

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Vendula Marková

β -Arrestin a jeho úloha v přenosu signálů

β -Arrestin and its role in signal transduction

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 11. 5. 2016

Podpis:

Vendula Marková

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotu, kterou mi věnoval v průběhu zpracování mé práce.

Abstrakt

β -Arrestin je všudypřítomný protein v buňkách, kde se účastní přenosu informace signálními drahami a může tak ovlivňovat různé buněčné procesy. Konkrétně β -arrestin kooperuje s receptory spřaženými s G proteiny (GPCRs). Po aktivaci receptoru příslušným ligandem dochází k navázání β -arrestinu k receptoru, čímž nastává zeslabení vedení signálu prostřednictvím příslušných G proteinů, neboli desensitizaci, a poté může dojít i k internalizaci receptoru. Kromě toho β -arrestin funguje jako adaptor pro různé molekuly, které se účastní přenosu signálu. Dále může hrát roli i přímo v jádře a ovlivňovat tak transkripci cílových genů. V neposlední řadě je β -arrestin a jeho schopnost regulovat signální dráhy využívána ve výzkumu zaměřeném na vývoj nového typu léčiv, tzv. usměrňovacích ligandů, které po navázání na GPCRs dokáží spouštět pouze jednu určitou aktivitu receptoru a příslušnou buněčnou signalizaci.

Klíčová slova: receptory spřažené s G proteiny, β -arrestin, přenos signálu, desensitizace

Abstract

β -Arrestin is a ubiquitous protein in cells, where it is involved in signal transduction and can affect different cellular processes. β -Arrestin cooperates with G protein-coupled receptors (GPCRs). Binding of β -arrestin to a receptor after its activation by a relevant ligand results in attenuation of signal transduction through the cognate G proteins, the process called desensitization, which can be associated with receptor internalization. Besides that, β -arrestin acts as adaptor for different molecules, which participate in signal transduction. β -Arrestin also has a role in a regulation of transcription in the cell nucleus. Finally, β -arrestin is explored in research focused on the development of a new type of drugs, so called biased ligands. After binding to a GPCR, these ligands can initiate only one specific activity of the receptor and affect relevant signaling cascades.

Key words: G protein-coupled receptors, β -arrestin, signal transduction, desensitization

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod.....	9
2 Receptory spřažené s G proteiny	11
2.1 Struktura	11
2.2 Klasifikace GPCRs	12
2.3 Klasická cesta signalizace GPCRs.....	13
2.3.1 Ligandy	13
2.3.2 G protein	14
2.3.3 Signalizace	14
3 β-Arrestin.....	15
3.1 Klasifikace a struktura	15
3.2 Funkce	16
3.2.1 GRKs	17
3.2.2 Desensitizace.....	17
3.2.3 Internalizace.....	18
3.2.4 Dvě hlavní třídy GPCRs dle afinity k β -arrestinům.....	19
3.2.5 Ubikvitinace β -arrestinu.....	21
4 Úloha β-arrestinů v signalizaci iniciované GPCRs.....	23
4.1 Interakce Src a β -arrestinu	23
4.2 Regulace MAPKs dráhy prostřednictvím β -arrestinu.....	23
4.2.1 Aktivace ERK 1/2.....	24
4.2.2 Aktivace JNK3.....	24
4.2.3 Aktivace p38	25
4.3 Jaderná signalizace prostřednictvím β -arrestinu.....	25
4.3.1 Regulace transkripce přes NF- κ B	25
4.3.2 Regulace MDM2.....	26
4.3.3 Funkce β -arrestinu v jádře	26

4.4	Regulace hedgehog signální dráhy	27
4.5	Regulace Wnt signální dráhy.....	28
5	Terapeutický potenciál β-Arrestinu	29
5.1	μ -Opioidní receptor (MOR).....	29
5.2	Receptor pro angiotensin II typu 1 (AT1AR).....	29
5.3	Receptor pro parathyroidní hormon typu 1 (PTH1R).....	30
6	Závěr.....	31
7	Seznam použité literatury.....	33

Seznam použitých zkratek

7TM	Seven-transmembrane (sedmkrát procházející membránou)
AP-2	Adaptorový protein 2
APC	Adenomatous polyposis coli (supresorový gen)
ARB	Angiotensin receptor blocker (blokátor angiotensinového receptoru)
ASK1	Apoptose signal-regulated kinase (kináza regulovaná apoptotickým signálem)
AT1AR	Receptor pro angiotensin II typu 1A
ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CREB	cAMP response-element binding protein
CXCR4	CXC chemokinový receptor typu 4
D1AR	Dopaminový receptor 1A
DOR	δ -Opioidní receptor
Dsh	Dishevelled
E1, E2, E3	Enzym 1, 2, 3
E	Extracelulární
Erk 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ETAR	Endothelinový receptor typu A
Fz	Frizzled receptor
GABA_BR	Receptor typu B pro kyselinu γ -aminomáselnou
GDP	Guanosindifosfát
GFP	Green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
GPCR	G protein-coupled receptor (receptor spřažený s G proteiny)
GRK	G protein coupled-receptor kinase (kináza pro GPCR)
GSK-3β	Glycogen synthase kinase 3 β (glykogen syntáza kináza 3 β)
GTP	Guanosintrifosfát
H4	Histon 4
Hh	Hedgehog
I	Intracelulární
ITF	Intraflagelární transportní komplex
IκB	Inhibitor κ B
JNK3	c-Jun N-terminální kináza
Kif3A	Podjednotka kinesinu 2

KO	Knock-outovaný gen
LPS	Lipopolysacharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (mitogenem aktivovaná proteinkináza)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEK	MAPKK
MKK4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
MOR	μ -opioidní receptor
NF-κB	Nuclear factor- κ B (jaderný faktor κ B)
NTR-1	Neurotensinový receptor typu 1
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
Ptc	Patched receptor
PTH1R	Receptor pro parathyroidní hormon typu 1
PTH	Parathyroidní hormon
RGS	Regulator of G protein signaling (regulátor G proteinové signalizace)
SPR	Receptor pro substanci P
Src	Nereceptorová tyrosinová kináza
TM	Transmembránový
TRH-R	Receptor pro thyreoliberin
V2R	Vasopresinový receptor typu 2
Wnt	Wingless (ligand pro Frizzled receptor)
β_2AR	β_2 -Adrenergní receptor
β-arr	β -Arrestin

1 Úvod

K tomu, aby mohly jednotlivé buňky tvořit větší funkční celky a celé organismy, potřebují mezi sebou komunikovat. Tato komunikace je v organismech realizovaná buněčnou signalizací, pod kterou si můžeme představit obvyčejné posílání zpráv. Signál představuje zaslání zprávy cílové buňce, která zprávu převezme a zpracuje jí. Na základě této signalizace může buňka například vytvořit požadované proteiny, může dojít k její diferenciaci a mnoha dalším jevům.

Signalizace prochází přes receptory nacházející se v plazmatické membráně. Receptory mohou zaujímat různé konformace v membráně, spouštět odlišné signální dráhy a vázat různé ligandy. Problematika receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs) je rozsáhlá a stále se objevují nové poznatky o těchto receptorech a jejich signalizaci. Po mnoha letech vědeckého úsilí se ustálilo paradigma této signalizace, avšak stále nacházíme v tomto mechanismu nové možnosti, například molekulu β -arrestin.

Objev β -arrestinu je spojen s jeho prvotní funkcí, která spočívá v zeslabení buněčného signálu přenášeného prostřednictvím GPCRs. V několika dalších letech se přišlo i na jeho jinou úlohu, konkrétně v internalizaci receptorů, kde hraje významnou roli jako adaptor pro vazbu dalších molekul důležitých pro vytváření váčků. Schopnost β -arrestinu fungovat jako adaptor, vedla v posledním desetiletí k výzkumům, ve kterých byly odhaleny mnohem důležitější funkce β -arrestinu, především v signalizaci, což z něj vytvořilo velmi zajímavý objekt pro následující studie.

Tato bakalářská práce si klade za cíl charakterizovat základní vlastnosti β -arrestinu a jeho úlohu v buněčné signalizaci prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny. Hlavním obsahem práce je popis jednotlivých typů signalizace, ve kterých hraje β -arrestin důležitou roli a vytvoření přehledu o všech jeho možných funkcích. Tento přehled by měl poukazovat i na nové poznatky o β -arrestinu. Závěr práce popisuje jednoduchý pohled na možné využití β -arrestinu v oblasti vývoje nových léčiv.

2 Receptory spřažené s G proteiny

Receptory obecně představují integrální membránové proteiny, které jsou schopné na sebe vázat určité molekuly a spouštět různé fyziologické procesy. Konkrétně receptory spřažené s G proteiny (GPCRs = G protein-coupled receptors) tvoří jednu z největších rodin receptorů, která je kódována několika stovkami genů v lidském genomu. Jak už bylo řečeno, i tyto receptory na sebe mohou vázat molekuly zvané ligandy (neuropřenašeče, vápenaté ionty, hormony a mnoho dalších), díky nimž receptor změní svoji konformaci a dokáže tak vyvolat buněčný signál. Velký počet různých fyziologických procesů je regulován těmito receptory a jejich signálními drahami, což dělá z GPCRs významný cíl pro vytváření nových terapeutik.

