

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Lilla Biriczová

β -Adrenergé receptory a ich desenzitizácia

β -Adrenergic receptors and their desensitization

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2017

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 15.05.2017

Podpis

PodĎakovanie

Chcela by som sa poďakovať doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho vedenie práce, cenné rady a ochotu pomôcť pri písaní tejto bakalárskej práce.

Abstrakt

β -Adrenergické receptory (β -AR) sú s G-proteínmi asociované receptory (GPCR), široko prítomné v živočíšnom organizme a sprostredkujú katecholamínovú dráhu, ktorá vedie k najrôznejším fyziologickým odpovediam. Do rodiny β -AR patrí β_1 -AR, β_2 -AR a β_3 -AR, ktoré sa líšia podľa afinity k adrenalínu a noradrenalínu. Typický model β -AR signalizácie zahŕňa väzbu ligandu, spriahnutie s G-proteínom, aktiváciu adenylylcyklázy (AC), vedúci k produkcii sekundárneho posla cAMP a následne k aktivácii proteínkinázy A (PKA), ktorá fosforyluje proteíny po smeru regulácie, čím vyvolá fyziologickú odpoveď. Nadmerné vyplavenie katecholamínov môže viesť k nežiadúcim dôsledkom, a preto sa vyvinul mechanizmus, ktorý spôsobí umlčanie β -AR napriek ďalšej stimulácii, desenzitizácia. Klasická desenzitizácia zahŕňa charakteristické kroky ako fosforylácia receptora, pripojenie β -arrestinu a oddelenie G-proteínu od receptora. Obnova signalizačnej schopnosti je možná resenzitizáciou β -AR, kedy dôjde k sekvestrácii a defosforylácii receptora. Vzhľadom k tomu, že podtypy β -AR sú štruktúrne i geneticky odlišné, je nutné brať do úvahy, že aj jednotlivé kroky desenzitizačného procesu sa môžu líšiť medzi jednotlivými podtypmi β -AR.

Kľúčové slová

β -Adrenergný receptor, G-proteín, β -arrestin, adenylylcykláza, desenzitizácia

Abstract

β -Adrenergic receptors (β -ARs) are G-protein-coupled receptors (GPCR), widely present in the animal organism and mediate catecholamine pathways leading to diverse physiological responses. The family of β -ARs consists of β_1 -AR, β_2 -AR and β_3 -AR, which are distinguished by their affinity to adrenaline and noradrenaline. A typical model of β -AR signalling includes binding of the ligand, G-protein coupling, activation of adenylyl cyclase (AC) resulting in production of the second messenger cAMP and activation of protein kinase A (PKA) that phosphorylates downstream proteins leading to physiological responses. Because excessive catecholamine signalling can cause undesirable consequences, a mechanism has evolved, which attenuates the function of β -ARs in spite of further stimulation, so called desensitization. The classic course of desensitization consists of characteristic steps including phosphorylation of the receptor, β -arrestin attachment and uncoupling of the G-protein from β -AR. Restoration of the signalling ability is allowed through resensitization of β -AR when the receptor is sequestered and dephosphorylated. Given that β -ARs are structurally and genetically different, it is reasonable to consider that each step of the desensitization process may happen differently among the different subtypes of β -ARs.

Keywords

β -Adrenergic receptor, G-protein, β -arrestin, adenylyl cyclase, desensitization

Skratky

AC	Adenylyl cyclase	Adenylylcykláza/adenylátcykláza
ADP	Adenosine diphosphate	Adenozíndifosfát
ADRB	Adrenoreceptor β gene	Gén β -adrenergného receptoru
AKAP	A-kinase anchor protein	Kotviaci proteín A kinázy
AP2	Adaptor protein 2	Adaptérový proteín 2
ARF6	ADP-ribosylation factor 6	ADP-ribozilačný faktor 6
ARNO	ARF nucleotide-binding site opener	Nukleotidový výmenný faktor pre ARF
ASK	Apoptosis signal-regulating kinase	Kináza regulujúca apoptózový signál
AT_{1A}R	Angiotensin II receptor, type 1	Receptor angiotenzínu II, typ 1
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozíntrifosfát
BMI	Body mass index	Index telesnej hmotnosti
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenozínmonofosfát
CCV	Clathrin-coated vesicle	Klatrínom obalený váčok
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Cyklický guanozínmonofosfát
CI – CII	Catalytic domain of PKA I – II	Katalytická doména PKA I – II
CNS	Central nervous system	Centrálna nervová sústava
CRE	cAMP response element	cAMP responzívny element
CSF-1	Colony stimulating factor 1	Faktor stimulujúci kolónie 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C chemokínový receptor typu 4
D₁R	Dopamine receptor	Dopamínerný receptor
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
E3 Mdm2	Mouse double minute 2 homolog	E3 Ubikvitínligáza
ECLI – III	Extracellular loop I – III	Extracelulárna sľučka I – III
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor epidermálneho rastového faktoru
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Endotelálna syntáza oxidu dusnatého
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase	Extracelulárne regulovaná kináza
GDP	Guanosine diphosphate	Guanozíndifosfát
G_i	Inhibitory G-protein	Inhibičný G-proteín
GPCRs	G-protein-coupled receptors	G-proteínom spriahnutý proteín
GRK	G-protein receptor kinase	Kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov
G_s	Stimulatory G-protein	Stimulačný G-proteín
GTP	Guanosine triphosphate	Guanozíntrifosfát
H1 – 8	Helix 1 – 8	Helix 1 – 8
HEK293	Human embryonic kidney cells 293	Bunky ľudských embryonálnych obličiek 293
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine	3-izobutyl-1-metylchantin

ICLI – III	Intracellular loop I – III	Intracelulárna sľučka I – III
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Receptor inzulínu podobného rastového faktoru 1
IL6/8	Interleukine 6/8	Interleukín 6/8
ISO	Isoprenaline/isoproterenol	Izoprenalín/izoproterenol
JNK3	c-Jun N-terminal kinase 3	Jun N-terminálna kináza 3
kDa	Kilodalton ($1,66 \times 10^{-24}$ kg)	Kilodalton
MAGI	Membrane-associated guanylate kinase	Membránou asociovaná guanylátkináza
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogénom aktivovaná proteínkináza
MR	Muscarinic receptor	Muskarínový receptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor	Na ⁺ /H ⁺ -výmenný regulačný faktor
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase	Neuronálna syntáza oxidu dusnatého
NO	Nitric oxide	Oxid dusnatý
NOS	Nitric oxide synthase	Syntáza oxidu dusnatého
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	N-etylmaleimid senzitivný faktor
PAR 1/2	Protease-activated receptor 1/2	Proteázou aktivovaný receptor 1/2
PDE4	Phosphodiesterase 4	Fosfodiesteráza 4
PDGF	Platelet derived growth factor	Destičkový rastový faktor
PDZ	Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)	C-koncová väzbová doména
PH	Pleckstrin homology domain	Plekstrin homologická doména
PKA	Protein kinase A	Proteínkináza A
PKC	Protein kinase C	Proteínkináza C
PLC	Phospholipase C	Fosfolipáza C
PP2A/PP2B	Protein phosphatase 2A/2B	Proteínfosfatáza 2A/2B
PS	Phosphatidylserine	Fosfatidylserín
PSD95	Post-synaptic density protein 95	Proteín postsynaptickej denzity 95
R*	Receptor (active)	Receptor v aktívnom stave
RI – RII	Regulatory domain of PKA I – II	Regulačná doména PKA I – II
ROS	Reactive oxygen species	Reaktívne kyslíkové radikály
SAP	Synapse-associated protein	Proteín spojený so synapsiou
SNP	Single nucleotide polymorphism	Jednonukleotidový polymorfizmus

Sos	Son of sevenless	Výmenný faktor guanínových nukleotidov
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (sarcoma)	Nereceptorová tyrozínkináza
TMI – VII	Transmembrane domain I – VII	Transmembránová doména I – VII
TNF	Tumor necrosis factor	Tumorový nekrotický faktor
UCP	Uncoupling protein	Rozpriadhovací proteín
UTR	Untranslated region	Neprekladaná oblasť
α-AR	α -Adrenergic receptor	α -Adrenergický receptor
β-AR	β -Adrenergic receptor	β -Adrenergický receptor
βARB	β -Adrenergic binding	Viažuci sa k β -adrenergnému receptoru
βARK	β -Adrenergic receptor kinase	Kináza β -adrenergného receptoru

Obsah

1 Úvod	1
2 β-Adrenergné receptory	2
2.1 Všeobecná charakteristika β -adrenergých receptorov	2
2.1.1 Štruktúra β -adrenergného receptoru.....	2
2.1.2 Väzba ligandu.....	3
2.1.3 Regulácia transkripcie a translácie β -adrenergného receptoru	4
2.2 Rozdelenie β -adrenergých receptorov	4
2.2.1 β_1 -Adrenergný receptor	5
2.2.2 β_2 -Adrenergný receptor.....	6
2.2.3 β_3 -Adrenergný receptor.....	7
2.3 Agonisti a antagonisti β -adrenergých receptorov	8
3 Mechanizmy desensitizácie	10
3.1 Zložky desensitizácie.....	12
3.1.1 Proteínkináza A	12
3.1.2 Kinázy s G-proteínmi spriahnutých receptorov	12
3.1.3 Proteínkináza C	13
3.1.4 β -Arrestin	14
3.2 Homológna desensitizácia.....	14
3.3 Heterológna desensitizácia	16
4 Endocytická dráha β-adrenergných receptorov	18
4.1 Sekvestrácia	18
4.2 Resensitizácia	20
4.3 Down-regulácia	21
5 Klinický význam desensitizácie	22
5.1 Kardiovaskulárne choroby.....	22
5.1.1 Zlyhanie srdca	22
5.1.2 Idiopatická dilatatívna kardiomyopatia	23
5.2 Respiračné choroby	23
5.2.1 Astma	23
5.3 Metabolické choroby	24
5.3.1 Obezita	24
5.4 Urologické choroby	25
5.4.1 Hyperaktívny močový mechúr	25
6 Záver	26
7 Literatúra	27

