrini R., Calo G., Roth B. L., Cherezov V. and Stevens R. C. (2012). "Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic." Nature **485**(7398): 395-399.

Ting K. N., Dunn W. R., Davies D. J., Sugden D., Delagrange P., Guardiola-Lemaitre B., Scalbert E. and Wilson V. G. (1997). "Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats." Br J Pharmacol **122**(7): 1299-1306.

Torres-Farfan C., Richter H. G., Rojas-Garcia P., Vergara M., Forcelledo M. L., Valladares L. E., Torrealba F., Valenzuela G. J. and Seron-Ferre M. (2003). "mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 450-458.

Tosini G. (2000). "Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals." Chronobiol Int **17**(5): 599-612.

Tribet C., Audebert R. and Popot J. L. (1996). "Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15047-15050.

Vanecek J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." Physiol Rev **78**(3): 687-721.

Varani K., Portaluppi F., Gessi S., Merighi S., Ongini E., Belardinelli L. and Borea P. A. (2000). "Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A(2A) receptors : functional and biochemical aspects." Circulation **102**(3): 285-289.

Vassilatis D. K., Hohmann J. G., Zeng H., Li F., Ranchalis J. E., Mortrud M. T., Brown A., Rodriguez S. S., Weller J. R., Wright A. C., Bergmann J. E. and Gaitanaris G. A. (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-4908.

Venkatakrishnan A. J., Deupi X., Lebon G., Tate C. G., Schertler G. F. and Babu M. M. (2013). "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors." Nature **494**(7436): 185-194.

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K. A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G. V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M. L., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y. H., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M.,

Stewart E., Strong R., Suh E., Thomas R., Tint N. N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J. F., Guigo R., Campbell M. J., Sjolander K. V., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang Y. H., Coyne M., Dahlke C., Mays A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A. and Zhu X. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Vernier P., Cardinaud B., Valdenaire O., Philippe H. and Vincent J. D. (1995). "An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family." Trends Pharmacol Sci **16**(11): 375-381.

Versele M., Lemaire K. and Thevelein J. M. (2001). "Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems." EMBO Rep **2**(7): 574-579.

Vincent L., Cohen W., Delagrange P., Boutin J. A. and Nosjean O. (2010). "Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand." J Pineal Res **48**(3): 222-229.

Wacker D., Fenalti G., Brown M. A., Katritch V., Abagyan R., Cherezov V. and Stevens R. C. (2010). "Conserved binding mode of human beta2 adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography." J Am Chem Soc **132**(33): 11443-11445.

Wade A. G., Ford I., Crawford G., McMahon A. D., Nir T., Laudon M. and Zisapel N. (2007). "Efficacy of prolonged release melatonin in insomnia patients aged 55-80 years: quality of sleep and next-day alertness outcomes." Curr Med Res Opin **23**(10): 2597-2605.

Wang X., Wang J. and Ge B. (2013). "Evaluation of Cell-free Expression System for the Production of Soluble and Functional Human GPCR N-formyl Peptide Receptors." Protein Pept Lett.

Ward R. J. and Milligan G. (2013). "Structural and biophysical characterisation of G protein-coupled receptor ligand binding using resonance energy transfer and fluorescent labelling techniques." Biochim Biophys Acta.

Warne T., Chirnside J. and Schertler G. F. (2003). "Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 133-140.

Warne T., Moukhametzianov R., Baker J. G., Nehme R., Edwards P. C., Leslie A. G., Schertler G. F. and Tate C. G. (2011). "The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor." Nature **469**(7329): 241-244.

Warne T., Serrano-Vega M. J., Baker J. G., Moukhametzianov R., Edwards P. C., Henderson R., Leslie A. G., Tate C. G. and Schertler G. F. (2008). "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor." Nature **454**(7203): 486-491.

Warne T., Serrano-Vega M. J., Tate C. G. and Schertler G. F. (2009). "Development and crystallization of a minimal thermostabilised G protein-coupled receptor." Protein Expr Purif **65**(2): 204-213.

Watkins H. A., Au M., Bobby R., Archbold J. K., Abdul-Manan N., Moore J. M., Middleditch M. J., Williams G. M., Brimble M. A., Dingley A. J. and Hay D. L. (2013). "Identification of key residues involved in adrenomedullin binding to the AM1 receptor." Br J Pharmacol **169**(1): 143-155.

Webb D. R., Handel T. M., Kretz-Rommel A. and Stevens R. C. (2013). "Opportunities for functional selectivity in GPCR antibodies." Biochem Pharmacol **85**(2): 147-152.

Wehr T. and Goodwin F. K. (1979). "Tricyclics modulate frequency of mood cycles." Chronobiologia **6**(4): 377-385.

Weil Z. M., Hotchkiss A. K., Gatien M. L., Pieke-Dahl S. and Nelson R. J. (2006). "Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating." Brain Res Bull **68**(6): 425-429.

Weiss H. M. and Grisshammer R. (2002). "Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli." Eur J Biochem **269**(1): 82-92.

White J. F. and Grisshammer R. (2007). "Automated large-scale purification of a recombinant g-protein-coupled neurotensin receptor." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 6**: Unit 6 8.

White J. F. and Grisshammer R. (2010). "Stability of the neurotensin receptor NTS1 free in detergent solution and immobilized to affinity resin." PLoS One **5**(9): e12579.

White J. F., Noinaj N., Shibata Y., Love J., Kloss B., Xu F., Gvozdenovic-Jeremic J., Shah P., Shiloach J., Tate C. G. and Grisshammer R. (2012). "Structure of the agonist-bound neurotensin receptor." Nature **490**(7421): 508-513.