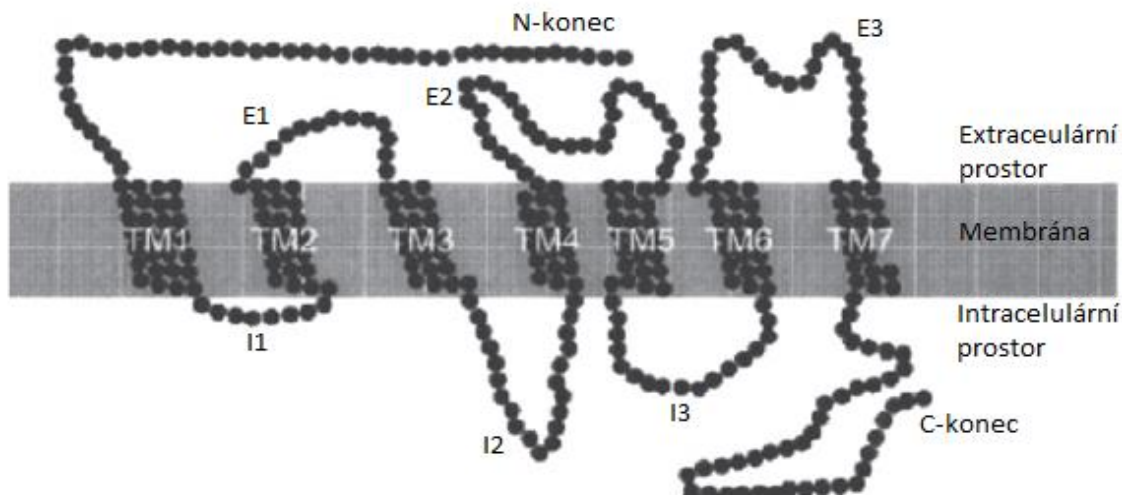
Tyto receptory mohou být v literatuře označovány i jako 7TM receptors (seven transmembrane receptors = receptory sedmkrát procházející membránou). Tento název spíše popisuje specifickou strukturu těchto receptorů (viz dále), a proto je vhodnější než GPCRs, jelikož ne každý receptor z této skupiny kooperuje s G proteiny. Zkratka GPCRs je ale více zažitá (*Fredriksson a kol., 2003*).

2.1 Struktura

K popsání struktury byl využit nejznámější a nejhojněji zastoupený receptor této skupiny rhodopsin. Centrální část receptoru vytváří 7 α -helixů, které procházejí napříč plazmatickou membránou a vytvářejí tak smyčky na extracelulární a intracelulární straně membrány. N-koncová část receptoru se nachází na vnější straně, zatímco C koncová část na vnitřní straně membrány (*Palczewski a kol., 2000*).

Každá část receptoru má své označení. Transmembránové α -helixy jsou označovány zkratkou TM a římským číslem I-VII, kde TM I se nachází nejbliže N koncové části a TM VII naopak C koncové části. Extracelulární smyčky jsou popisovány zkratkou E (extracellular) a příslušnou číslicí 1-3, intracelulární smyčky zkratkou I (intracellular) a opět číslicí 1-3 (viz obr. 1) (*Hanson a kol., 2009*).

Extracelulární smyčky a N konec receptoru poskytují vazebné místo pro ligand. Z intracelulárních smyček a C konce receptoru je vytvořeno vazebné místo pro G-protein. (*Cherezov a kol., 2007*).



Obr. 1. Schéma struktury receptorů spřažených s G proteiny

Na tomto schématu je šedě znázorněna membrána, nad ní extracelulární a pod ní intracelulární prostor. Obrázek poukazuje na nesbalenou topologii receptoru. Písmenem E a příslušnou číslicí jsou popsány extracelulární smyčky a písmenem I a číslicí naopak intracelulární smyčky. Transmembránové oblasti jsou znázorněny zkratkou TM a příslušnou arabskou číslicí pro zjednodušení popisu. Konkrétně je zde uveden chemokinový receptor.

Upraveno podle Chew a kol., 2013

2.2 Klasifikace GPCRs

Jeden z nejpoužívanějších klasifikačních systémů rozděluje GPCRs do šesti základních tříd, které se označují písmeny A-F (viz tabulka 1). Tento systém zahrnuje všechny GPCRs obratlovců i bezobratlých. Zajímavé jsou třídy D a E, které se nevyskytují u člověka, ale například třída D byla objevena pouze v těle hub (*Davies a kol., 2007*).

V roce 2003 byl publikován článek, který uvedl nový klasifikační systém pouze pro lidské GPCRs, pojmenovaný GRAFS. Každé písmeno z tohoto názvu uvádí danou skupinu receptorů: glutamátová (G), rhodopsinová (R), adhesion (A), frizzled/taste2 (F), sekretinová (S). Tento systém je založen na fylogenetické příbuznosti jednotlivých skupin (*Fredriksson a kol., 2003*).

Tabulka 1. Příklady receptorů jednotlivých rodin podle klasifikačního systému A-F GPCRs

Rodina	Příklady receptorů jednotlivých rodin
A	adrenergní receptory, rhodopsin, opioidní receptory
B	receptory pro, sekretin, kalcitonin
C	metabotropní glutamátové receptory
D	receptory pro feromony
E	cAMP receptory
F	receptory Frizzled/Smoothened

Podle Davies a kol., 2007

2.3 Klasická cesta signalizace GPCRs

Signalizace je pro buňku velice důležitá, a to nejenom z hlediska její komunikace s ostatními buňkami, ale i s okolním prostředím. Nejznámější a nejvíce prostudované jsou signální dráhy, které zahrnují, jak už z názvu GPCRs vypovídá, G proteiny. Avšak jsou známy i jiné cesty signalizace modulované prostřednictvím těchto receptorů, které ve své dráze G protein obsahovat nemusí (*Lefkowitz and Shenov, 2005*). Před samotným popsáním klasické cesty signalizace je potřeba vysvětlit pojmy ligand a G protein.

2.3.1 Ligandy

Většina GPCRs se přepíná pouze mezi aktivní a inaktivní formou v závislosti na přítomnosti ligandu, což je například rhodopsin. Některé se však mohou vyskytovat i v dalších formách mezi aktivní a inaktivní. Dále také vykazují bazální aktivitu, což znamená, že mohou aktivovat příslušný G protein i bez přítomnosti ligandu. Za zvýšení a snížení aktivity receptoru je zodpovědná vazba ligandu. Schopností těchto molekul je, vázat se s vysokou afinitou do vazebného místa receptoru. Po navázání dochází ke konformačním změnám receptoru a přechodu z jeho inaktivní formy na aktivní, což je doprovázeno překonáním určité energetické bariéry. Podle jejich vlivu na receptor je dělíme na agonisty, částečné agonisty, inverzní agonisty a antagonisty.

Agonista je takový ligand, který dokáže zcela aktivovat receptor. Pod pojmem částečný agonista rozumíme ligand, který i přes plné obsazení receptorů dokáže aktivovat receptor, i když jen z malé části. Inverzní agonista je ligand, který dokáže snižovat bazální aktivitu a tím inhibovat receptor. Antagonista, poslední zmíněný ligand, nemá žádný účinek na bazální aktivitu, ale svojí vazbou k receptoru brání nasednutí ostatních ligandů (*Kobilka and Deupi, 2007*).

2.3.2 G protein

G proteiny tvoří jednu z nejdůležitějších částí signální dráhy GPCRs a jsou zodpovědně za regulaci specifické buněčné odpovědi. Tyto proteiny jsou tvořeny ze tří základních podjednotek α , β , γ , které vytvářejí heterotrimer. Podjednotka α je schopna vázat guaninový nukleotid (GDP nebo GTP), kdy GDP se váže v inaktivní formě G proteinu a GTP naopak v aktivované formě. Za výměnu GDP/GTP je zodpovědný aktivovaný receptor a jakmile se naváže k α podjednotce GTP, dochází k disociaci této podjednotky od podjednotek $\beta\gamma$.

Obecně lze rozdělit G proteiny do čtyř hlavních skupin. G_s proteiny stimulují efektor zvaný adenylylcykláza, který následně katalyzuje produkci cAMP. G_i proteiny mohou inhibovat aktivitu adenylylcyklázy, G_q proteiny jsou spjaty s aktivací fosfolipázy C a G_{12} proteiny regulují signální dráhu, která zahrnuje MAP kinázy (*Hamm, 1998*).

2.3.3 Signalizace

Signalizace závislá na G proteinech probíhá následujícím způsobem. V první řadě dochází k vazbě ligandu (agonisty) na membránový receptor. Tato vazba dokáže vyvolat konformační změny daného receptoru, z nichž je nejvýraznější změna na pozici TMVI a receptor pak dokáže interagovat s příslušným heterotrimerním G proteinem. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, příslušný G protein se nachází v inaktivní formě s navázaným GDP. Aktivovaný receptor umožní výměnu GDP za GTP na α podjednotce, následně dochází ke změně heterotrimerního uspořádání G proteinu a disociaci α podjednotky od $\beta\gamma$ dimeru. Obě tyto podjednotky interagují se svými efektory, což jsou většinou enzymy zodpovědné za syntézu tzv. druhých posílů, díky kterým se signál dále šíří buňkou.

K ukončení signálu dochází při rozštěpení GTP na α podjednotce na GDP a volný fosfát. Ke štěpení napomáhá nejenom samotná α podjednotka svojí GTPázovou aktivitou, ale také RGS (regulator of G-protein signaling) proteiny, které urychlují štěpení GTP na GDP. Po hydrolyze GTP α podjednotka s navázaným GDP získává opět afinitu k $\beta\gamma$ dimeru a tvoří tak společně inaktivní heterotrimerní uspořádání (*Pierce a kol., 2002*).

3 β -Arrestin

β -Arrestin je protein, který se účastní několika důležitých procesů v buňce. Konkrétně jsou to procesy zahrnující přenos signálu prostřednictvím GPCRů, G proteinů a následných komponent jejich signálních drah. Tato kapitola se bude věnovat dvěma hlavním procesům: desenzitizace a internalizace.