1 Úvod

Membránové receptory bunky spojené s proteínmi viažucimi guaninové nukleotidy (GPCRs) predstavujú križovatku biologických dejov, na ktoré sa viažu rôzne ligandy ako neurotransmitery, hormóny a syntetické látky. Od prvej myšlienky o predpoklade existencie receptorov spriahnutých s G-proteínmi na konci 60. rokov a na začiatku 70. rokov 20. storočia, ich štúdia rýchlo pokročila vďaka tomu, že sa vyvinuli rôzne molekulárne a biochemické techniky, ktoré umožnili bližšiu identifikáciu a popis týchto evolučne konzervovaných receptorov. β -AR, ktoré patria do rodiny s G-proteínmi spriahnutých receptorov, špecificky viažu katecholamíny, ako adrenalín a noradrenalín. Na základe ich afinity k adrenalínu a noradrenalínu je možné farmakologicky rozdeliť β -AR na tri podtypy, β_1 -, β_2 - a β_3 -AR. Podľa toho, či sa viaže receptor k stimulačnému G-proteínu (G_s) alebo k inhibičnému G-proteínu (G_i), zvýši sa alebo sa zníži hladina sekundárneho posla cAMP, čo vedie k naštartovaniu rôznych funkčných dráh v bunke. Dlhodobá väzba ligandu avšak nevedie len k vzbudeniu daného signálu, ale aj k umlčaniu vyvolanej odpovedi. Tento mechanizmus sa nazýva desenzitizácia, a predstavuje spôsob signálnej transdukcie, ktorá chráni bunku pred nežiadúcimi a nebezpečnými účinkami nadmernej aktivácie receptora. Desenzitizácia β -AR môže prebiehať dvomi základnými spôsobmi. Počas priebehu krátkodobej desenzitizácie β -AR po fosforylácii s enzýmami proteínkináza A (PKA) a kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov (GRK) sa čiastočne oddelí od G_s -proteínu, a následne sa viaže β -arrestin na receptor. Výsledkom je, že agent, ktorý vyvolal desenzitizáciu, stratí účinok a prestane stimulovať β -AR. Výsledkom dlhodobej desenzitizácie je zníženie počtu receptorov na membráne v dôsledku degradácie mRNA β -AR. Spolu s desenzitizačným procesom sa môže uskutočniť internalizácia a resenzitizácia receptorov, procesy, ktoré zahŕňujú putovanie receptorov endozomálnou dráhou, defosforyláciu a následnú recykláciu späť na membránu. Napriek tomu, že β -AR patria do jednej rodiny a sú štruktúrne homologické proteíny, mechanizmy ich desenzitizácie sa veľmi často líšia. Vzhľadom k tomu, že β -AR sa vyskytujú v rôznych orgánoch – srdce, pľúca, hladká svalovina tráviacej a vylučovacej sústavy, biele a hnedé tukové tkanivo, mozog – rôznych druhov, ich biologický význam je zásadný. Zmenená regulácia β -AR môže vyústiť vo vzniku patologických stavov ako zlyhanie srdca, astma, obezita a mnoho ďalších chorôb, ktoré často majú fatálny dôsledok. Pre vývin efektívnych liečiv a perspektívnych liečebných postupov je nutné porozumieť mechanizmy intracelulárnych signálnych procesov, ktoré prebiehajú v zdravotne postihnutom organizme. Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce je zhrnúť súčasné poznatky o detailne popísaných β -AR a načrtnúť hlavné schéma desenzitizácie, ďalej porovnať mechanizmy desenzitizácie medzi hlavnými podtypmi, nakoniec poukázať na dopad na zdravie dysfunkčných receptorov a zmeny regulácie, ktoré prebiehajú pri vzniku najrôznejších chorôb.

2 β -Adrenergé receptory

β -Adrenergé receptory patria do triedy A, rodopsínu podobných, s G-proteínmi spriahnutých membránových receptorov (GPCR), ktoré sprostredkujú rôznorodé signálne dráhy tým, že viažu ligandy biologické a syntetické. S G-proteínmi spriahnuté receptory sú všadeprítomné, čo sa týka orgánových sústav a druhov, preto predstavujú širokospektrálnu škálu možných farmakologických aplikácií.

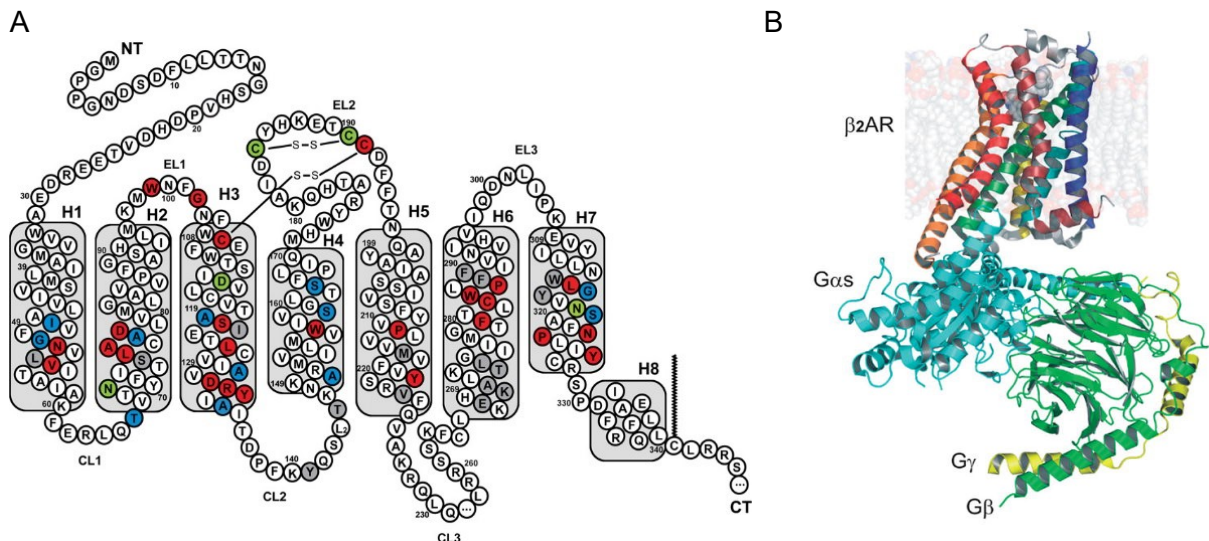
2.1 Všeobecná charakteristika β -adrenergých receptorov

β -adrenergé receptory viažu endogénne katecholamíny ako adrenalín a noradrenalín, čo vedie k asociácii buď so stimulačným G-proteínom (G_s) alebo s inhibičným G-proteínom (G_i) a k modulácii adenylcyklázy (AC), ktorá vytvára sekundárny posol, cyklický adenosínmonofosfát (cAMP). Táto kaskáda môže viesť k aktivácii proteínkinázy A (PKA), ktorá fosforyluje napr. iónový Ca^{2+} -kanál typu L, fosfolamban alebo troponin (Bers, 2002). β -AR môžeme rozdeliť podľa ich afinity k vybraným katecholamínom (noradrenalín, adrenalín) na tri subtypy: β_1 -, β_2 - a β_3 -AR. β_1 -AR má rovnakú afinitu k adrenalínu aj k noradrenalínu, oproti tomu β_2 -AR vykazuje asi tridsaťpäťkrát vyššiu afinitu k adrenalínu než k noradrenalínu. Nakoniec β_3 -AR má mierne vyššiu afinitu k noradrenalínu oproti adrenalínu (Hoffmann *et al.*, 2004). Ďalšie významné rozdiely sa týkajú oblasti génovej výbavy receptorov, čo sa podarilo dokázať pomocou klonovania jednotlivých receptorov. β_1 - a β_2 -AR obsahujú gény bez intrónov, oproti tomu β_3 -AR môže obsahovať 2 až 3 intróny. β -AR dosahujú minimálne 50% homológiu medzi sebou (Kobilka *et al.*, 1987; Frielle *et al.*, 1987; Lelias *et al.*, 1993). Najvýznamnejší rozdiel sa týka štruktúry receptorov v oblasti intracelulárne umiesteného C-konca, ktorý obsahuje aminokyselinové sekvencie dôležité pre fosforyláciu receptorov. Tento úsek je u β_3 -AR kratší, na rozdiel od β_1 - a β_2 -AR, kde je karboxylový koniec v plnej dĺžke. Z tohto dôkazu je možné predpokladať, že desenzitizácia u β_3 -AR neprebíha vo významnej miere (Liggett *et al.*, 1993).

2.1.1 Štruktúra β -adrenergých receptorov

Hydropatické analýzy overili podobnosť β -AR a vizuálnych opsínov. Skladajú sa zo siedmych hydrofóbných transmembránových domén (TMI – TMVII), ktoré sú spojené s tromi extracelulárnymi slučkami (ECLI – ECLIII) a tromi intracelulárnymi slučkami (ICLI – ICLIII), ktoré sú hydrofilné. Transmembránové α -helixy sa skladajú približne z 20-25 aminokyselinových zbytkov; intracelulárne a extracelulárne slučky obsahujú rôzny počet aminokyselín, zhruba 8-91. Amino-koniec receptora je umiestený extracelulárne a karboxy-koniec sa nachádza v cytosole (Obr. 1) (Strader *et al.*, 1989). β -AR sú glykoproteíny, ktoré sú posttranslačne modifikované. Bolo zistené, že posttranslačné modifikácie β -AR sú zásadné nielen pre ich integráciu do plazmatickej membrány, ale aj pre správnu asociá-

ciu trimérneho G-proteínu a receptora. Tieto oblasti zahrňujú C-koncovú oblasť a ICLIII. Zbytok Cys341 na C-konci, ktorý je súčasťou cytosolického α -helixu, je miestom palmitoylácie; je evolučne konzervovaný v rámci rodín GPCR, čo zdôrazňuje jeho význam v kontakte s G-proteínmi (O'Dowd *et al.*, 1988; O'Dowd *et al.*, 1989). Transmembránové helixy sú mimoriadne konzervované v rámci GPCR, obsahujú významné sekvencie ako 'D/ERY' (TMIII), 'CwxP' (TMVI) and 'nPxy' (TMVII) motívy. Najviac divergované sú extra- a intracelulárne slučky (Latek *et al.*, 2012).



Obr. 1 (A) β_2 -Adrenergý receptor v dvojdimenzionalnej forme so zobrazenou aminokyselínovou sekvenciou. Červené krúžky sú konzervované aminokyseliny, ktoré obsahujú tzv. DRY a NxxP motívy. Modré krúžky predstavujú aminokyseliny s mierne polárnou hlavičkou, ktoré sú konzervované v rodine A GPCR. Zelené krúžky označujú charakteristické aminokyseliny v rodine opsínov. Sivé krúžky sú aminokyseliny s 70-90% homológiou v rámci rodiny vizuálnych receptorov.