White J. F., Trinh L. B., Shiloach J. and Grisshammer R. (2004). "Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin." FEBS Lett **564**(3): 289-293.

Whorton M. R., Bokoch M. P., Rasmussen S. G., Huang B., Zare R. N., Kobilka B. and Sunahara R. K. (2007). "A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7682-7687.

Wu B., Chien E. Y., Mol C. D., Fenalti G., Liu W., Katritch V., Abagyan R., Brooun A., Wells P., Bi F. C., Hamel D. J., Kuhn P., Handel T. M., Cherezov V. and Stevens R. C. (2010). "Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists." Science **330**(6007): 1066-1071.

Wu H., Wacker D., Mileni M., Katritch V., Han G. W., Vardy E., Liu W., Thompson A. A., Huang X. P., Carroll F. I., Mascarella S. W., Westkaemper R. B., Mosier P. D., Roth B. L., Cherezov V. and Stevens R. C. (2012). "Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic." Nature **485**(7398): 327-332.

Xu F., Wu H., Katritch V., Han G. W., Jacobson K. A., Gao Z. G., Cherezov V. and Stevens R. C. (2011). "Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor." Science **332**(6027): 322-327.

Yang J. P., Cirico T., Katzen F., Peterson T. C. and Kudlicki W. (2011). "Cell-free synthesis of a functional G protein-coupled receptor complexed with nanometer scale bilayer discs." BMC Biotechnol **11**: 57.

Yao X. J., Velez Ruiz G., Whorton M. R., Rasmussen S. G., DeVree B. T., Deupi X., Sunahara R. K. and Kobilka B. (2009). "The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(23): 9501-9506.

Yeliseev A., Zoubak L. and Gawrisch K. (2007). "Use of dual affinity tags for expression and purification of functional peripheral cannabinoid receptor." Protein Expr Purif **53**(1): 153-163.

Yeliseev A. A., Wong K. K., Soubias O. and Gawrisch K. (2005). "Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies." Protein Sci **14**(10): 2638-2653.

Zhang R. and Xie X. (2012). "Tools for GPCR drug discovery." Acta Pharmacol Sin **33**(3): 372-384.

Zhao Q. and Wu B. L. (2012). "Ice breaking in GPCR structural biology." Acta Pharmacol Sin **33**(3): 324-334.

Zheng H., Loh H. H. and Law P. Y. (2010). "Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications." IUBMB Life **62**(2): 112-119.

Zhukov A., Andrews S. P., Errey J. C., Robertson N., Tehan B., Mason J. S., Marshall F. H., Weir M. and Congreve M. (2011). "Biophysical mapping of the adenosine A2A receptor." J Med Chem **54**(13): 4312-4323.

Zimmermann H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.
Zisapel N. (2007). "Sleep and sleep disturbances: biological basis and clinical implications." Cell Mol Life Sci **64**(10): 1174-1186.
Zoonens M., Catoire L. J., Giusti F. and Popot J. L. (2005). "NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 8893-8898.
Zou Y., Weis W. I. and Kobilka B. K. (2012). "N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein coupled receptor." PLoS One **7**(10): e46039.
Zupancic M. and Guilleminault C. (2006). "Agomelatine: a preliminary review of a new antidepressant." CNS Drugs **20**(12): 981-992.
Zvonok N., Xu W., Williams J., Janero D. R., Krishnan S. C. and Makriyannis A. (2010). "Mass spectrometry-based GPCR proteomics: comprehensive characterization of the human cannabinoid 1 receptor." J Proteome Res **9**(4): 1746-1753.

Christel LOGEZ

Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches *in vitro* : mise au point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle

Résumé

Le récepteur humain de la mélatonine MT1 appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En raison du rôle majeur qu'il joue dans la régulation du rythme circadien, ce récepteur est impliqué dans les troubles du sommeil et la dépression et présente donc un intérêt thérapeutique important. Afin de progresser vers une meilleure caractérisation structurale et fonctionnelle de ce récepteur, nous avons élaboré une stratégie globale visant à générer les échantillons et méthodes nécessaires pour de telles études. Nous avons ainsi mis au point un ensemble original de conditions de production et de purification permettant d'isoler les récepteurs MT1 sous forme relativement pure, homogène et fonctionnelle. Parallèlement, à partir d'un RCPG de référence, le récepteur de l'adénosine A2A, nous avons mis au point un panel de techniques d'analyses biochimiques et biophysiques qui contribuent à une caractérisation fine des récepteurs purifiés et leur interaction avec des ligands.

Mots clés : Récepteurs Couplés aux Protéines G, récepteur humain de la mélatonine MT1, récepteur humain de l'adénosine A2A, production, purification, études *in vitro.*

Summary

The human MT1 melatonin receptor belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). It plays a major role in the regulation of circadian rhythm and is involved in sleep disorders and depression. This receptor is thus of significant therapeutic interest. However, very few *in vitro* studies have been conducted on this receptor and in particular no structural characterization and interaction studies by biophysical methods. In order to progress on these aspects, we developed conditions of production and purification of MT1 receptors for obtaining samples compatible with this type of study. Furthermore, we initiated stabilization tests of the purified receptors. Meanwhile, we have developed biochemical and biophysical analysis techniques to characterize the purified receptors and study their interactions with ligands, on a reference GPCR, the A2A adenosine receptor.

Key words: G Protein Coupled Receptor, human melatonin MT1 receptor, human adenosine A2A receptor, production, purification, *in vitro* studies.