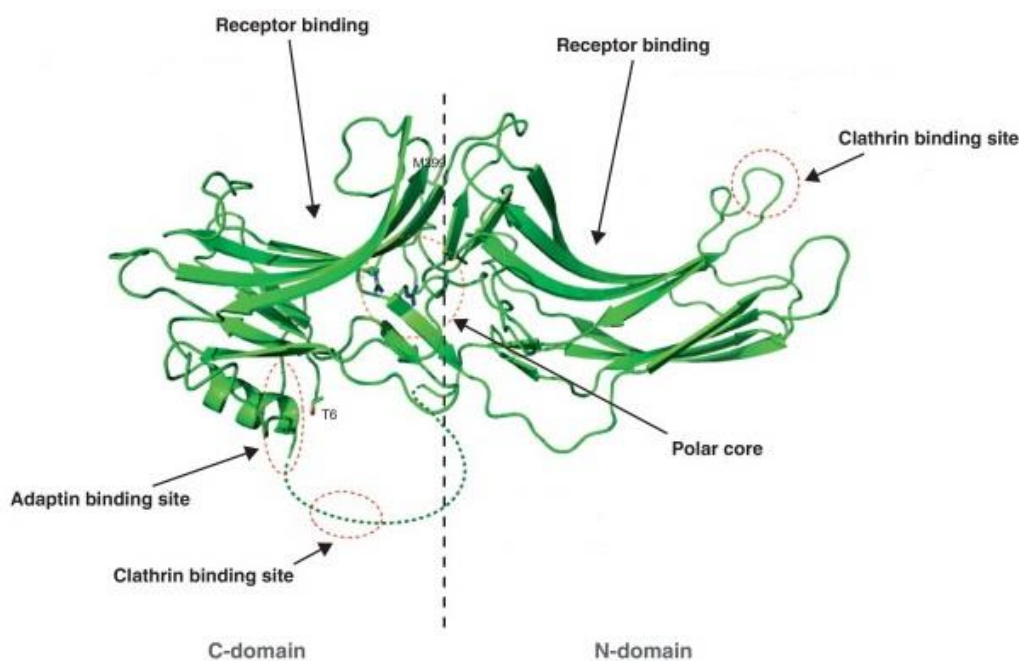
Objevení β -arrestinu předcházely pokusy, které byly zaměřeny na správnou izolaci receptoru rhodopsinu, zkoumání jeho fosforylace pomocí rhodopsin kinázy a následné desenzitizace (*Shichi & Somers, 1978*). Kolem roku 1980 se začal zkoumat β_2 -adrenergní receptor a jeho fosforylace pomocí β -adrenergní receptor kinázy (β ARK). Prvotní myšlenkou bylo, že samotná fosforylace je zodpovědná za desenzitizaci receptoru, tudíž by bylo logické, že čím lépe by byla β ARK purifikována, tím více by byl β_2 -adrenergní receptor inaktivován. Následné purifikace vedly k závěru, že dochází právě k opaku. Tato skutečnost vedla vědce k myšlence, že purifikací je odstraňován důležitý kofaktor, který napomáhá samotné inaktivaci. Proto vědci přidali do směsi čistý retinal arrestin, který způsobuje inaktivaci fosforylovaného receptoru rhodopsinu a poté došlo i k inaktivaci β_2 -adrenergního receptoru. Následně byl objeven β -arrestin. Označení β je odvozeno od β_2 -adrenergního receptoru (*Benovic a kol., 1987*).

3.1 Klasifikace a struktura

β -arrestin se řadí u savců do malé genové rodiny arrestinů. Tato rodina se dělí do 4 tříd, z nichž první a čtvrtá třída patří mezi zrakové arrestiny, druhá a třetí třída jsou β -arrestiny. Konkrétně druhé třídě odpovídá β -arrestin 1 a třetí třídě β -arrestin 2 (*Craft, Whitmore, 1995*).

Strukturu β -arrestinu pomohl popsat především výzkum krystalické struktury vizuálního (zrakového) arrestinu. Ten se skládá ze dvou hlavních domén, které jsou označovány jako C doména a N doména. Každá doména obsahuje sedm β -skládaných listů (β -sheets), které jsou uspořádány do tzv. „sendviče“. Tento sendvič se skládá ze 4 β -skládaných listů a proti nim ze zbylých 3 β -skládaných listů. Obě domény obsahují i α -helixy, v N doméně nalezneme pouze jeden α -helix a v C doméně dva krátké 3_{10} helixy. Další podstatnou částí struktury arrestinu je karboxylový konec (C-konec), který je připojen k C doméně linkerem (spojkou). Na C-konci nalezneme krátký úsek, který vytváří paralelní interakce s bočním řetězcem N domény ve formě β -skládaného listu. Jednou z nejdůležitějších částí arrestinu je polární jádro („polar core“). Jedná se o velmi sekvenčně konzervované místo nacházející se mezi N a C doménou. Strukturně obsahuje aminokyselinové zbytky z N-konce, část z N domény, povrchovou smyčku z C domény a celý C-konec. Polární jádro je nejdůležitější část z hlediska funkce arrestinu (viz obr. 2).

Při srovnání devíti aminokyselinových sekvencí arrestinů se ukázalo, že všichni zástupci této skupiny mají velmi podobné složení. Hlavní rozdíly mezi zrakovými a β -arrestiny jsou především v inzercích mezi C doménou a C-koncem. Právě tato část je zodpovědná za různé interakce, například za vazbu s klatrinem (*Hirsch a kol., 1999*).



Obr. 2. Terciární struktura β -arrestinu s ukázkou vazebných míst

Diagram struktury β -arrestinu 1 znázorňující N a C doménu, polární jádro, vazebná místa pro receptor a pro klatrin a adaptin, molekuly, které jsou zahrnuty v internalizaci GPCRs.

Upraveno podle Kang a kol., 2014

3.2 Funkce

Jak už bylo výše zmíněno, β -arrestin hraje významnou roli v několika buněčných mechanismech. Nejprve se myslelo, že jeho jedinou úlohou v buňce je desensitizovat svojí vazbou aktivovaný receptor. Později se však objevily výzkumy, které dokazují, že samotná desensitizace není jeho jedinou funkcí. Díky vazbě β -arrestinu na receptor může dojít k následné internalizaci receptoru anebo dokonce i signalizaci.

Aby mohl β -arrestin správně fungovat, je potřeba několika dalších komponent a kroků. Mezi tyto komponenty patří jak samotný receptor spřažený s G proteinem, dále ligand, který bude receptor aktivovat a následně speciální kinázy GRK (G protein-coupled kinases).

3.2.1 GRKs

Pro pochopení následujících několika kapitol je potřeba popsat funkci GRK. Kinázy se obecně řadí mezi enzymy, které dokáží přenášet fosfátovou skupinu z vysokoenergetických látek (např. ATP) na konkrétní aminokyselinový zbytek proteinu. Aby byla na receptor přenesena fosfátová skupina, musí dojít nejdříve k aktivaci receptoru pomocí ligandu. Změna konformace aktivovaného receptoru umožní navázání GRK a dojde k fosforylaci (*Premont, Inglese & Lefkowitz, 1995*) Fosforylace probíhá konkrétně na serinových a threoninových aminokyselinových zbytcích, které se nacházejí na intracelulárních smyčkách GPCR a také na C-konci receptoru (*Bouvier a kol., 1988*).

GRK klasifikujeme do sedmi tříd, které označujeme arabskými číslicemi. GRK1 neboli rhodopsin kináza (*Lorenz a kol., 1991*), dále GRK 2 a GRK3, neboli β ARK1 (*Benovic a kol., 1986*) a β ARK2 (*Benovic a kol., 1991*), které jsou spojovány s β_2 -adrenergními receptory, následně GRK4 (*Ambrose a kol., 1992*), GRK5 (*Kunapuli & Benovic, 1993*), GRK6 (*Benovic & Gomez, 1993*) a GRK7 (*Weiss a kol., 1998*). Geny kódující GRKs jsou exprimovány téměř všude. Výjimkou jsou geny pro GRK1 a GRK7, nacházející se v tyčinkách a čípkách retiny (*Weiss a kol., 1998*). Kináza GRK4 se objevuje ve varlatech (*Premont a kol., 1996*)

3.2.2 Desensitizace

Vzhledem k nepřehlednému množství signálních kaskád v buňce je velmi důležité tyto signály efektivně regulovat. Stejně jako ostatní signály v buňce je i signál vedený prostřednictvím GPCR velmi intenzivní a je tedy potřeba, aby buňka dokázala účinně a efektivně tlumit tento signál. První možností (úrovni) tohoto útlumu je mechanismus zvaný desensitizace.

Při výzkumu desensitizace byl jako model nejvíce využíván β_2 -adrenergní receptor. Desensitizace je proces, kdy dochází k zeslabení aktivity příslušného agonistou aktivovaného receptoru. Tento důležitý fyziologický mechanismus chrání receptor před nadměrnou, a to jak akutní, tak i chronickou stimulací (*Ferguson & Caron, 1998*). Hlavním principem desensitizace u GPCRs je, že dojde k přerušení spojení aktivovaného receptoru s příslušným G proteinem. K zablokování tohoto spojení dochází při kovalentní modifikaci receptoru, která je způsobena fosforylací intracelulárními kinázami. Mezi tyto intracelulární kinázy se řadí proteinkináza A (PKA), proteinkináza C (PKC) a již výše zmiňované GRK (*Lohse a kol., 1992*).

U prvních dvou kináz (PKA, PKC) se jedná o klasickou zpětnovazebnou regulaci, jelikož právě tyto kinázy jsou aktivovány díky GPCRs. Kinázy tohoto typu jsou však schopné fosforylovat nejen ligandem aktivované receptory, ale také receptory, které nemají navázaného agonistu. Jedná

se tedy o fosforylaci nezávislou na agonistovi vedoucí k heterologní desensitizaci (*Sibley a kol., 1984*).

Druhou možností je homologní desensitizace, při které dochází k fosforylaci receptoru díky GRKs (*Sibley a kol., 1985*). Princip tohoto typu desensitizace spočívá ve schopnosti GRK rozoznat pouze specifickým agonistou aktivovaný receptor, který následně nafosforyluje a vytvoří tím vazebné místo pro β -arrestin, čímž vznikne fyzická bariéra pro navázání G proteinu a dojde tak k zeslabení signálu (*Lohse a kol., 1989*).