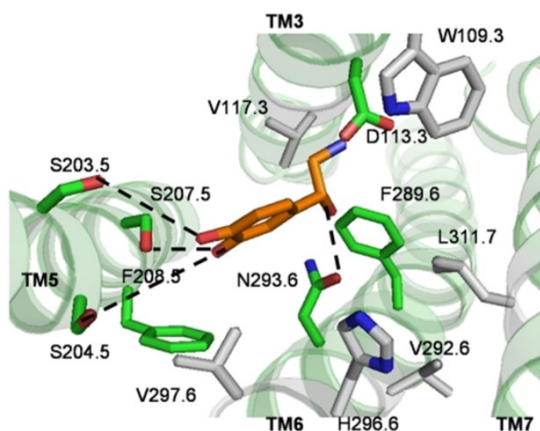
H1 – H7 – transmembránové domény, H8 – cytosolický helix, EL1 – EL3 – extracelulárne slučky, IL1 – IL3 – intracelulárne slučky, NT – N-koniec, CT – C-koniec (Arakawa *et al.*, 2012)

(B) Trojrozmerná kryštalická forma β_2 -adrenergného receptora (β_2 -AR). Nachádza v plazmatickej membráne. Jednotlivé transmembránové domény sú zobrazené rôznymi farbami. β_2 AR je spojený so stimulačným trimérom G-proteínom, na ktorom sú odlišiteľné podjednotky $G_{\alpha s}$, G_{β} a G_{γ} . (Latek *et al.*, 2012)

2.1.2 Väzba ligandu

Mutagenetické štúdie poukázali na skutočnosť, že transmembránové domény TMIV, TMVI a TMVII sú v rámci subtypov zodpovedné za farmakologické rozdiely vo väzbe agonistov a antagonistov (Frielle *et al.*, 1988). Pre väzbu katecholamínov je najdôležitejší zbytok Asp113, ktorý sa nachádza v TMIII a sprostredkuje agonistom vyvolanú odpoveď. Je prísne konzervovaný v rámci s G-proteínmi spriahnutých receptorov, ktoré účinkujú vo väzbe monoamínových ligandov (Strader *et al.*, 1988). Ďalej aminokyselínové zbytky Ser203, Ser204, Ser207 v TMV, Asn293 v TMVI, Asn312 a Tyr316 v TMVII sa tiež podieľajú na interakcii ligandu a väzbového miesta (Obr.2.) (Sato *et al.*, 1999; Warne *et al.*, 2011). V závislosti od toho, či sa viaže do hydrofóbného väzbového vrečka plný agonista alebo čiastočný agonista, zúčastnia sa na tvorbe vodíkových mostíkov rôzne aminokyseliny. Počas väzby

ligandu hrajú zásadnú rolu disulfické mostíky medzi Cys106 a Cys184 v ECLI a ECLII, podobne ako Cys190 a Cys191 v ECLII, ktoré navyše stabilizujú integritu receptora (Dixon *et al.*, 1987; Fraser, 1989).



Obr. 2 Väzbové miesto β_2 -AR s naviazaným noradrenalinom (oranžovo). Aminokyseliny znázornené zelene sa zúčastnia v silnej interakcii, sivo zafarbené aminokyseliny sa nachádzajú 5 Å od noradrenalínu.

TM3 – transmembránová doména 3, TM5 – transmembránová doména 5, TM6 – transmembránová doména 6, TM7 – transmembránová doména 7 (Bhattacharya *et al.*, 2008).

2.1.3 Regulácia transkripcie a translácie β -adrenergických receptorov

Regulácia počtu β -AR prebieha na úrovni mRNA a na úrovni agonistom vyvolanej aktivácie AC. Sekvencia, ktorá sa nachádza v 5' UTR β_2 -AR, GTACGTCA je homologická ku CRE (cAMP response element), TGACGTCA a zistilo sa, že predstaví možnosť regulácie, ktorá je závislá na predošlému zvýšení hladiny cAMP (Collins *et al.*, 1990). Druhý spôsob regulácie sa odohráva počas priebehu agonistom vyvolanej down-regulácie receptora, kedy β ARB (*β -adrenergic receptor binding*) proteín sa viaže na AUUUA pentamerickú sekvenciu v 3' UTR mRNA β -AR, a tým prispeje k jeho destabilizácii a degradácii (Port *et al.*, 1992).

2.2 Rozdelenie β -adrenergických receptorov

Lands a kolegovia v roku 1967 úspešne rozdelili adrenergické receptory na α - a β -adrenergické receptory podľa farmakologických vlastností a podľa orgánov a typu tkanív, kde sa majoritne vyskytujú (Lands *et al.*, 1967). V rámci hlavných kategórií vedci poukázali na existenciu jednotlivých subtypov, u α -adrenergických receptorov na postsynapticky umiesteného α_1 -AR, a presynapticky umiesteného α_2 -AR; u β -adrenergických receptorov β_1 -AR, ktorý sa nachádza dominantne v srdci a β_2 -AR v hladkej svalovine priedušiek a endotelu (Lefkowitz *et al.*, 1983). Fakt, že antagonisti β_1 -AR a β_2 -AR, ako CGP12177, C4P, CGP20712A a ICI118551 sa chovali ako agonisti a atypický agonista BRL37344 mal pomerne vysokú afinitu k určitej populácii β -AR v hnedom tukovom tkanive, viedlo k určaniu nového podtypu, β_3 -AR (Feve *et al.*, 1991). Čiastočný agonista CGP12177 môže vyvolať lipolýzu v tukovom tkanive a pozitívne inotropnú odpoveď v srdci aj nezávisle na β_3 -AR; toto pozorovanie viedlo k predpokladu ďalšieho receptora, „hypotetického β_4 -AR“ (Galitzky *et al.*, 1997). Dôkazy nepodporovali „hypotetického β_4 -AR“ ako sprostredkovateľa fyziologickej odpovedi; za zmienené deje boli zodpovedné β_1 - a β_2 -AR (Sennitt *et al.*, 1998).

2.2.1. β_1 -Adrenergický receptor

β_1 -AR je takmer všadeprítomný v organizme a je spriahnutý s G_s -proteínom (Hekman *et al.*, 1984). Primárne je exprimovaný v komorách a sieňach srdca, kde iniciuje pozitívne inotropný a chronotropný účinok – zvyšuje srdečný tep a kontrakciu; tu sa nachádza v spoločnosti s β_2 -AR (Myslivecek *et al.*, 2006). Nachádza sa hojne v pľúcach, v pečeni a v skeletálnej svalovine (McNeel & Mersmann, 1999). V neposlednom rade, β_1 -AR v bielej a hnedej tukovej tkanive sprostredkuje lipolytický efekt β_3 -AR (Sennitt *et al.*, 1998) a v mozgu prispieva k synaptickej plasticite (Segal *et al.*, 1991). Podľa nedávnych štúdií, β_1 -AR sa podieľa na fungovaní obličiek, kde reguluje transport Ca^{2+} iónov (van der Hagen *et al.*, 2014).

β_1 -AR sa skladá z 477 aminokyselín a gén, ktorý ho kóduje (*ADRB1*) neobsahuje žiadne intróny (Frielle *et al.*, 1987). Nachádza sa na chromozóme 10q24→q26, a vzdialenosť medzi lokusom β_1 -AR a lokusom α_2 -AR je menej ako 225 bp, čo poukazuje na evolučnú blízkosť týchto konzervovaných receptorov (Yang-Feng *et al.*, 1990).

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), ktoré sa vyskytujú v natívnom β_1 -AR môžu zmeniť funkciu pôvodného receptoru. Ich dopad je významný na rôzne kardiovaskulárne choroby, čím môžu spôsobiť zvýšené riziko pre vznik, napr. hypertenzie (Bengtsson *et al.*, 2001). Polymorfizmus na 3' konci *ADRB1* v pozícii 1165 vytvára unikátne miesto pre restričný enzým BstNI, ktorý vymení Arg za Gly v pozícii 389. Vplyv na vzniku kardiomyopatie nemá, avšak môže účinkovať vo vzniku výše uvedeného vysokého krvného tlaku (Tesson *et al.*, 1999; Bengtsson *et al.*, 2001). Mutácia sa nachádza v ICLIV, na mieste palmitoylácie Cys, ktorý je nepostrádateľný pre interakciu s G_s , teda polymorfizmus Arg389Gly je pravdepodobne zodpovedný za zmenenú schopnosť spriahnutia s G-proteínom. (O'Dowd *et al.*, 1989; Mason *et al.*, 1999). Ďalší polymorfizmus, Ser49Gly, sa nachádza na N-konci; glykosylovaný Gly49 vykazuje väčšiu mieru agonistom-indukovanej down-regulácie a degradácie, naviac predlžuje dobu prežitia u pacientov s chronickým zlyhaním srdca (Börjesson *et al.*, 2000; Rathz *et al.*, 2002). Nedávna štúdia dokazuje opačný efekt polymorfnych variant; výskyt oboch menovaných polymorfizmov, Arg389Gly a Ser49Gly, pozitívne koreluje s atriálnou fibriláciou a systolickým zlyhaním srdca, kedy zvyšujú adrenergickú záťaž srdca (Costa *et al.*, 2012).

Kryštalografická štruktúra β_1 -AR s rozlíšením 2,8 Å odhalila, že extracelulárna slučka ECLII, ktorá je nutná pre rýchlu a reverzibilnú väzbu ligandu vytvára β -vlásku; v tejto forme je prítomná aj v rodopsíne. Oproti β_1 -AR, v β_2 -AR sa nachádza α -helix (Warne *et al.*, 2008). Cytoplazmatická slučka ICLII tvorí krátky α -helix blízko u membrány a vstúpi do interakcie s konzervovaným DRY motívom, ktorý je umiestnený v TMIII (Asp138, Arg139, Tyr140) (Warne *et al.*, 2008). Počas aktivácie receptoru sa vytvorí van der Waalova väzba medzi Ser215 a Val172, domény TMIV a TMV sa dostanú do blízkosti. β_1 -AR sa dostane do vysokoafinného stavu, kedy je schopný viazaný agonista aktivovať receptor. Po väzbe agonistu sa vytvorí vodíková väzba medzi Ser211 a Asn310, ktorá spojuje TMV a TMVI a znižuje mieru interakcie medzi TMIV a TMV. (Warne *et al.*, 2011).

Primárne, β_1 -AR, ktorý je spriahnutý s G_{ss} , je zodpovedný za zvýšenie hladiny sekundárneho posla cAMP. Zdá sa, že jednak cAMP difunduje ďaleko od miesta vzniku a je regulovaný pomocou PDE (Nikolaev *et al.*, 2006), jednak signál cAMP vyvolaný aktiváciou β_1 -AR sa môže udržať pomerne dlhú dobu, až 8 hod (Fu *et al.*, 2014). Napriek tomu známemu faktu, že β_1 -AR patrí medzi GPCR, jeho aktivácia môže prebiehať nezávisle na G-proteínoch. Jedna možnosť signálnych dráh je na β -arrestine závislá EGFR transaktivácia, ktorá vyžaduje fosforyláciu β_1 -AR pomocou GRK5/6, a slúži ako protektívna dráha proti nadmerne zvýšenej hladiny katecholamínov, čím môže zlepšiť schopnosť prežitia pri zlyhaní srdca (Noma *et al.*, 2007).

2.2.2 β_2 -adrenergný receptor

β_2 -AR je dominantne exprimovaný v pľúcach a v hladkej svalovine dýchacích ciest – 30 až 40 000 receptorov na bunku, ďalej sa nachádza v epiteliálnych a endoteliálnych bunkách, v bunkách typu II a v mastocytoch (Johnson, 2006). V komorách a sieňach srdca predstavuje len menšinu receptorov, okolo 20 % (Myslivecek *et al.*, 2006), a sú dôkazy, že je exprimovaný už aj v neonatálnych kardiomyocytoch spolu s β_1 -AR (Devic *et al.*, 2001). Vyskytuje sa v hedom tukovom tkanive (Revelli *et al.*, 1991) a v bielom tukovom tkanive, kde spolu s β_1 -AR sprostredkujú lipolytický efekt β_3 -AR (Sennitt *et al.*, 1998). β_2 -AR je ďalej exprimovaný v skeletálnej svalovine a v pečeni (McNeel & Mersmann, 1999), v centrálnej nervovej sústave (CNS) na gliách, predovšetkým na astrocytoch (Mantyh *et al.*, 1995), nakoniec β_2 -AR sa podieľa na regulácii Na^+/H^+ -výmenníku (Hall *et al.*, 1998).

β_2 -AR sa skladá z 413 aminokyselín a gén kódujúci β_2 -AR (*ADRB2*) sa nachádza na chromozóme 5q31→q32, ktorý je len na 300 bp vzdialený od α_1 -AR, čo dokazuje spoločný evolučný pôvod týchto homologických receptorov (Kobilka *et al.*, 1987; Yang-Feng *et al.*, 1990). Napriek tomu, že je v blízkom susedstve génov pre PDGF, CSF-1, sekvenčnú homológiu nevykazujú. Gén neobsahuje žiadne intróny a je ohraničený homológnyimi repetitíciami o 18 bp (Kobilka *et al.*, 1987).

β_2 -AR, podobne ako β_1 AR, sa vyskytuje v prírode v niekoľkých SNP variantoch, napr. Arg16Gly je asociovaný s hyperreaktivitou dýchacích ciest u astmatických pacientov (D'Amato *et al.*, 1998). Ďalší polymorfizmus, Gln27Glu je tiež asociovaný s astmou, ale prítomnosť homozygotného genotypu Glu27Glu má ochranný efekt (de Paiva *et al.*, 2014). Tretí polymorfizmus, Thr164Ile je umiestený v tesnej blízkosti Ser165 na TMIV, ktorý interaguje s OH-skupinami katecholamínov; Thr164Ile môže znižovať schopnosť väzby ligandu a aktivovať AC dráhu (Green *et al.*, 1993).

Po určení trojrozsmernej formy β_2 -AR pomocou kryštalografických štruktúr s rozlíšením 2,4 Å, bola popísaná dráha väzby ligandu (Cherezov *et al.*, 2007). Inaktívnu konformáciu β_2 -AR udržuje krátky helix na ECLII spolu s disulfidovými mostíkmi (Cherezov *et al.*, 2007). Ligand so svojim katecholovým kruhom sa najprv vmedzerí do žliabku medzi TMII, TMIII a TMVII na extracelulárnej strane, následne ECLII umožní ligandu vstúpiť do väzbového miesta (Wang & Duan, 2009). Amíny a hydroxylové skupiny ligandu sú ukotvené pomocou zbytkov Asp113, Tyr316 a Asn312 a aromatické skupiny ligandu sú stabilizované pomocou Val114 a Phe290 (Wacker *et al.*, 2010).

β_2 -AR je spriahnutý s G_s , ktorý aktivuje klasickú AC dráhu a s G_i , ktorý je inhibovateľný pertussis toxínom. Asociácia s dvomi typmi G-proteínmi umožňuje β_2 -AR, aby prepínal medzi stimulujúcou a inhibičnou dráhou. Inhibičná dráha pôsobí antagonisticky na β_1 -AR v srdci. Výsledkom potlačenia AC je zníženie hladiny cAMP, aktivity PKA a následná eliminácia Ca^{2+} odpovedi (Port *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1999), pričom dochádza aj k inhibícii apoptózy kardiomyocytov (Communal *et al.*, 1999). Zdá sa, že β_2 -AR preferenčne asociuje s G_s , ku ktorému má vysokú afinitu. V dôsledku tohto deja dôjde k aktivácii AC, následne k produkcii cAMP a aktivácii PKA, ktorá fosforyluje β_2 -AR, čím umožní jeho spriahnutie s G_i vedúce k naštartovaniu MAP kinázovej dráhy, ktorá zahrňuje tyrozinkinázy Src, Sos a malý G-proteín Ras. (Daaka *et al.*, 1997). Špecifické prepnutie môže zároveň súvisieť s koncentráciou agonistu a s kinázou, ktorá fosforyluje receptor. Pri vysokej koncentrácii agonistu, buď PKA alebo GRK fosforyluje β_2 -AR, a ktorý sa spriahne s G_i . Naopak pri nízkej koncentrácii agonistu, β_2 -AR má vyššiu afinitu k G_s , aj v prípade, keď prítomná PKA fosforyluje daný receptor (Liu *et al.*, 2009). Typ daného ligandu môže mať tiež významný efekt, napr. GRK2 fosforyluje adrenalinom aktivovaný receptor na zbytkoch Ser355 a Ser356, ktorý sa následne spriahne s G_i . Na rozdiel, u noradrenalinom aktivovaného receptoru fosforylácia vedie k asociácii k G_s (Wang *et al.*, 2008). Ďalšiu významnú regulačnú rolu pri spriahnutí s G_s alebo s G_i majú NSF (Wang *et al.*, 2007) alebo PDE4, ktorá reguluje intracelulárnu koncentráciu cAMP (Baillie *et al.*, 2003).

Aktiváciu mitogénnej signálnej kaskády dosiahneme aj mechanizmom, ktorý je v prvom rade zodpovedný za desenzitizáciu pomocou väzby β -arrestinu na β_2 -AR, kde β_2 -AR je fosforylovaný receptorovou kinázou GRK (Luttrell *et al.*, 1999). Táto dráha môže prebiehať aj nezávisle na G-proteínoch; vyžaduje heterodimerizáciu β -arrestinu1 a β -arrestinu2 a fosforyláciu β_2 -AR s GRK5/6 v HEK293 bunkách (Shenoy *et al.*, 2006).

2.2.3 β_3 -adrenergný receptor

β_3 -AR bol prvýkrát objavený v hnedých adipocytoch (Fève *et al.*, 1991), kde reguluje katecholamínom indukovanú expresiu UCP protónového kanálu v mitochondriách (Rohlfis *et al.*, 1995), ktorý rozpriahne oxidačný reťazec od produkcie ATP, a protónový gradient je využitý pre termogenéziu (Ricquier, 2011). V človeku je exprimovaný β_3 -AR ešte v bielom tukovom tkanive, v žľzníku a v menšej miere v hrubom čreve, kde je primárne zodpovedný za reguláciu metabolizmu lipidov (Krief *et al.*, 1993). Stimulácia β_3 -AR v mikrocievach Langerhansových ostrovov pankreasu a v retinálnych arteriolách vedie k vazodilatácii týchto ciev. (Atef *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 2010). Dôkazy existencie týchto receptorov na retinálnych endoteliálnych bunkách objasnili ďalšiu fyziologickú rolu β_3 -AR, ktorá je regulácia angiogenézie (Steinle *et al.*, 2003). β_3 -AR je prítomný aj v ľudskom myometriu (Bardou *et al.*, 2000) a splicingový variant β_{3b} -AR sa nachádza v CNS, predovšetkým v hypothalamu a v kortexe (Evans *et al.*, 1999). V srdci je β_3 -AR tiež exprimovaný, ale je zodpovedný za negatívne inotrópny efekt katecholamínov (Gauthier *et al.*, 1996); ďalej v srdci reguluje aktiváciu Na^+/K^+ -pumpy, čím znižuje oxidačný stres a koncentráciu nadbytočných intracelulárnych Na^+ iónov

(Bundgaard *et al.*, 2010). Podľa iných štúdií, mRNA β_3 -AR sa v srdci nenachádza, a „atypický β -AR“ prítomný v srdci je farmakologicky rozdielny od β_3 -AR. (Malinowska & Schlicker, 1997).

Skladá sa z 388 aminokyselín, a ľudský gén pre β_3 -AR (*ADRB3*) je lokalizovaný na 8p11→8p12, myši na 8A2→8A4. To, že oba gény sú umiestené na rovnakom lokuse, je silný dôkaz pre homológiu myšieho a ľudského génu pre β_3 -AR (Nahmias *et al.*, 1991). Prekvapivo *ADRB3* obsahuje intróny, napr. ľudský *ADRB3* obsahuje 2 až 3 intróny (Lelias *et al.*, 1993). Prítomnosť týchto intrónov viedlo k predpokladu, že po transkripcii mRNA týchto receptorov by mohol prebiehať alternatívny splicing, ktorý produkuje dve varianty s odlišným C-koncom. β_{3a} -AR obsahuje C-koniec s 13 aminokyselinovými zbytkami (RFDGYEGARPFPT), a C-koniec β_{3b} -AR sa skladá z 17 zbytkov (SSLLREPRHLYTCLGYP) (Evans *et al.*, 1999).

Predpokladalo sa, že pacienti s jednonukleotidovým polymorfizmom Trp64Arg v *ADRB3* sú zvyčajne náchylnejší k príbytku váhy a k obezite. Na molekulárnej úrovni by to mohlo znamenať zníženie schopnosť väzby ligandu, ktorá je spojená so znížením bazálneho metabolizmu (Clément *et al.*, 1995). Vrydag a kolegovia však zistili, že polymorfizmy Thr256Met, Leu306Phe, včítane údajný Trp64Arg, nemajú významný vplyv na väzbu ligandu, funkciu alebo signálnu odpoveď (Vrydag *et al.*, 2009).

V tukovom tkanive β_3 -AR je spriahnutý s G_s , ale v prípade kardiomyocytov, β_3 -AR asociuje s G_i (Gauthier *et al.*, 1996). Negatívne inotropný a lusitropný efekt G_i sa sprostredkuje pomocou aktivácie endoteliálnej formy syntázy oxidu dusnatého (eNOS), ktorá zvyšuje koncentráciu NO a vedie k produkcii cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) (Angelone *et al.*, 2008). Neuronálna forma syntázy oxidu dusnatého (nNOS) znižuje chronotrónnu odpoveď, čo dokazuje, že rôzne formy NOS fungujú nezávisle na sebe a sprostredkujú rôzne typy negatívnej spätnej väzby, regulujú nástup rozličných signálnych dráh v srdci (Sterin-Borda *et al.*, 2006). Asociácia receptora závisí aj od splicingových variantách β_3 -AR, napr. β_{3b} -AR je schopný sa spriahnuť rovnako s G_s a G_i , zatiaľ β_{3a} -AR sa spojí iba s G_s (Hutchinson *et al.*, 2002). Konštitutívne spriahnutie β_3 -AR s G_i neslúži len ako mediátor negatívnej odpovedi, ale aj ako aktivátor ERK1/2 MAPK kaskády (Soeder *et al.*, 1999). Počas aktivácie tejto dráhy PKA nie je zahrnutá, pretože β_3 -AR neobsahuje príslušné sekvencie, ktoré sú dôležité pre fosforyláciu (Nahmias *et al.*, 1991). Pri nízkej koncentrácii agonistu preferenčne sa aktivuje AC dráha, a následne po zvýšenej koncentrácii prepne na ERK1/2 MAP kinázovú dráhu (Hutchinson *et al.*, 2002). ERK1/2 MAP kinázová kaskáda vedie k inhibícii apoptózy v srdci, čím predstavuje ochranu pred ischemickým poškodením (Lips *et al.*, 2004).

2.3 Agonisti a antagonisti β -adrenergných receptorov

Selektivita β -AR závisí na interakcii s daným ligandom, ktorý sa veľmi špecificky viaže do väzbového miesta podľa jeho vlastností. Adrenergné ligandy sa skladajú z hľadiska chemickej štruktúry z primárneho alebo sekundárneho amínu, chirálneho β -OH a aromatického kruhu (Swaminath *et al.*, 2005). Podľa toho, či ligand jeho väzbou aktivuje alebo inaktivuje receptor, môžeme kategorizovať ligandy

na agonistov – vyvolávajú fyziologickú odpoveď, antagonistov a inverzných agonistov – znižujú aktivitu a vedú k umlčaniu receptora, na parciálnych agonistov – čiastočne aktivujú receptor, a ich efekt závisí na typu daného tkaniva. (Neubig *et al.*, 2003). Syntetický katecholamín isoprenalín a endogénne katecholamíny noradrenalin a adrenalin sú klasifikované ako plné agonisti β -AR, ktoré sa líšia mierou afinity u jednotlivých podtypov β -AR (Tab. 1) (Hoffmann *et al.*, 2004).