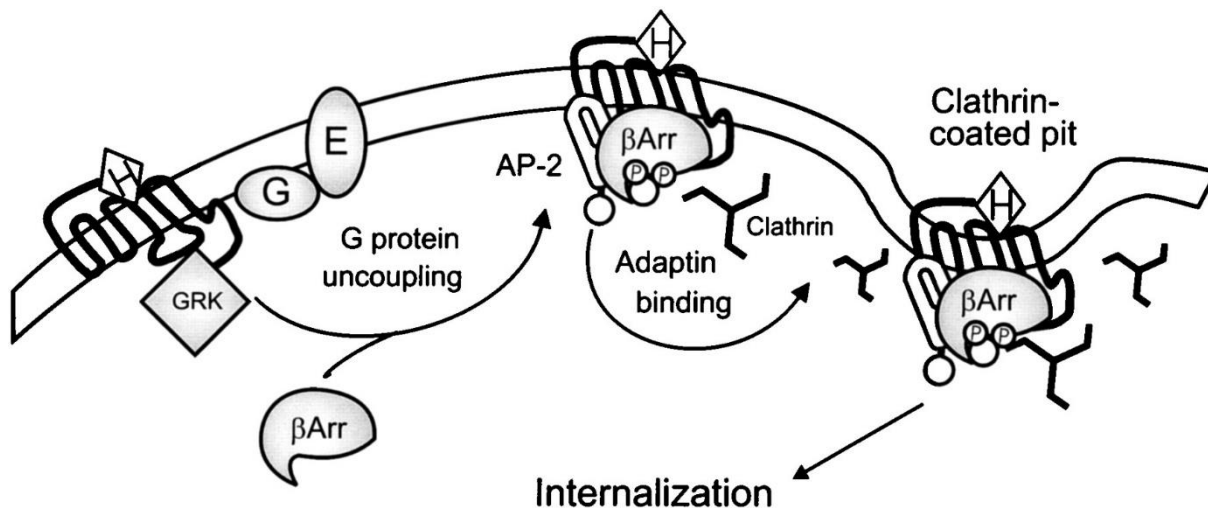
3.2.3 Internalizace

Dalším důležitým procesem v buňce je internalizace. U tohoto mechanismu dochází k oddálení receptoru z plazmatické membrány do buňky. Receptor se pak nachází na povrchu endocytovaného váčku. Následují dvě možné cesty tohoto váčku. Receptor může být za sníženého pH defosforylován pomocí fosfatáz, vrácen zpět na buněčný povrch a znovu využit, neboli recyklován (*Krueger a kol., 1997*). Druhá cesta navede váček s receptorem do lysozomu, kde je degradován. K této představě vedl výzkum založený na použití GFP, neboli zeleného fluorescenčního proteinu, který byl navázán na β_2 -adrenergní receptor. Internalizace byla poté pozorovatelná v reálném čase pomocí fluorescenčního mikroskopu (*Kallal a kol., 1998*).

Endocytovaný váček s receptorem je nejčastěji obalen klatrinem, což je protein, který se skládá do triskelionů (*Pearse, 1975*). Pomocí adaptorových proteinů postupně obaluje váček. Za nejdůležitější část vazby klatrinu je považována C-terminální doména β -arrestinu, konkrétně úsek 77 aminokyselin. Samozřejmě vazbě klatrinu předchází opět aktivace receptoru agonistou, následně jeho fosforylace a navázání β -arrestinu (*Goodman a kol., 1996*).

Nezbytným krokem internalizace je vazba adaptorových proteinů. Jedná se konkrétně o komplex AP-2, který se váže na β -arrestin a umožňuje tak vazbu klatrinu a obalení váčku. AP-2 je heterotetramerní komplex, který se skládá ze 4 podjednotek, z nichž jsou dvě velké a dvě menší. Nejhlavnější podjednotka AP-2 pro vazbu k β -arrestinu je β_2 -adaptin (*Laporte a kol., 1999*). Pro vazbu AP-2 k β -arrestinu jsou esenciální dva argininové zbytky, nacházející se v C-terminální doméně β -arrestinu (*Laporte a kol., 2000*). Průběh internalizace je zobrazen na obrázku 3.

Jedním z důležitých mezikroků při internalizaci je také fosforylace a defosforylace β -arrestinu. V savčích buňkách se β -arrestin vyskytuje přirozeně ve fosforylovaném stavu. Právě po aktivaci receptoru daným agonistou je β -arrestin defosforylován a váže se k receptoru. Defosforylace je u internalizace nutná z hlediska následné vazby klatrinu a adaptorového proteinu AP2. Fosforylace probíhá konkrétně na serinu v pozici 412 (*Lin a kol., 1997*).



Obr. 3. Schéma internalizace receptoru

Na tomto obrázku je znázorněn průběh internalizace. Dochází k navázání hormonu (H), fosforylaci (P-fosfátová skupina) receptoru díky GRK a navázání β -arrestinu (β -arr) a adaptorového proteinu (AP-2). Poté je postupně receptor obalován klatrinem a endocytován.

Podle Ferguson a kol., 2001

3.2.4 Dvě hlavní třídy GPCRs dle afinity k β -arrestinům

Arrestiny se obecně mohou vázat k několika různým typům receptorů. Na základě tohoto se předpokládalo, že receptory mají jakýsi společný sekvenční motiv důležitý pro jejich rozeznání a vazbu arrestinů. V následující studii se kolektiv vědců rozhodl zkoumat interakce mezi arrestiny a GPCRs. Princip tohoto výzkumu byl založen na fluorescenčně značených arrestinech (pomocí GFP) a následným sledováním jejich rozložení v živé buňce před a po aplikaci agonisty (viz obr. 4) (Barak a kol., 1997).

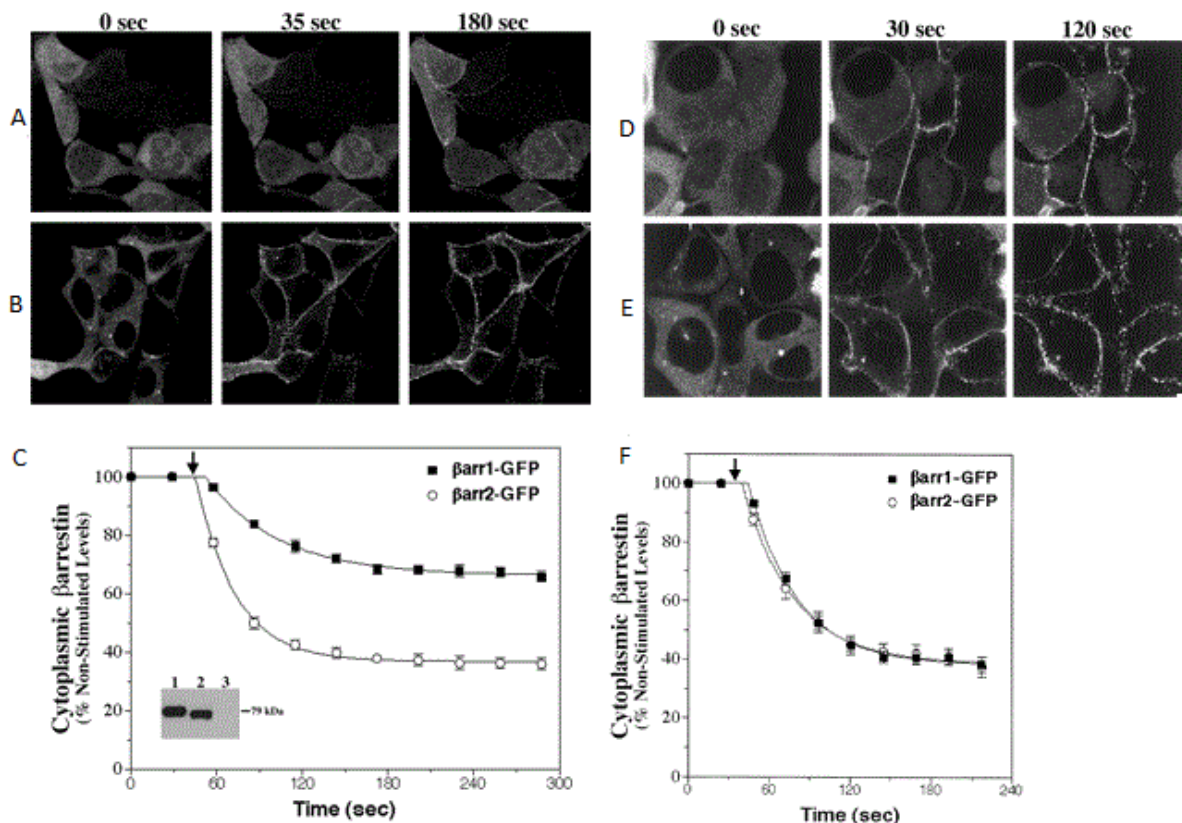
Takto byly identifikovány dvě třídy GPCRs dle jejich odlišné afinity k jednotlivým isoformám β -arrestinu. Třída A, do které zapadá především β_2 -adrenergní receptor, váže β -arrestin2 s větší afinitou než β -arrestin1, zatímco zrakový arrestin neváže vůbec. Třída B, do které se řadí receptory pro angiotensin II typu 1A (AT1AR) a také pro vasopresin typu 2 (V2), dokáží vázat zrakový arrestin a také obě isoformy β -arrestinu se stejnou afinitou. Zastoupení jednotlivých receptorů v třídě A a B je znázorněno v tabulce 2.