Časom sa zistilo, že pôvodná kategorizácia nie je dostatočná, pretože ligandy sa môžu chovať ako agonisti alebo antagonisty v závislosti od toho, ku ktorému podtypu β -AR sa viažu, napr. CGP20712A, CGP12177 a ICI118551 sú β_1 - a β_2 -antagonisti, pritom vykazujú agonizmus pre β_3 -AR (Feve *et al.*, 1991). Konformácia receptora (Konkar *et al.*, 2000) a koncentrácia daného ligandu (Lanzara, 2005) sú faktory, ktoré môžu ovplyvňovať výslednú odpoveď, napr. propranolol je inverzný agonista pre AC dráhu, ale je agonista pre signalizačnú dráhu, ktorá zahrňuje ERK1/2 u β_1 - a β_2 -AR; isoprenalín sa chová ako agonista u oboch dráhach (Galandrin & Bouvier, 2006).

Snaha súčasných výskumov je vyvinúť agonistov s určitou funkčnou selektivitou (*biased agonists*), ktoré preferenčne aktivujú MAP kinázovú kaskádu závislej na β -arrestine, a pri tom inhibujú AC dráhu, napr. výše uvedený propranolol (Drake *et al.*, 2008).

Tab.1 Súhrn vlastností β -adrenergických receptorov.

Receptor	Druh ligandu		Miesto výskytu a účinok	G-proteín	Signálne dráhy
	Agonista	Antagonista			
β_1	<i>Miera afinity:</i> ISO > noradrenalin = adrenalin <i>Špecifický agonisti:</i> Dobutamin	Atenolol Betaxolol Metoprolol Practolol CGP 20712A	Srdce (kontraktilita) Tukové tkanivo (lipolýza) Mozog (synaptická plasticita)	G _s	AC EGFR
β_2	<i>Miera afinity:</i> ISO > adrenalin >> noradrenalin <i>Špecifický agonisti:</i> Salmeterol Salbutamol Formoterol Terbutalin Fenoterol	ICI118551 Butoxamin	Vaskulárna, uterinná, bronchiálna hladká svalovina (relaxácia) Srdce (kontraktilita) Astrocyty	G _s , G _i	AC ERK-MAP kináza
β_3	<i>Miera afinity:</i> ISO > noradrenalin > adrenalin <i>Špecifický agonisti:</i> CGP12177A ICI201651 Bucindolol Carazolol Alprenolol Pindolol CL316243 BLR37344	Cyanopindolol SR59230A	Biele tukové tkanivo (lipolýza) Hnedé tukové tkanivo (termogenézia) Endoteliálne bunky mikrociev Langerhansových ostrovkov a retiny (dilatacia, angiogenézia, proliferácia)	G _s , G _i	AC NOS-cGMP-PKG

Uvedená je miera afinity ku katecholamínom, vybrané agonisti a antagonisti, orgány dominantného výskytu β -AR a ich fyziologický účinok; typ G-proteínu, ktorým asociuje daný podtyp β -AR a možné signálne dráhy, ktoré sprostredkujú. Prezaté a upravené z (Lefkowitz *et al.*, 1983; Rockman *et al.*, 2002), doplnené z (Atef *et al.*, 1996; Daaka *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 1998; Shenoy *et al.*, 2006; Noma *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2010)

3 Mechanizmy desenzitizácie

Tým, že sa viažu neurotransmitery a hormóny na receptor, vyvolajú biologickú odpoveď, ktorá je zásadná pre prenos signálu a udržanie homeostázy organizmu. Paradoxne, dlhodobá stimulácia bunky vedie k strate jeho schopnosti odpovedať na daný signál; umlčanie receptorov je ochranou pred nadmernou aktiváciou, čo by mohlo viesť k poškodeniu bunky. Tento dej je označený ako desenzitizácia, ktorá predstavuje všeobecne rozšírený mechanizmus v signalizácii β -AR (Lefkowitz *et al.*, 1983). Desenzitizácia je tiež zodpovedná za fenomén, kedy účinnosť podaných liekov klesá časom, ktorý sa nazýva tachyfyllaxia (Davies & Lefkowitz, 1983).

Väzba katecholaminov na β -AR vedie k zmene jeho konformácie; β -AR sa dostane z bazálneho neaktívneho stavu do vysokoafinného aktívneho stavu (De Lean *et al.*, 1980). Asociácia indukovaného receptoru s $G_s\alpha$ -proteínom vyústi v stimulácii AC, ktorá katalyzuje tvorbu cAMP z ATP. Krátko po aktivácii však hladina cAMP sa znižuje, dokonca môže dôjsť k oddeleniu β -AR od AC (Davies & Lefkowitz, 1983) a k „strate“ samotných β -AR (Chuang & Costa, 1979).

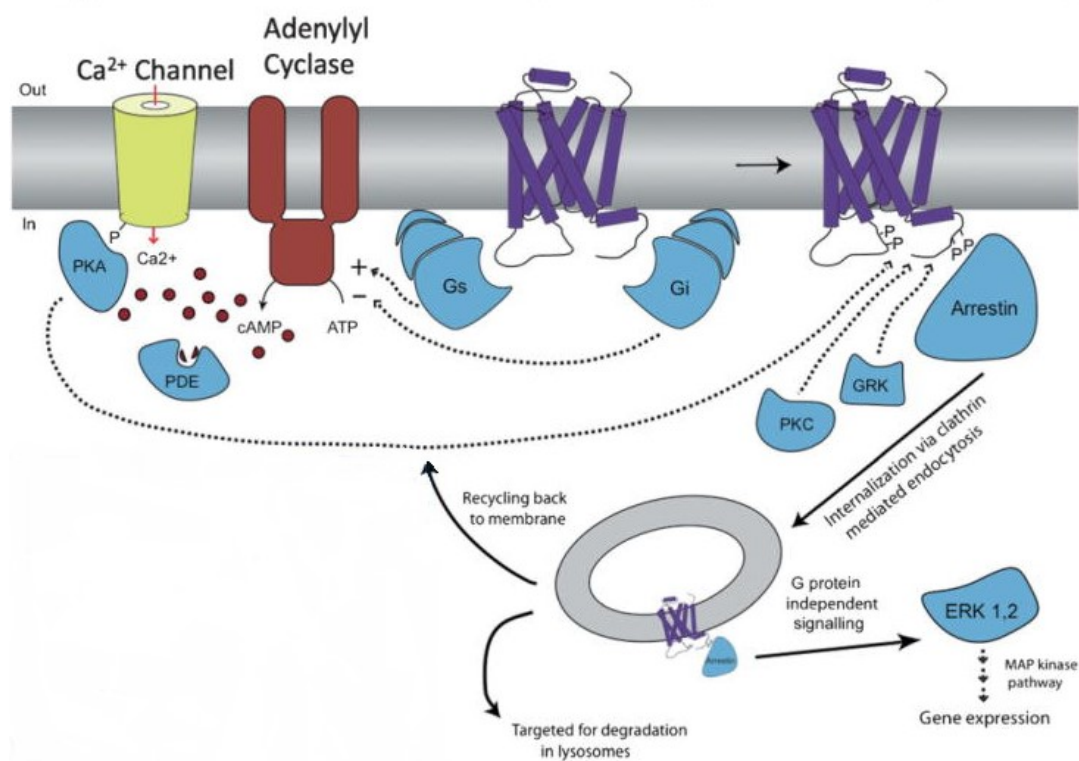
V desenzitizácii hrajú hlavnú rolu kinázy proteínkináza A (PKA) (Benovic *et al.*, 1985) a kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov/kináza β -adrenergického receptoru (GRK/ β -ARK) (Benovic *et al.*, 1986), ktoré stechiometricky fosforylujú receptor. GRK preferenčne fosforyluje β -AR na C-konci na Ser/Thr zbytkoch (Lohse *et al.*, 1989), PKA fosforyluje β -AR na ICLIII Arg-Arg-Ser-Ser sekvenciu (Hausdorff *et al.*, 1989). PKA a GRK môžu v závislosti na koncentrácii agonistu vyvolať odlišné desenzitizačné procesy. GRK, ktorá je na cAMP nezávislá kináza, prispieva k homológnej desenzitizácii (Lohse *et al.*, 1989), zatiaľ PKA, na cAMP závislá kináza, účinkuje počas heterológnej desenzitizácie (Benovic *et al.*, 1985). Homológna desenzitizácia je veľmi špecifická, pretože je umlčaný len signál, ktorý je výsledkom väzby jediného typu hormónu. Heterológna desenzitizácia umlčuje niekoľko signálnych kaskád naraz, ďalej fosforylácia β -AR s PKA vedie k oddeleniu receptoru od G_s a k jeho inaktivácii (Benovic *et al.*, 1985). V priebehu homológnej desenzitizácie prebieha premiestnenie solubilného GRK na membránu rôznymi spôsobmi, v ktorých môže účinkovať PKC, ktorá fosforyluje GRK (Chuang *et al.*, 1995). U iných GRK prebieha autofosforylácia (GRK5) (Loudon & Benovic, 1994), palmitoylácia kinázy (GRK6) (Stoffel *et al.*, 1994), alebo napr. prítomnosť záporne nabitých lipidov zrýchluje translokáciu GRK k plazmatickej membráne (GRK2) (DeBurman *et al.*, 1996).

Po fosforylácii sa priblíži β -arrestin k membráne, a zabráni spojeniu G-proteínu s β -AR, následne zaháji internalizáciu a recykláciu β -AR (Attramadal *et al.*, 1992). Podľa iných štúdií internalizácia nie je nutnou súčasťou resenzitizácie, ako je to pozorovateľné v kardiomyocytoch v prípade β_1 -AR. Kvôli prítomnému PDZ-motívu na C-konci, proces obnovenia β_1 -AR prebieha priamo na plazmatickej membráne (Xiang *et al.*, 2002). β -arrestin sa viaže k fosforylovanému receptoru, na ktorého je viazaný ligand (Krasel *et al.*, 2005). β -Arrestin po defosforylácii Ser412 na jeho C-konci viaže klatrín, ktorý je nezbytný pre endocytózu β -AR (Lin *et al.*, 1997). Kyslé vnútro internalizovaných váčkov je bohaté

na fosfatázy, ktoré defosforylujú β -AR, a recyklujú ich späť na membránu (Krueger *et al.*, 1997); takto sa obnoví umlčaná odpoveď, ktorá je definovaná ako resenzitizácia (Wachsman *et al.*, 1997).

Čo sa týka kinetiky desenzitizácie, môžeme rozpoznať dva typy rýchlostí (Obr. 3). V priebehu prvých 30 min, odpoveď na väzbu agonistu je veľmi rýchla a po odstránení agonistu je desenzitizačný proces dokončený (Johnson *et al.*, 1978). Oproti tomu, stimulácia, ktorá presahuje 30 min, vyústi v down-regulácii a degradácii β -AR na úrovni mRNA, a pre obnovu schopnosti odpovede je nutná kompletná transkripcia a translácia (Collins *et al.*, 1989).

V cicavčích bunkách prebieha homológna a heterológna desenzitizácia nezávisle na seba (Lohse *et al.*, 1990). β -AR je fosforylovaný s kinázami PKA a GRK v závislosti od koncentrácie ligandu, čo demonštruje aj pokus s isoprenalínom (ISO) v myších srdcových bunkách. PKA fosforyluje β_2 -AR jednak pri nízkej, jednak pri vysokej koncentrácii ISO, a vyvolá heterológnu desenzitizáciu; pri vysokej koncentrácii ISO, PKA vyžaduje aj prítomnosť GRK, oproti tomu GRK môže fungovať aj sama (Liu *et al.*, 2009).



Obr. 3 Desenzitizácia β_2 -adrenergického receptoru. Znázornenie internalizácie β_2 -AR do klatrínom obalených váčkov, putovanie β_2 -AR cez endocytickú dráhu, a následná recyklácia receptorov na membránu. Ďalej je zahrnutá downregulácia a degradácia β_2 -AR v lysozómoch, v neposlednom rade ERK1/2 MAP kinázová dráha nezávislá na G-proteínoch. β_2 -AR (fialovo), adenylylcykláza (červene), Ca^{2+} -kanál (žlte), PKA – proteinkináza A, PDE – fosfodiesteráza, G_s – stimulačný G-proteín, G_i – inhibičný G-proteín, PKC – proteinkináza C, GRK – kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov, ERK1/2 – extracelulárne regulovaná kináza (Kobilka, 2013).

3.1 Zložky desenzitizácie

Desenzitizácia je zložitý proces, ktorý je regulovaný na niekoľkých úrovniach; na úrovni väzby agonistu, fosforylácie receptora, na úrovni napojenia β -AR na endocytickú dráhu, ktorá umožňuje obnovenie receptorov, a nakoniec na úrovni prípadnej degradácie β -AR v lysozómoch. Desenzitizačný proces zahŕňa mnoho komponent ako sú s receptormi asociované proteínkinázy (PKA, GRK, PKC) (Benovic *et al.*, 1985, Benovic *et al.*, 1986) a fosfatázy (PP2A) (Shih *et al.*, 1999), ďalej adaptorové proteíny (β -arrestin, gravin, AP-2) (Attramadal *et al.*, 1992; Laporte *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000) a rôzne cytoplazmatické zložky (ARF6) (Clainig *et al.*, 2001).

3.1.1 Proteínkináza A

PKA je Ser/Thr proteínkináza závislá na cAMP produkcii (Walsh *et al.*, 1968). Tento sekundárny posol je výsledným produktom stimulácie β -AR, ktorý sa spojí s G_s , následne umožňuje katalytickú funkciu AC, ktorá vytvára cAMP z ATP (Hathaway *et al.*, 1981).

PKA je tetramer, a skladá sa z dvoch regulačných (RI a RII) a dvoch katalytických domén (CI a CII). Pri zvýšenej hladiny cAMP regulačné domény viažu dve molekuly cAMP, čo vedie k zmene konformácie a k uvoľneniu katalytických domén (Turnham & Scott, 2016). Hladina PKA je regulovaná pomocou proteínových fosfatáz PP2A a PP2B, ktoré degradujú cAMP na ATP; fosfatázy účinne defosforylujú a resenzitizujú desenzitizované β_2 -AR (Shih *et al.*, 1999).

Najdôležitejšia úloha PKA je fosforylácia Arg-Arg-Ser-Ser sekvencií na ICLIII a na C-konci β -AR počas heterológnej desenzitizácie (Benovic *et al.*, 1985). Pre účinnú fosforyláciu je nutné priblíženie PKA k β -AR, v čom poskytuje pomoc kotviaci proteín, AKAP79/150 (gravin) (Fraser *et al.*, 2000); RII doména PKA viaže AKAP79/150, a umožňuje interakciu s β_2 -AR (Tao *et al.*, 2003).

3.1.2 Kinázy s G-proteínmi spriahnutých receptorov

GRK (β -ARK) sú Ser/Thr kinázy, ktoré sú nezávislé na predošlej tvorbe cAMP (Benovic *et al.*, 1986). Molekulárna hmotnosť purifikovaných GRK je 80 kDa, a pre ich funkčnosť sú potrebné Mg^{2+} ióny a ATP (Benovic *et al.*, 1987). Obsahujú tri domény, N-koncovú zo 192 aminokyselinových zbytkov, C-koncovú doménu zo 145 zbytkov, a katalytickú doménu z 239 zbytkov (Benovic & Gomez, 1993).

GRK sprostredkujú homológnu desenzitizáciu; miera tejto homológnej desenzitizácie sa môže líšiť v závislosti od typu tkaniva, pretože miera expície rôznych typoch GRK v jednotlivých bunkách a tkanivách je rôznorodá (McGraw & Liggett, 1997). Konformačná zmena receptora odhalí fosforylačné miesta umiestené na C-konci β -AR. Kým substrátom GRK2 sú aminokyselinové zbytky Thr384, Ser396, Ser401 a Ser407, GRK5 fosforyluje Thr384, Thr393, Ser396, Ser401, Ser407 a Ser411 (Fredericks *et al.*, 1996). Fosforylovaná C-koncová doména β -AR predstavuje signál, ktorý navodí β -arrestin k β -AR, a zaistiť jeho postup do ďalšej fázy, ktorá je sekvestrácia (Krasel *et al.*, 2005).

Kinázy s G-proteínmi spriahnutých receptorov môžeme rozdeliť na rôzne izoformy od GRK1 až po GRK6, ktoré sa líšia spôsobom aktivácie a translokácie k plazmatickej membráne, pretože sú bohato posttranslačne modifikované (Tab. 2). Farnesylovanie GRK1 umožňuje rýchle priblíženie kinázy k plazmatickej membráne, zatiaľ GRK2 preferuje prítomnosť nabitých fosfolipidov ako sú fosfoinositidy (Onorato *et al.*, 1995). Fosforylovanie GRK2 s PKC urýchľuje homolognú desenzitizáciu (Chuang *et al.*, 1995), oproti tomu fosforylovanie s ERK1 blokuje GRK aktivitu (Pitcher *et al.*, 1999). GRK2 a GRK3 ďalej obsahujú PH doménu na C-konci, ktorá je dôležitá pre interakciu s G $\beta\gamma$ podjednotkou G-proteínu (DeBurman *et al.*, 1996). GRK5 obsahuje aminokyseliny schopné autofosforylácie, Ser484 a Thr485 (Loudon & Benovic, 1994) a ďalšie sekvencie pre fosforylovanie s PKC, ktorá významne znižuje aktivitu GRK5 (Pronin & Benovic, 1997). Do rodiny GRK patria aj GRK4 a GRK6, ktoré obsahujú palmitoylované Cys561, Cys562 a Cys565 (Stoffel *et al.*, 1994). GRK hrajú významnú rolu v desenzitizácii nielen β -AR, ale aj mnoho iných GPCR (Tab. 2) (Kohout *et al.*, 2003).

Tab. 2 Súhrn kináz s G-proteínmi spriahnutých receptorov (GRK)

Izoformy	Spôsob aktivácie	Cieľový receptor	Miesto výskytu
GRK1	Farnesylovanie	rodopsin	Fotoreceptorové bunky, pinealocyty
GRK2	Fosforylovanie Defosforylovanie Nabité fosfolipidy	β_1/β_2 -AR	Srdce, cievna sústava
GRK3	Záporne nabité lipidy	α_{1B} -AR β_1/β_2 -AR AT _{1A} R Thrombin	Čuchové bunky
GRK4	Palmitoylovanie	D ₁ R	Semenníky, mozog
GRK5	Autofosforylovanie	β_1/β_2 -AR AT _{1A} R	Srdce, pľúca, retina
GRK6	Palmitoylovanie	CXCR4	Lymfocyty, chemotaxia

Prevzaté z (Kohout *et al.*, 2003), doplnené z (Loudon & Benovic, 1994; Stoffel *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 1995; Onorato *et al.*, 1995; DeBurman *et al.*, 1996)

3.1.3 Proteínkináza C

Proteínkináza C je Ser/Thr kináza závislá na prítomnosti Ca²⁺ iónov (Inoue *et al.*, 1977); dráhy vedúce k jej aktivácii sú rôznorodé, ktoré môžu zahŕňať diacylglycerol (DAG) a fosfatidylserin (PS) (Mellor & Parker, 1998). PKC stechiometricky fosforyluje GRK *in vitro* na C-konci, a ovplyvňuje katalytickú aktivitu príslušných kináz. V prípade GRK5 dochádza k zníženiu aktivity (Pronin & Benovic, 1997). Odlišný výsledok môžeme pozorovať u β -ARK1 (GRK2), kedy fosforylovanie na zbytkoch Ser572, Ser566 a Ser568 s PKC vedie k rýchlejšej homolognej desenzitizácii (Chuang *et al.*, 1995).

Bazálne hladiny fosforylácie β -AR môže udržiavať aj PKC; spôsobí oddelenie β -AR od G_s a takto prispievajú k heterológnej desenzitizácii (Bouvier *et al.*, 1991).

3.1.4 β -Arrestin

β -Arrestin je proteín, ktorý znemožňuje β -AR, aby sa spojil s G_s , sprostredkuje internalizáciu, ďalej funguje ako adaptérový proteín, ktorý organizuje multimérne komplexy pre signálnu transdukciiu (Benovic *et al.*, 1987). Arrestinová rodina má niekoľko členov ako β -arrestin1 a β -arrestin2, ktoré sú na 78 % homologické, ďalej vizuálny arrestin a X arrestin. β -Arrestin1 a vizuálny arrestin sa nachádzajú v jadre a cytoplazme, viažu sa k GPCR triede B s väčšou mierou než k triede A. β -Arrestin2 sa nachádza len v cytoplazme a má väčšiu afinitu k GPCR triede A než k triede B (Oakley *et al.*, 2000).

β -Arrestin sa skladá z C-koncovej oblasti, ktorá slúži ako regulátor väzby fosforylovaného β -AR, a N-koniec, ktorý slúži pre kontakt s receptorom. Domény uprostred sú dôležité pre mimoriadnu špecifitu interakcie β -arrestinu a β -AR (Gurevich *et al.*, 1995). N- a C-terminálne domény sú zložené zo sedemvláknových β -sendvičov, ktoré sa skladajú z troch- a štvorvláknových β -barelov, a sú spojené pomocou β -listu. K N-konci je privityvaný α -helix a k C-konci dva 3_{10} -helixy (Hirsch *et al.*, 1999).