Tabulka 2. Příklady jednotlivých receptorů třídy A a třídy B

Třída A	Třída B
β_2 -adrenergní receptor (β_2 AR)	Receptor pro angiotensin II typu 1A (AT1AR)
μ -opioidní receptor (MOR)	Vasopresinový receptor typu 2 (V2R)
Endothelinový receptor typu A (ETAR)	Thyreoliberinový receptor (TRHR)
Dopaminová 1A receptor (D1AR)	Receptor pro substanci P (SPR)
α_1 b-adrenergní receptor (α_1 bAR)	Neurotensinový receptor typu 1 (NTR-1)

Podle Oakley a kol., 2000

Tyto dvě třídy receptorů se liší v internalizaci a následné resensitizaci. U třídy A β -arrestin disociuje od receptoru krátce po internalizaci a receptor je zpět vrácen na plazmatickou membránu, kdežto u třídy B je β -arrestin součástí endocytovaného váčku mnohem delší dobu po internalizaci receptoru a může se tak účastnit aktivace intracelulárních signálních drah (*Oakley a kol., 2000*).



Obr. 4. Translokace β -arr1 a β -arr2 značených GFP k β_2 AR a AT1AR

A a B znázorňují distribuci β -arr1-GFP a β -arr2-GFP před (0 s) a po přidání (35 s a 180 s) 10 μ M isoproterenolu, agonisty pro β_2 AR. U snímků B je vidět, jak se β -arr2 transportuje k plazmatické membráně a váže se k receptorům. Graf C popisuje procentuální zastoupení obou isoform v cytoplasmě po určitý časový úsek. Z grafu lze dobře vidět, že β -arr1 je zastoupen spíše v cytoplasmě oproti β -arr2. Snímky D a E ukazují také distribuci β -arr1-GFP a β -arr2-GFP před (0 s) a po přidání (35 s a 180 s) angiotensinu II, což je agonista pro AT1AR. Jak u snímku D i E je vidět, že se obě isoformy β -arrestinu transportují k plazmatické membráně. Podle grafu F můžeme soudit, že AT1A receptor váže obě isoformy se stejnou afinitou, jelikož jejich zastoupení v cytoplasmě je po přidání agonisty téměř stejné. Upraveno podle Oakley a kol., 2000

3.2.5 Ubikvitinace β -arrestinu

Ubikvitinace je proces, při kterém dochází k označení proteinů v podobě navázání ubikvitinu. Tyto proteiny jsou na základě tohoto označení degradovány v proteasomech. Mechanismus navázání ubikvitinu na určitý protein vyžaduje tři pomocné enzymy E1, E2 a E3. E1 neboli aktivující enzym dokáže za hydrolyzy ATP vázat thioesterovou vazbou ubikvitin a aktivovat tak glycin na C-konci ubikvitinu. Aktivní ubikvitin je poté přenesen na enzym E2 opět za hydrolyzy ATP. Posledním krokem je přenos aktivního ubikvitinu na určitý protein, což probíhá přes enzym E3, neboli ubikvitin proteinligázu, která je zodpovědná za amidovou vazbu mezi ubikvitinem a substrátovým proteinem (Hershko a kol., 1980; Haas a kol., 1982; Hershko a kol., 1983).

β -Arrestin podléhá velmi rychlé ubikvitinaci po vazbě k aktivovanému receptoru. β -Arrestin navázaný na receptor funguje jako adaptor pro E3 ubikvitin ligázu, konkrétně MDM2, která je zodpovědná za přenos ubikvitinu. Pro následnou internalizaci aktivovaného receptoru je ubikvitinace β -arrestinu nezbytná.

Také dochází k ubikvitinaci β_2 -adrenergního receptoru, ale je nutné, aby receptor byl aktivovaný agonistou a byl na něm navázaný β -arrestin. Ubikvitinace β_2 -adrenergního receptoru slouží jako indikace pro následnou degradaci receptoru v lysozomech (*Shenoy a kol., 2001*).

4 Úloha β -arrestinů v signalizaci iniciované GPCRs

β -Arrestin nejdříve představoval molekulu, která pouze zabraňuje signalizaci iniciované prostřednictvím GPCRs. Tato představa byla pozměněna ve chvíli, kdy se objevily výzkumy, které poukazovaly i na možné funkce β -arrestinu v buněčné signalizaci.

Jednou z hlavních rolí β -arrestinu v signalizaci je jeho schopnost fungovat jako adaptor pro několik různých molekul, které se účastní signálních drah. Nejprve byla objevena vazba Src (nereceptorové tyrosinové kinázy) k β -arrestinu (Luttrell a kol., 1999). Následoval objev role β -arrestinu i v MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskádě, která zahrnuje několik různých molekul a cest. V neposlední řadě se objevily nové poznatky o možné funkci β -arrestinu v regulaci jaderných procesů.

4.1 Interakce Src a β -arrestinu

Nová role β -arrestinu jako adaptoru byla potvrzena na základě výzkumu týkajícího se jeho interakce s molekulou Src. Při jednom z pokusů se vystavil β_2 -adrenergní receptor agonistovi (konkrétně isoproterenolu) a v důsledku toho došlo k redistribuci β -arrestinu a Src k plazmatické membráně. To vedlo k závěru, že dochází k této interakci a konkrétně, že Src se váže na N-konec defosforylovaného β -arrestinu. Tento komplex je poté navázán na receptor, dojde k jeho internalizaci a poté se spouští aktivace Erk 1/2 kaskády (Luttrell a kol., 1999)

4.2 Regulace MAPKs dráhy prostřednictvím β -arrestinu

MAPK signální dráha je tvořena dlouhým sledem interagujících proteinů, kterými je veden signál například až do jádra a hraje tedy v buňce také velmi důležitou roli. Principem této dráhy jsou proteinkinázy, které v určitém stupni kaskády fosforylují další proteinkinázu. Následně dochází k fosforylaci například transkripčních faktorů, cytoskeletárních faktorů a dalších enzymů, což vede k ovlivnění exprese genů či metabolismu. Kaskáda se skládá z MAPKK kináza (MAPKKK), která fosforyluje MAPK kinázu (MAPKK) a ta poté aktivuje MAP kinázu (MAPK). Do každé z těchto tří úrovní spadají různé kinázy, konkrétně 14 zástupců v MAPKKK, 7 v MAPKK a 12 v MAPK (Widmann a kol., 1999; Zhang & Liu, 2002; Qi & Elion, 2005)

V této kapitole nás budou zajímat nejvíce kinázy, které jsou v poslední zmíněné skupině MAPK. Tato skupina má 12 kináz, avšak pouze tři z nich (ERK 1/2, JNK3 a p38) se účastní této kaskády a zároveň interagují s β -arrestinem.

4.2.1 Aktivace ERK 1/2

ERK 1/2 je jednou z MAP kináz, které mohou být aktivovány i přes G protein nezávislou signální dráhu, tedy přes β -arrestin. Klasická cesta aktivace ERK 1/2 je ale spíše spojována se signalizací prostřednictvím G proteinů (*Daaka a kol., 1997*).

U této aktivace hraje také důležitou roli typ GPCRs. Pokud se podíváme na receptor pro angiotensin II typu 1A (AT1AR), bude u něj probíhat aktivace ERK 1/2 rozdílně než u β_2 -adrenergního receptoru. To je dáno především způsobem jejich vazby a afinity k β -arrestinu, jelikož každý receptor spadá do jiné třídy (viz kapitola 2.2.4).

Případ aktivace ERK 1/2, ve které hraje roli AT1A receptor, poukazuje na to, že tento receptor dokáže vázat β -arrestin velmi dobře a tato vazba přetrvává i po jeho internalizaci. β -Arrestin je pak schopen vytvořit jakési lešení pro ostatní kinázy, které jsou důležité pro následnou aktivaci ERK 1/2. Mezi tyto kinázy patří Raf-1 a MEK. Na tento komplex se poté naváže ERK 1/2, který se vyskytuje v cytosolu. Celý tento proces probíhá na povrchu endocytovaného váčku s receptorem (*Luttrell a kol., 2001*). Je zajímavé, že u tohoto typu aktivace je vyžadována pouze isoforma β -arrestin2, jelikož β -arrestin1 působí jako inhibitor této dráhy (*Ahn a kol., 2004*).

U druhé skupiny receptorů, mezi které patří β_2 -adrenergní receptor, dochází k aktivaci ERK 1/2 i za předpokladu, že se β -arrestin nevyskytuje v endocytovaném váčku. Zde se využívají obě isoformy β -arrestinu (*Shenoy a kol., 2006*).

4.2.2 Aktivace JNK3

JNK3 neboli tzv. stresem aktivovaná proteinkináza je jednou z dalších MAPK, která může být aktivovaná β -arrestinem. Její aktivace je způsobena dvojitou fosforylací na threoninových a tyrosinových zbytcích. Za tuto fosforylací jsou zodpovědné MAPKK a to konkrétně MKK4 nebo MKK7, které jsou aktivovány taktéž fosforylací díky MAPKKK, konkrétně ASK1.

Při výzkumu tohoto typu signalizace byl využit AT1A receptor a dva kvasinkové hybridní systémy, které dokázaly, že JNK3 je partnerem vázajícím se k β -arrestinu. Za normálních podmínek se JNK3 pohybuje mezi cytosolem a jádrem, avšak po zvýšené expresi β -arrestinu2 v buňce dochází k vyloučení JNK3 z jádra. Následně byla věnována pozornost také interakci MKK4, ASK1 a JNK3 s β -arrestinem2, a přitom se potvrdilo, že dochází k velmi slabé vazbě mezi β -arrestinem a MKK4, to se však změnilo v přítomnosti JNK3 a ASK1. Tyto výsledky napovídají, že MKK4 se neváže přímo na β -arrestin, ale využívá vazbu k JNK3 a ASK1, které se přímo váží s β -arrestinem (*McDonald a kol., 2000*).

4.2.3 Aktivace p38

MAP kináza p38 je zahrnuta v několika různých buněčných procesech jako například diferenciaci buněk, buněčný cyklus, apoptóza či při zánětech. Dále funguje i jako kináza, která může fosforylovat transkripční faktory a ovládat tak genovou expresi (*Ono & Han, 2000*).

p38 se však objevuje i v chemotaxi (*Ashida a kol., 2001*). Tato signalizace probíhá přes chemokinový receptor CXCR4, který patří do skupiny GPCRs. I na tento receptor se váže β -arrestin, snižuje tak jeho aktivaci a dochází i k internalizaci (*Cheng a kol., 2000*). Následná studie dokázala, že β -arrestin je zahrnut do chemokinem indukované aktivace p38. Molekulární mechanismus této aktivace je dosud nejasný, avšak předpokládá se, že jsou zde opět zahrnuty kinázy ASK1 a MKK4 (*Sun a kol., 2002*).