β -Arrestin sa viaže k ligandom aktivovanému β -AR, ktorý bol fosforylovaný pomocou GRK (Krasel *et al.*, 2005). V bunke existuje zásoba arrestinov, ktoré sú udržiavané v neaktívnej forme ako dimery. Počas rýchlej desenzitizácie aktivovaný β -arrestin1 je defosforylovaný na C-konci na Ser412, čo ho jednak uvedie do aktívnej monomernej formy (Hirsch *et al.*, 1999), jednak umožňuje internalizáciu β_2 -AR, pretože že sa na C-koniec môže viazať klatrín (Lin *et al.*, 1997). Na klatríne sa nachádzajú aminokyseliny ako Lys96, Lys98 a Glu89, ktoré prispievajú k tejto veľmi špecifickej interakcii (Goodman *et al.*, 1997). V neposlednom rade majú významnú regulačnú rolu fosfoinositidy na membráne, ktoré umožňujú väzbu β -arrestinu k β -AR (Gaidarov *et al.*, 1999), a ATPáza NSF, ktorá účinkuje v zmene konformácie β -arrestinu1 (McDonald *et al.*, 1999).

Kritickú úlohu všadeprítomného β -arrestinu v biologických procesoch zdôrazňuje aj to, že sa zúčastní v desenzitizácii aj mnoho iných s GPCR ako napr. CXCR4 (Sun *et al.*, 2002), IGF1-R (Povsic *et al.*, 2003), $AT_{1A}R$ (Hunton *et al.*, 2005) a PAR1 (Kuo *et al.*, 2006), PAR2 (DeFea *et al.*, 2000), ďalej ako adaptérový proteín sprostredkuje JNK3 (Miller *et al.*, 2001), ERK1/2 MAPK (Luttrell *et al.*, 1999) a ASK1/p38 MAPK signálne dráhy (Miller *et al.*, 2001), nakoniec môže účinkovať aj na G-proteíne nezávislej dráhe β_2 -AR ERK (Shenoy *et al.*, 2006).

3.2 Homológna desenzitizácia

Väzba agonistu spôsobí zmenu konformácie β -AR, sprístupní C-koncový úsek bohatý na Ser/Thr zbytky pre GRK, a ten stechiometricky fosforyluje β -AR; táto modifikácia zníži afinitu β -AR k G_s , a spôsobí ich oddelenie, ktoré vedie k umlčaniu aktivity AC. Agonistom aktivovaný a fosforylovaný β -AR priláka β -arrestin, ktorý ďalej podporuje desenzitizačný proces a prispieva k sekvestrácii a k resenzitizácii.

Výše uvedený všeobecný proces krátkodobej desenzitizácie je najlepšie popísaný na modeli β_2 -AR (Lohse *et al.*, 1989), ktorý je veľmi podobný k desenzitizácii β_1 -AR (Freedman *et al.*, 1995); oproti

tomu u β_3 -AR obvykle neprebíha krátkodobá desenzitizácia. Dôvod neprítomnej desenzitizácie leží v primárnej sekvencii β_3 -AR, ktorá neobsahuje príslušné aminokyselinové zbytky pre fosforyláciu s kinázami, pretože má kratší C-koniec (Nantel *et al.*, 1993). Zaujímavý fakt je, že v sekvencii splicingovej varianty β_{3b} -AR nájdeme Ser vhodné pre fosforyláciu (Evans *et al.*, 1999), ale sa pravdepodobne nachádzajú v aminokyselinovom okolí, ktoré GRK nepreferuje (Chen *et al.*, 1993). Nedávne výsledky avšak predstavili β_3 -AR v novom svetle; dlhodobá stimulácia receptora s β_3 -AR agonistami viedla k zníženiu miery signalizácie závislej na cAMP. V pozadí tohto pozorovania stojí pravdepodobne znížená aktivita AC a čiastočne aj znížená expresia G_s (Michel-Reher & Michel, 2013).

Iniciácia desenzitizácie u β_1 -AR a β_2 -AR je skoro zhodná, pretože receptory vykazujú viac než 50% homológiu (Frielle *et al.*, 1987). Odlišnosti môžeme pozorovať v počtoch Ser a Thr zbytkoch na C-konci: β_2 -AR obsahuje 11, zatiaľ β_1 -AR obsahuje len 10 (Freedman *et al.*, 1995). Mieru fosforylácie ovplyvňuje nielen štruktúra β -AR, ale aj farmakologické vlastnosti ligandu (Sibley *et al.*, 1984). Väzba silného agonistu ako napr. adrenalín vedie k rýchlej a výraznej desenzitizácii. Hlavný dôvod tkvie v tom, že silné agonisti stabilizujú aktivovaný stav receptorov (R^*) (January *et al.*, 1997). Translokácia GRK k plazmatickej membráne a rýchle rozpoznanie β_1 - a β_2 -AR umožňujú jednak posttranslačné modifikácie GRK (Stoffel *et al.*, 1994) a záporne nabité fosfolipidy v membráne (Onorato *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1996). β_2 -AR vstupuje do vzájomného styku aminokyselinami umiestnenými na N-konci GRK ako Leu4, Val7, Leu8, Val11 a Ser12 (Beautrait *et al.*, 2014), a GRK fosforyluje aminokyselinové zbytky Ser355 a Ser356 a Ser364 na β_2 -AR na karboxylovom konci (Seibold *et al.*, 2000). Desenzitizačný proces sa môže líšiť aj podľa typu tkaniva, kde sú v rôznej miere exprimované rôzne GRK (McGraw & Liggett, 1997). Krátkodobá opakovaná stimulácia β_2 -AR zosilňuje katalytickú aktivitu GRK, ktorá je zásadná pre prilákanie β -arrestinu k plazmatickej membráne (Krasel *et al.*, 2005).

β -arrestin ako „inhibičný proteín“ ďalej podporuje oddelenie β_2 -AR od G-proteínu, čím mu umožňuje postup do ďalšej fázy desenzitizačného procesu. GPCR triedy A, kam patria aj β -AR, vykazujú vyššiu afinitu k β -arrestinu2 než k β -arrestinu1 (Oakley *et al.*, 2000). β -Arrestin rozpoznáva fosforylované Ser355, Ser356 a Ser364 na C-konci β_2 -AR, a so svojím N-koncom sa viaže k tejto oblasti (Vaughan *et al.*, 2006). Hydrofóbne zbytky ako Leu373, Ile374 a Phe376, ďalej nabité aminokyseliny ako Glu375 a Glu377 na C-konci β -arrestinu sú nutné pre väzbu klatrínu, ktorý umožní sekvestráciu β_2 -AR (Krupnick *et al.*, 1997), a prispieva k hydrofóbnej interakcii s aminokyselinovými zbytkami Lys96, Lys98 a Glu89 (Goodman *et al.*, 1997).

3.3 Heterológna desenzitizácia

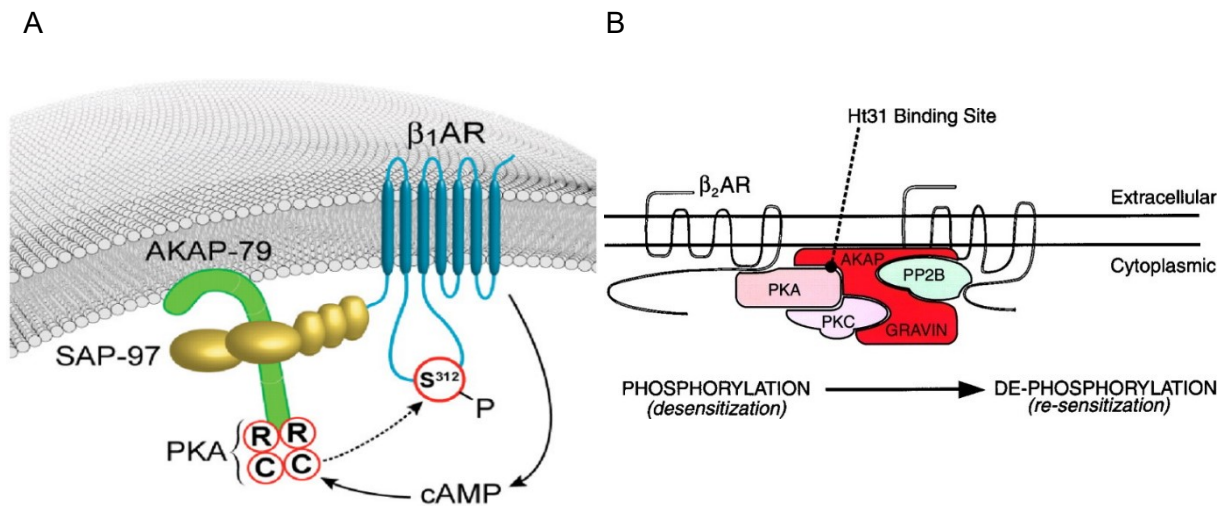
Pokusy prevedené prevažne na cicavčích bunkách poukázali na to, že počas heterológnej desenzitizácie nemusí prebiehať internalizácia alebo down-regulácia receptorov, ale resenzitizácia receptorov môže prebiehať na membráne (Tran *et al.*, 2007); heterológna desenzitizácia má významný vplyv na spriahnutie β -AR s G-proteínom tak vo vtačích erythrocytoch (Nambi *et al.*, 1985) ako v cicavčích bunkových systémoch (Kassis *et al.*, 1986). Celkový proces desenzitizácie β_2 -AR vyžaduje fosforyláciu nielen PKA oblastí, ale aj GRK miest a následnú väzbu β -arrestin, kvôli prebehnutiu účinnej resenzitizácie; bez fosforylácie β_2 -AR desenzitizované receptory by zostali umlčané (Zhang *et al.*, 1997). Internalizácia sprostredkovaná heterológnou desenzitizáciou je prítomná aj u β_1 -AR. Na rozdiel od internalizácie sprostredkovanej homológnou desenzitizáciou, PKA fosforylované β_1 -AR sú sekvestrované do kaveol, zatiaľ GRK fosforylované β_1 -AR postupujú endocytickou dráhou v klatrínom obalených váčkoch (Rapacciuolo *et al.*, 2003), napriek tomu zisteniu, že PDZ-doména pripojená k β_1 -AR inhibuje jeho schopnosť sekvestrácie (Hu *et al.*, 2000).

Heterológna desenzitizácia podporuje umlčanie viacerých signálov, pretože každý agonista, ktorý je schopný zvyšovať hladinu cAMP, pôsobí ako desenzitizačný agent. Túto hypotézu potvrdzuje aj pokus, kedy ošetrovanie β_2 -AR s čiastočnými agonistami ako salbutamol alebo salmeterol viedlo k heterológnej desenzitizácii, pretože aj nepatrné zvýšenie hladiny cAMP bolo dostatočné pre aktiváciu PKA (January *et al.*, 1998). β_1 - a β_2 -AR sú objektom PKA fosforylácie (Freedman *et al.*, 1995), a pri nízkej koncentrácii, asi stokrát nižšia koncentrácia než pri homológnej desenzitizácii, agonistu β_2 -AR a β_1 -AR preferenčne aktivujú PKA dráhu (Liu *et al.*, 2009). U β_3 -AR nie je pravdepodobné, že by prebiehala heterológna desenzitizácia, pretože neobsahuje príslušné aminokyselinové sekvencie potrebné pre fosforyláciu s PKA na tretej cytoplazmatickej slučke, navyše C-koniec je kratší s porovnaním β_1 - alebo β_2 -AR (Nantel *et al.*, 1993); napriek tomu desenzitizácia β_3 -AR prebieha v určitých bunkových kultúrach ako sú HEK293 bunky, a je spojená s oddelením AC od β_3 -AR, v menšej miere s nižšou expresnou hladinou G_s , avšak down-regulácia nemusí byť súčasťou tohto deja (Michel-Reher & Michel, 2013).