Další receptor, který indukuje aktivaci MAP kinázy p38, je virový receptor US28. Zajímavostí tohoto receptoru je jeho neustála fosforylace i v nepřítomnosti agonisty. Při zvýšené expresi GRK2 a GRK5 v buňkách, ve kterých se nachází i US28, se ukázalo, že tyto GRK jsou schopné indukovat silnější fosforylaci serinových a threoninových zbytků US28 a na základě této fosforylace je přivolán β -arrestin a dochází k internalizaci receptoru. K důkazu o tom, že US28 je zahrnut v aktivaci p38, byl využit mutovaný receptor US28-(1-314), u kterého byly deletovány všechny serinové a threoninové zbytky na C-konci. Tento mutovaný receptor pak následně selhal v přivolání β -arrestinu a naopak zvýšil aktivaci signální dráhy, která vede k tvorbě inositol fosfátu. Poté se ukázalo, že tento mutant snižuje také aktivaci MAP kinázy p38, což vedlo k myšlence, že tato aktivace je regulována jinak, pravděpodobně β -arrestinem podobně jako u aktivace ERK 1/2 a JNK3 přes AT1A receptor (*Miller a kol., 2003*).

4.3 Jaderná signalizace prostřednictvím β -arrestinu

Úlohu β -arrestinu v jádře, potvrdila studie, která se zabývala buněčnou lokalizací obou isoform β -arrestinu. Zatímco lokalizace β -arrestinu1 je jak v cytoplasmě, tak v jádře, β -arrestin2 nalezneme pouze v cytoplasmě. Obě isoformy mají lokalizační jaderný signál, ale β -arrestin2 má jaderný exportní signál, který mu umožní dostat se do cytoplasmy. Tento exportní signál se nachází na C-konci β -arrestinu mezi aminokyselinami 390 a 400 (*Scott a kol., 2002*).

4.3.1 Regulace transkripce přes NF- κ B

NF- κ B, jaderný faktor- κ B, je všudypřítomný transkripční faktor. Za jeho neaktivní formu v cytoplasmě je zodpovědný inhibitor I κ B, který je navázaný na NF- κ B a znemožňuje tak jeho transport do jádra. Avšak po působení aktivačních látek pro NF- κ B, jako například lipopolysacharid (LPS) nebo forbolester, dochází k fosforylaci inhibitoru a následné disociaci od NF- κ B. Poté je

aktivovaný NF- κ B ihned transportován do jádra, kde podporuje aktivaci transkripce určitých genů (*Sen & Baltimore, 1986a; 1986b; Baeuerle & Baltimore, 1988*).

β -arrestin v tomto mechanismu opět funguje jako adaptor. Konkrétně obě isoformy β -arrestinu interagují přímo s inhibítorem I κ B α . Interakce probíhá přes N-konec β -arrestinu a C-konec inhibítora I κ B α . Role této interakce spočívá ve stabilizaci vazby inhibítora s NF- κ B a tudíž zabránění transportu NF- κ B do jádra. Konkrétně vazba β -arrestinu2 k inhibítora zabraňuje jeho možné fosforylaci a následné degradaci a naopak zvyšuje počet I κ B α , což dokazuje, že β -arrestin2 stabilizuje svoji vazbou inhibitor (*Gao a kol., 2004; Witherow a kol., 2004*).

4.3.2 Regulace MDM2

MDM2 je onkoprotein, který se účastní v inhibici transkripčního faktoru p53. Při buněčném stresu dochází právě k aktivaci p53, který následně zastavuje buněčný růst (*Mercer a kol., 1990*) a indukuje apoptózu (*Yonish a kol., 1991*). Pokud je p53 aktivní, umožňuje přepis genu pro MDM2 protein. MDM2 pak funguje jako negativní regulátor p53. Po navázání MDM2 na p53 dochází k ubikvitinaci a následné degradaci p53 v proteazomech. Ubikvitinace je způsobena oncoproteinem MDM2, jelikož má funkci E3 ubikvitin ligázy (*Honda a kol., 1997; Fang a kol., 2000*). Jedná se o tzv. zpětnovazebnou smyčku mezi MDM2 a p53 (*Wu a kol., 1993*).

Zahrnutí β -arrestinu do toho mechanismu je přes vazbu k MDM2. μ -Opioidní receptor napomohl k důkazu o této vazbě, dokonce, pokud je receptor aktivován příslušným agonistou, dochází i ke zlepšení této vazby, což znamená, že stimulace GPCRs může regulovat vazbu mezi MDM2 a β -arrestinem. Transport MDM2 k aktivovanému receptoru je zajištěný díky schopnosti β -arrestinu vázat se k MDM2.

β -arrestin má co do činění i s regulací MDM2 a p53, kde redukuje MDM2 indukovanou ubikvitinaci proteinu p53, což vyústí ke snížení degradace p53. Nadměrná exprese β -arrestinu 2 v buňkách Saos2 zabraňuje degradaci p53 a dochází tak ke zvýšení apoptózy.

Vazebné místo na β -arrestinu pro MDM2 se nachází na N-konci, u MDM2 se β -arrestin váže v regionu mezi 383 a 410 aminokyselinou MDM2 (*Wang a kol., 2003*).

4.3.3 Funkce β -arrestinu v jádře

Po zjištění jaderné lokalizace β -arrestinu1 se objevily domněnky o jeho přímé roli v jádře, například v regulaci transkripce. Kang a jeho kolegové uvedli studii ohledně jedinečné funkce β -arrestinu v jádře. V této studii byl využit δ -opioidní receptor (DOR) a první pokusy vedly k myšlence, zda aktivace DOR indukuje translokaci β -arrestinu do jádra. Opět byl použit fluorescenčně značený β -arrestin a po aktivaci DOR agonistou došlo k transportu obou isoform β -arrestinu k plazmatické membráně a následně se β -arrestin1 translokoval do jádra. Tato

translokace β -arrestinu1 byla poté potvrzena při aktivaci κ -opioidního receptoru, avšak při aktivaci μ -opioidního a β_2 -adrenergního receptoru došlo pouze k transportu β -arrestinu1 k plazmatické membráně, nikoliv do jádra.

Byla popsána funkce β -arrestinu v jádře, která spočívá v regulaci exprese genů, konkrétně genů *p-27* a *c-fos*. Tyto geny hrají roli v apoptóze a buněčném cyklu. Jaderná funkce β -arrestinu je spojena pravděpodobně s aktivací DOR a následné translokaci β -arrestinu do jádra.

Regulace transkripce prostřednictvím β -arrestinu1 spočívá v acetylaci histonu H4. Akumulace β -arrestinu v jádře souvisí s funkcí promotorů genů *p-27* a *c-fos*. Acetylace pak probíhá na těchto promotorech. Konkrétně acetyltransferáza p300 hraje roli v acetylaci těchto promotorů. Po její nadměrné expresi v buňkách se zvýšila acetylace histonu H4 v promotorových oblastech genů *p-27* a *c-fos*. Efekt acetylace byl rozšířen při koexpresi β -arrestinu1. Vazba β -arrestinu k tzv. CREB proteinu je nutná, aby mohla být acetyltransferáza p300 přivolána. Veškeré tyto poznatky vedou k výsledku, že p300 způsobuje β -arrestinem1 zprostředkovanou acetylaci histonu H4 v promotorových oblastech (Kang a kol., 2005).

4.4 Regulace hedgehog signální dráhy

Hedgehog signální dráha je jednou z důležitých signálních drah při embryonálním vývoji. Nejenom, že je důležitá při larvální segmentaci *Drosophily*, ale především je potřebná pro správný vývoj živočichů a pro určování osudu jednotlivých buněk v lidském těle (Ingham & McMahon, 2001)

Ligandem v této signální dráze je právě hedgehog protein, který se dokáže vázat na receptor a spouští signální dráhu, která vede k aktivaci transkripce příslušných genů. Tato dráha zahrnuje receptory patched (Ptc) a smoothed (Smo) a také mnoho dalších proteinů v cytoplasmě. Základní paradigma tohoto mechanismu spočívá v inhibici Smo receptoru, za což je zodpovědný neaktivní Ptc receptor. Díky inhibovanému Smo receptoru nemůže docházet k aktivaci transkripce daných genů, avšak po navázání ligandu hedgehog na receptor Ptc dochází k uvolnění jeho represe na Smo receptor, který se aktivuje. Tak jsou spuštěny další procesy v buňce, které vyústí v aktivaci transkripčního faktoru, který se transportuje do jádra a umožní transkripci genů (Murone a kol., 1999).

První poznatky o zahrnutí β -arrestinu v této signalizaci jsou ze studie z roku 2004, kde se β -arrestin2 ukázal jako nezbytný regulátor hedgehog signalizace u zebřičky v jejím embryonálním vývoji (Wilbanks a kol., 2004). K potvrzení vazby β -arrestinu k aktivovanému Smo receptoru byl použit fluorescenčně označený β -arr2. Výsledky poté ukázaly, že vazba hedgehog ligandu a aktivace Smo receptoru přiláká β -arr2 k plazmatické membráně. Otázka, zda je receptor také fosforylován podobně jako i u jiných GPCRs, byla zodpovězena po expresi GRK2. Touto kinázou

zprostředkovaná fosforylace zvýšila transport β -arrestinu k receptorům Smo v plazmatické membráně a následně bylo i potvrzeno, že po fosforylaci a vazbě β -arrestinu k Smo receptoru dochází i k jeho internalizaci (Chen a kol., 2004)

Mnohem zajímavější funkce β -arrestinu u obratlovců v této dráze je pomoc při lokalizaci Smo receptoru do primárního cília. Dříve se poukázalo na to, že Smo receptor je během své aktivace transportován do cília za pomoci intraflagelárního transportního komplexu (ITF) (May a kol., 2005). Konkrétně kinesin-2 motorový komplex napomáhá u tohoto transportu při hedgehog signalizaci. Kif3A je podjednotka kinesin-2 motorového komplexu (Huangfu a kol., 2003), ke které se váže β -arrestin a napomáhá tak v transportu Smo receptoru do primárního cília u obratlovců (Kovacs a kol., 2008).

4.5 Regulace Wnt signální dráhy

Obdobně jako hedgehog signální dráha, i Wnt signalizace je zapojena především při vývoji embrya. Wingless (Wnt) je ligand, vázající se k Frizzled (Fz) receptoru. Wnt signalizace reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a polaritu v buňkách při určitých stádiích vývoje.

Při kanonické cestě této signalizace dochází po navázání Wnt k aktivaci Fz receptoru, který přeposílá signál několika dalším proteinům, do kterých se řadí dishevelled (Dsh), axin, glykogen syntáza kináza-3 β (GSK-3 β), APC (Adenomatous Polyposis Coli) a transkripční regulátor β -katenin. Pokud je receptor neaktivní, β -katenin je poměrně v nízké koncentraci v cytoplasmě, jelikož je neustále fosforylovaný od GSK-3 β a následně ubikvitinovaný a dochází tak k jeho degradaci v proteazomu. Jakmile se Wnt naváže na receptor, dojde k rozpuštění komplexu GSK-3 β /APC/Axin, tím pádem nedochází k degradaci β -kateninu, který se tak nahromadí v cytoplasmě a transportuje se do jádra, kde se váže k transkripčním faktorům a spouští transkripci cílových genů (Moon a kol., 2004).

U nekanonické cesty je signál přenášen nezávisle na β -kateninu a to dvěma možnými cestami. Do jedné z nich jsou zahrnuty Rho a Rac proteiny, které se řadí do skupiny malých GTPáz. Po aktivaci Fz receptoru se nese signál přes tyto dva proteiny a dochází k přestavbě aktinového cytoskeletu (Schlessinger a kol., 2009). U druhé dochází po navázání Wnt na receptor k uvolnění intracelulárního vápníku, který inhibuje kanonickou cestu Wnt signalizace (Kohn & Moon, 2005).

β -arrestin hraje roli v internalizaci receptoru u kanonické cesty signalizace. Dsh2 se váže na aktivovaný receptor a přes něj dochází i k vazbě β -arrestinu a internalizaci. Tím je β -katenin volný v cytoplasmě a může se translokovat do jádra a umožnit tak přepis genů. K internalizaci konkrétně Fz4 receptoru je vyžadován ligand Wnt5A a aktivace PKC (Chen a kol., 2003).

5 Terapeutický potenciál β -Arrestinu

Jak už bylo na začátku práce napsáno, díky mnoha fyziologickým procesům, které jsou regulované prostřednictvím GPCRs, se tyto receptory dostávají do pozornosti vědců jako důležitý cíl pro vývoj nových léčiv. Vlastnosti ligandů hrají důležitou roli v jejich možném terapeutickém uplatnění. V této kapitole se budu věnovat pouze několika vybraným receptorům a jejich ligandům, které mají možný potenciál ve zlepšení léčby určitých chorob.

Vývoj léčiv je založený na ligandech schopných se selektivně vázat k receptorům. Termín usměrňovací (angl. biased) ligand vysvětluje schopnost navázaného ligandu stabilizovat určitou konformaci receptoru a spouštět vybrané aktivity tohoto receptoru. S tímto souvisí i termín dokonalé usměrňování („perfect bias“), který poukazuje na vlastnosti ligandu, který je schopen po navázání stimulovat pouze jednu danou aktivitu receptoru bez stimulace jiné aktivity receptoru. V této kapitole půjde především o usměrňovací ligandy pro β -arrestin (*Violin & Lefkowitz, 2007*).

5.1 μ -Opioidní receptor (MOR)

U μ -opioidního receptoru bylo poukázáno na ligandy, které jsou schopny po navázání k receptoru umožnit jeho fosforylaci a přivolání β -arrestinu. Konkrétně se jedná o endogenní enkefalin a opiáty, jako například morfin nebo etorfin. Po navázání enkefalinu a etorfinu dojde k internalizaci receptoru, avšak pokud se naváže morfin, překvapivě dochází ke snížení internalizace (*Keith a kol., 1996*). To vypovídá o velmi slabé schopnosti morfinu stimulovat fosforylaci receptoru (*Zhang a kol., 1998*).

Pokusy, ve kterých byl u myši odstraněn β -arrestin2 (β -arrestin2 KO myši), ukázaly zvýšenou a prodlouženou analgezii indukovanou morfinem a také zlepšení a vyšší účinnost vazby G proteinu k receptoru (*Bohn a kol., 1999*). β -Arrestin2 KO myši jsou také resistantní vůči vytváření chronické tolerance pro morfin nebo se u nich neprojevují vedlejší účinky způsobené morfinem (*Bohn a kol., 2000*).

Byl však objeven novější ligand zvaný herkinorin, který působí ještě více negativně než morfin. Tento ligand poskytuje zvýšení analgesie vyvolané opiáty a dokáže se vyhnout vedlejšími účinkům opiátů, které jsou zprostředkované β -arrestinem2 (*Groer a kol., 2007*).

5.2 Receptor pro angiotensin II typu 1 (AT1AR)

Tento receptor je znám především pro svoji schopnost regulovat krevní tlak. Při léčbě vysokého krevního tlaku je receptor cílem pro jeho blokátory (ARBs), což je například valsartan a

losartan. Tito antagonisté znemožní signalizaci závisující na G proteinu a dojde tak ke snížení krevního tlaku (*Hedner a kol., 1999*).

AT1A receptor je spojený právě i se signalizací, která nezahrnuje G proteiny, nýbrž β -arrestin. Signalizace prostřednictvím β -arrestinu se projevuje zvýšením buněčného růstu, proliferací či cytoprotekcí (*Zhai a kol., 2005*). Aby mohlo k této signalizaci dojít, musí se navázat správný agonista. V tomto případě byl objeven dokonale usměrňovací ligand se zkratkou SII (*Holloway a kol., 2002*). Účinek SII ligandu by mohl být velmi přínosný, neboť po navázání inhibuje signalizaci zprostředkovanou G proteinem, což ve výsledku sníží krevní tlak, ale na druhou stranu aktivuje β -arrestinovou signalizaci, která má přínosné účinky pro buňku (*Violin & Lefkowitz, 2007*).

5.3 Receptor pro parathyroidní hormon typu 1 (PTH1R)

Tento receptor je velice důležitý pro regulaci homeostázy vápníku v kostech, která vyžaduje pro své udržení správnou regulaci při vytváření a resorpci kostí. Jeho nejvýznamnějším ligandem je parathyroidní hormon (PTH a dále také parathyroidnímu hormonu příbuzný peptid (PTHrP). Po navázání parathyroidního hormonu k receptoru může dojít k signalizaci přes G_s , G_q nebo β -arrestin. Existují však deriváty PTH zkrácené o jednu aminokyselinu PTHrp(2-36), Bpa¹-PTHrP(1-36), které aktivují signalizaci pouze přes G_s (*Bisello a kol., 2002*) nebo deriváty D-Trp¹², Tyr³⁴PTH (7-34) fungující jako inverzní agonisté pro G_s -signalizaci, což znamená, že aktivují pouze β -arrestin.

Právě ligand, který spouští signalizaci prostřednictvím β -arrestinu a zároveň blokuje G protein, indukuje novotvorbu kostí bez stimulace jejich resorpce. Tato aktivita byla porušena u myši, u kterých byl zrušen gen pro β -arrestin2. Nové poznatky o tomto ligandu mohou hrát velmi významnou roli ve vývoji nových terapeutik pro léčbu osteoporózy (*Gesty-Palmer a kol., 2009*).

6 Závěr

Buňky si pro komunikaci s okolím a mezi sebou vytvořily neuvěřitelně chytrý a velmi dobře propracovaný systém. Tento systém zvaný buněčná signalizace jim na základě přijímání signálů napomáhá řešit například krizové situace nebo otázku diferenciaci buňky. Do tohoto mechanismu jsou v buňce zahrnuty receptory nacházející se v plazmatické membráně a mnoho molekul v cytoplasmě a v jádře. Mimo buňku jsou to látky, které jsou schopny vázat se k receptorům, měnit tak jeho konformaci a posílat jejich signál dále do buňky.

Tato práce je věnována jedné třídě receptorů zvané GPCRs, neboli receptory spřažené s G proteiny. Zkoumání těchto receptorů poodhalilo jejich, teď už, velmi jasnou strukturu a následně klasickou cestu signalizace probíhající prostřednictvím heterotrimerních G proteinů.

V posledních 10-15 letech se dostala do povědomí vědců zajímavá molekula, která byla schopna šířit signál od aktivovaného GPCR, avšak nezávisle na G proteinu. Tato molekula zvaná β -arrestin dokáže zabránit navázání G proteinu na aktivovaný receptor a tím ho desensitizovat a to v podobě kovalentní vazby samotného β -arrestinu k receptoru. Tato mechanická bariéra však vyžaduje další potřebné procesy, aby se β -arrestin mohl na receptor navázat. Těmito procesy jsou fosforylace ligandem aktivovaného receptoru a naopak defosforylace volného cytoplasmatického β -arrestinu. Po vazbě k receptoru je β -arrestin schopný internalizovat receptor a sloužit jako adaptor pro molekuly potřebné k obalení váčku s receptorem.

Složitou funkci má β -arrestin v přenosu signálu. Jeho schopnost sloužit jako adaptor se využívá v různých typech buněčné signalizace, počínaje od MAP kinázové dráhy, přenosu signálu do jádra až k důležité embryonální signalizaci přes Smothened a Frizzled receptory. Osobně mě nejvíce zaujala funkce β -arrestinu v jádře, kde dokáže přímo regulovat transkripci genů. Tuto regulaci provádí díky své schopnosti přivolat k promotorové oblasti genů acetyltransferázu p300, která acetyluje histon H4 a dochází k přepisu genu.

Spouštění signálních drah závislých na G proteinu nebo na β -arrestinu se využívá ve výzkumu nových farmakoterapeutik. Právě rozdílné cesty signalizace mají různé fyziologické dopady. Například u μ -opioidního receptoru dochází při spuštění signalizace prostřednictvím β -arrestinu ke snížení krevního tlaku a vytvoření cytoprotekce.

7 Seznam použité literatury

- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T. R., & Lefkowitz, R. J. (2004). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by β -arrestins 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7807-7811.
- Ambrose, C., James, M., Barnes, G., Lin, C., Bates, G., Altherr, M., Duyao, M., Groot, N., Church, D., Wasmuth, J. J., Lehrach, H., Housman, D., Buckler, A., Gusella J. F., & MacDonald M. E. (1992). A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16. 3. *Human Molecular Genetics*, 1(9), 697-703.
- Ashida, N., Arai, H., Yamasaki, M., & Kita, T. (2001). Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16555-16560.
- Baeuerle, P. A., & Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 242(4878), 540-546.
- Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., & Caron, M. G. (1997). A β -arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27497-27500.
- Benovic, J. L., & Gomez, J. (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19521-19527.
- Benovic, J. L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1987). Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 8879-8882.
- Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1991). Cloning, expression, and chromosomal localization of β -adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 14939-14946.
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1986). β -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2797-2801.
- Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., Monticelli, L., Mierke, D. F., & Ferrari, S. L. (2002). Selective ligand-induced stabilization of active and desensitized parathyroid hormone type 1 receptor conformations. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38524-38530.
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., & Lin, F. T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science*, 286(5449), 2495-2498.
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). μ -Opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720-723.
- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the 82-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, 333, 370-373.
- Craft, C. M., & Whitmore, D. H. (1995). The arrestin superfamily: cone arrestins are a fourth family. *FEBS Letters*, 362(2), 247-255.

- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655), 88-91.
- Davies, M. N., Secker, A., Freitas, A. A., Mendao, M., Timmis, J., & Flower, D. R. (2007). On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics*, 23(23), 3113-3118.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., & Weissman, A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8945-8951.
- Ferguson, S. S., & Caron, M. G. (1998, April). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 9, No. 2, pp. 119-127). Academic Press.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256-1272.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., & Pei, G. (2004). Identification of β -arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- κ B pathways. *Molecular Cell*, 14(3), 303-317.
- Gesty-Palmer, D., Flannery, P., Yuan, L., Corsino, L., Spurney, R., Lefkowitz, R. J., & Luttrell, L. M. (2009). A β -arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Science Translational Medicine*, 1(1), 1ra1-1ra1.
- Goodman Jr, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., & Benovic, J. L. (1996). β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature*, 383(6599), 447-449.
- Groer, C. E., Tidgewell, K., Moyer, R. A., Harding, W. W., Rothman, R. B., Priszano, T. E., & Bohn, L. M. (2007). An Opioid Agonist that Does Not Induce μ -Opioid Receptor-Arrestin Interactions or Receptor Internalization. *Molecular Pharmacology*, 71(2), 549-557.
- Haas, A. L., Warms, J. V., Hershko, A., & Rose, I. A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 257(5), 2543-2548.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 669-672.
- Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2009). Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure*, 17(1), 8-14.
- Hedner, T., Oparil, S., Rasmussen, K., Rapelli, A., Gatlin, M., Kobi, P., Sullivan, J., & Oddou-Stock, P. (1999). A comparison of the angiotensin II antagonists valsartan and losartan in the treatment of essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 12(4), 414-417.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., & Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(4), 1783-1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., & Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 258(13), 8206-8214.
- Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V., & Sigler, P. B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, 97, 257-270.
- Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S. I., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J., & Thomas, W. G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different

- requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular Pharmacology*, 61(4), 768-777.
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 420(1), 25-27.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426(6962), 83-87.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L. A., Miller, W. E., Caron, M. G., Barak, L. S., Nusse, R., & Lefkowitz, R. J. (2003). Dishevelled 2 recruits β -arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science*, 301(5638), 1391-1394.
- Chen, W., Ren, X. R., Nelson, C. D., Barak, L. S., Chen, J. K., Beachy, P. A., Sauvage, F., & Lefkowitz, R. J. (2004). Activity-dependent internalization of smoothed mediated by β -arrestin 2 and GRK2. *Science*, 306(5705), 2257-2260.
- Cheng, Z. J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y. L., Cen, B., Wu, G. X., & Pei, G. (2000). β -Arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between β -arrestin and CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2479-2485.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., & Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318(5854), 1258-1265.
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15(23), 3059-3087.
- Kallal, L., Gagnon, A. W., Penn, R. B., & Benovic, J. L. (1998). Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged β 2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 322-328.
- Kanapuli, P., & Benovic, J. L. (1993). Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5588-5592.
- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., Yang, R., Fan, F., Chen, X., Pei, G., & Ma, L. (2005). A nuclear function of β -arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, 123(5), 833-847.
- Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, Ch. J., & von Zastrow, M. (1996). Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19021-19024.
- Kobilka, B. K., & Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 397-406.
- Kohn, A. D., & Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38(3), 439-446.
- Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., & Lefkowitz, R. J. (2008). β -Arrestin-mediated localization of Smoothed to the primary cilium. *Science*, 320(5884), 1777-1781.
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., & Lefkowitz, R. J. (1997). The Role of Sequestration in G Protein-coupled Receptor Resensitization: Regulation of β 2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 5-8.

- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., & Barak, L. S. (1999). The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3712-3717.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23120-23126.
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science*, 308(5721), 512-517.
- Lin, F. T., Krueger, K. M., Kendall, H. E., Daaka, Y., Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A., & Lefkowitz, R. J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 31051-31057.
- Lohse, M. J., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., & Benovic, J. L. (1989). Inhibition of β -adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of β 2-adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(9), 3011-3015.
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 267(12), 8558-8564.
- Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J. J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1991). The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the β -adrenergic receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8715-8719.
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S. G., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F. T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1999). β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283(5402), 655-661.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2449-2454.
- May, S. R., Ashique, A. M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., & Peterson, A. S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Developmental Biology*, 287(2), 378-389.
- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J., & Lefkowitz, R. J. (2000). β -Arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, 290(5496), 1574-1577.
- Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., & Ullrich, S. J. (1990). Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(16), 6166-6170.
- Miller, W. E., Houtz, D. A., Nelson, C. D., Kolattukudy, P. E., & Lefkowitz, R. J. (2003). G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and β -arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21663-21671.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., & Kaykas, A. (2004). WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 691-701.

- Murone, M., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Experimental Cell Research*, 253(1), 25-33.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 17201-17210.
- Ono, K., & Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cellular Signalling*, 12(1), 1-13.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739-745.
- Pearse, B. M. (1975). Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *Journal of Molecular Biology*, 97(1), 93IN1197-96IN1398.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 639-650.
- Premont, R. T., Inglese, J., & Lefkowitz, R. J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *The FASEB Journal*, 9(2), 175-182.
- Premont, R. T., Macrae, A. D., Stoffel, R. H., Chung, N., Pitcher, J. A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonals, M. E., & Lefkowitz, R. J. (1996). Characterization of the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK4 Identification Of Four Splice Variants. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6403-6410.
- Qi, M., & Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569-3572.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986)a. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705-716.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986)b. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), 921-928.
- Scott, M. G., Le Rouzic, E., Périanin, A., Pierotti, V., Enslin, H., Benichou, S., Marullo, S., & Benmerah, A. (2002). Differential Nucleocytoplasmic Shuttling of β -Arrestins: Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in β -arrestin2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37693-37701.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., & Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science*, 294(5545), 1307-1313.
- Shenoy, S. K., Drake, M. T., Nelson, C. D., Houtz, D. A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R. T., Lichtarge, O., & Lefkowitz, R. J. (2006). β -Arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β 2 adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 1261-1273.
- Shichi, H., & Somers, R. L. (1978). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 253(19), 7040-7046.
- Schlessinger, K., Hall, A., & Tolwinski, N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes & Development*, 23(3), 265-277.
- Sibley, D. R., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1985). Homologous desensitization of adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the β -adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 260(7), 3883-3886.
- Sibley, D. R., Peters, J. R., Nambi, P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1984). Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. β -Adrenergic receptor phosphorylation is correlated with

- attenuation of adenylate cyclase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 259(15), 9742-9749.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., & Pei, G. (2002). β -Arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49212-49219.
- Violin, J. D., & Lefkowitz, R. J. (2007). β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 416-422.
- Wang, P., Gao, H., Ni, Y., Wang, B., Wu, Y., Ji, L., Qin, L., Ma, L., & Pei, G. (2003). β -Arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6363-6370.
- Weiss, E. R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M. H., Bertram, P. T., Wong, F., Kraft, T. W., & Osawa, S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Molecular Vision*, 4(27), 865-885.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*, 79(1), 143-180.
- Wilbanks, A. M., Fralish, G. B., Kirby, M. L., Barak, L. S., Li, Y. X., & Caron, M. G. (2004). β -arrestin 2 regulates zebrafish development through the hedgehog signaling pathway. *Science*, 306(5705), 2264-2267.
- Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., & Lefkowitz, R. J. (2004). β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8603-8607.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development*, 7(7a), 1126-1132.
- Yonish-Rouach, E., Resnftzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., & Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352, 345-37.
- Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, D. E., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2005). Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G α_q /G α_i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3045-3056.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y., & Caron, M. G. (1998). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of μ -opioid receptor responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7157-7162.
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9-18.