Väzba agonistu umožňuje konformačnú zmenu β -AR, ktorá je výhodná pre interakciu s rôznymi kinázami. PKA, ktorá je závislá na predošlej produkcii cAMP, stechiometricky fosforyluje β_1 - a β_2 -AR na Ser zbytkoch v sekvencii Arg-Arg-Ser-Ser na ICLIII a na C-konci (Benovic *et al.*, 1985), podobne PKC je zahrnutá v desenzitizačnom procese (Bouvier *et al.*, 1991). Fosforylácia zmení náboj a štruktúru β -AR v tejto oblasti, čím oddelí G_s od receptoru. Fosforylácia β_2 -AR s PKA nevedie len k oddeleniu receptoru od G_s , ale zvýši jeho afinitu k G_i (Zamah *et al.*, 2002).

Kotviaci proteín A kinázy, gravin (AKAP 150/79) asociuje s β_1 - a β_2 -AR a slúži ako mediátor, ktorý umožňuje príslušným enzýmom PKA, PKC a PP2B, ale aj GRK a β -arrestinu počas homológnej desenzitizácie, sa priblížiť k cieľovému proteínu (Obr. 4) (Shih *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2000). Silný dôkaz nenahraditeľnosti gravinu je to, že pri absencii alebo nefunkčnosti gravinu nemôže prebiehať

recyklácia β_1 - a β_2 -AR (Lin *et al.*, 2000). PKA fosforyluje AKAP doménu v gravine, ktorý je viazaný na RII doménu PKA (Tao *et al.*, 2003); táto AKAP doména umožní mimoriadne špecifickú interakciu medzi AKAP150/79 a β -AR. β_2 -AR poskytuje pri interakcii s gravinom 83 aminokyselín a gravin 250 aminokyselín, ktoré sú konzervované v rámci kotviacich proteínov (Tao *et al.*, 2003). V prípade β_1 -AR, membránou asociovaná guanylátkináza SAP97 zorganizuje AKAP250/79-PKA komplex, ktorý sa viaže k β_1 -AR cez PDZ motív (Gardner *et al.*, 2007).



Obr. 4 (A) Molekulárny komplex AKAP79, SAP97 a PKA, ktorý sa pripojí k β_1 -AR cez PDZ motív. Je znázornená aktivácia PKA pomocou produkcie cAMP, fosforylácia Ser312 na ICLIII.

R – regulačná doména PKA, C – katalytická doména PKA (Gardner *et al.*, 2007).

(B) Asociácia proteínového komplexu β_2 -AR a AKAP150/79 (gravin).

AKAP – kotviaci proteín A kinázy, PP2B – proteínfosfatáza 2B, PKA – proteínkináza A, PKC – proteínkináza C (Shih *et al.*, 1999)

4 Endocytická dráha β -adrenergických receptorov

Stimulácia β -AR, ktorá trvá až niekoľko hodín môže viesť nielen k oddeleniu od G_s a k utíšeniu AC aktívacie, ale vo veľkej miere aj k zníženiu počtu receptorov na plazmatickej membráne v dôsledku internalizácie receptorov do transportných váčok (Stadel *et al.*, 1983), ktoré potom môžu byť recyklované späť na plazmatickú membránu (resenzitizácia) alebo úplne degradované v lyzosómoch (down-regulácia) (Kallal *et al.*, 1998). Resenzitizácia je funkčne oddelený proces od desenzitizácie, a môže prebiehať počas stimulácie alebo počas pokojového stavu (Wachsman *et al.*, 1997). Pre účinnú resenzitizáciu je povinným krokom GRK fosforylácia β -AR a väzba β -arrestinu; dokonca aj pre obnovu desenzitizovaných receptorov, ktoré boli fosforylované s PKA je táto časť rozhodujúca (Zhang *et al.*, 1997). Ďalšia možnosť zníženia počtu receptorov na membráne je regulácia na úrovni mRNA. Receptorová mRNA je destabilizovaná, pretože PKA fosforyluje a tak inhibuje transkripčný faktor pre syntézu nového receptoru. Zvýšená hladina cAMP avšak nemusí nutne viesť k down-regulácii β -AR. Obnovenie funkcie β -AR po down-regulácii môže trvať až niekoľko dní a pravidelne musí dôjsť k úplnej transkripcii a translácii (Bouvier *et al.*, 1989).

4.1 Sekvestrácia

Pod pojmom sekvestrácia sa rozumie selektívne oddelenie β -AR od príslušného G-proteínu a ich nasledovný presun z plazmatickej membrány do cytoplazmy; tieto internalizovné receptory už nie sú dosiahnuteľné pre hydrofilné ligandy (Yu *et al.*, 1993). Pre správny priebeh sekvestrácie je fosforylácia β_2 -AR s GRK Ser355, Ser356 a Ser364 (Vaughan *et al.*, 2006) a následná väzba β -arrestinu na C-koniec β_2 -AR pri fyziologických podmienkach je kľúčová (Oakley *et al.*, 1999); receptory, ktoré sa nachádzajú v intracelulárnych váčkoch už musia byť oddelené od G-proteínu a od AC (Hausdorff *et al.*, 1989).

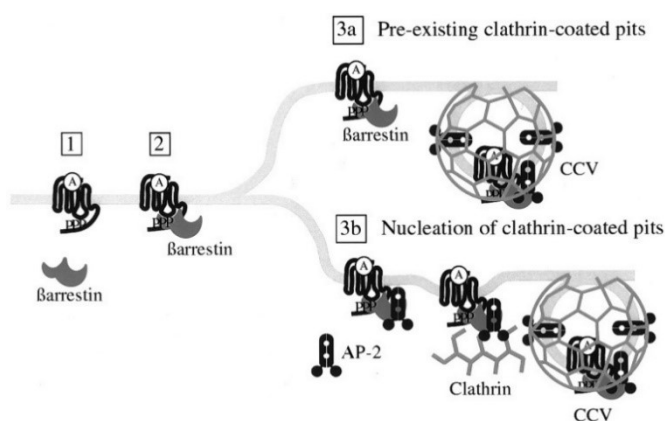
Agonistom aktivovaný β_2 -AR postupuje do cytosolu v prítomnosti malej GTPázy Rab5 (Seachrist *et al.*, 2000) a dynaminu, ktoré odškrtajú klatrínom obalené váčky od plazmatickej membrány (Zhang *et al.*, 1996). Účinkovanie mikrotubulov a membránových fosfolipidov ako je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát umožňuje aktivitu dynaminu; dynamin sa pripojí k $G\beta\gamma$ -proteínu, a za spotrebu GTP oddelí váčky od membrány (Lin & Gilman, 1996). Bez receptorovej tyrozínkinázy c-SRC, ktorá je pripojená na Pro-bohatý úsek N-konca β -arrestinu (Miller *et al.*, 2000) a fosforyluje dynamin na Tyr231 a Tyr597, endocytóza β_2 -AR by nemohla prebiehať. Toto pozorovanie poukazuje na duálnu rolu c-SRC počas sekvestrácie β -AR a v regulácii MAP kinázovej dráhy (Ahn *et al.*, 1999).

Pre sekvestráciu β_2 -AR je významný signál Tyr326, ktorý je súčasťou konzervovaného motívu NPXXY na C-konci v tesnej blízkosti TMVII (Barak *et al.*, 1994). V prípade β_3 -AR, ktorý obsahuje Tyr v jeho primárnej sekvencii, k sekvestracii nedochádza, len v prípade chimerického receptoru

β_3 -/ β_2 -AR, čo naznačuje, že ďalšie sekvencie sú potrebné pre účinnú sekvestráciu (Liggett *et al.*, 1993). Iné dôkazy svedčia o tom, že v komplexe heterodimeru β_3 -/ β_2 -AR prevažovali potlačujúce vlastnosti β_3 -AR, totiž väzba β -arrestinu a internalizácia bola úplne znemožnená (Breit *et al.*, 2004).

GRK2, ktorá fosforyluje β_2 -AR počas desenzitizácie, prenasleduje β_2 -AR v klatrínovom váčku (Ruiz-Gómez & Mayor, 1997). Na rozdiel od GRK2, β -arrestin sa nesekvestruje; po príprave β_2 -AR na intracelulárnu dráhu sa β -arrestin oddelí od proteínového komplexu, aby sa fosfatázy mohli voľne priblížiť k fosforylovaným Ser a Thr (Zhang *et al.*, 1999); defosforylácia nemusí prebiehať výhradne v endozómoch, ale môže sa uskutočniť aj na plazmatickej membráne (Iyer *et al.*, 2006). Prítomnosť gravinu (AKAP250/79) je zásadný pre organizáciu rôznych fosfatáz (PP2B), kináz (PKA, PKC a GRK2), β -arrestinu a klatrínu, pretože vytvorí multiproteínové signálne komplexy potrebné pre recykláciu β_2 -AR a β_1 -AR; bez prítomnosti gravinu desenzitizované β -AR sa nemôžu recyklovať (Lin *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 2007).

Rôzne scaffoldové proteíny môžu ovplyvňovať internalizačné schopnosti β -AR a regulovať osud iných signálnych komponent, kde sekvestrácia β -AR nie je súčasťou fyziologického procesu. PSD95 sa viaže na PDZ-motív β_1 -AR, čím inhibuje jeho internalizáciu a tak β_1 -AR zostáva na plazmatickej membráne (Hu *et al.*, 2000); oproti tomu asociácia β_1 -AR s membránou asociovanou guanylátkinázou (MAGI) stimuluje jeho internalizáciu. Špecifická väzba PDZ-motívu alebo MAGI umožňuje synaptickú reguláciu β_1 -AR, čím prispievajú k synaptickej plasticite neurónov (Xu *et al.*, 2001) a k regulácii v zdravých kardiomyocytoch (Xiang *et al.*, 2002). V heterooligomernom komplexe β_1 -AR a β_2 -AR v kardiomyocytoch môžeme pozorovať utlmenie funkcie a internalizácie β_2 -AR, ktoré je možné pripísať na účet dominantného β_1 -AR; heterodimer sa môže chovať ako samostatný receptor so špecifickými vlastnosťami (Lavoie *et al.*, 2002). Rapacciuolo a jeho kolegovia navrhli hypotézu, ktorá tvrdí, že pri nízkej koncentrácii agonistu, β_1 -AR sa sekvestruje do klatrínových váčkov, ale pri vyššej koncentrácii môže prebiehať aj kaveolárna dráha. Z toho vyplýva, že koncentrácia agonistu môže určiť aj spôsob sekvestrácie. (Rapacciuolo *et al.*, 2003).



Obr. 5. Sekvestrácia β_2 -AR do klatrínového váčku

Na agonistom aktivovaný β_2 -AR je fosforylovaný pomocou GRK (1) sa viaže β -arrestin (2), ktorý podľa pôvodnej predstavy sprostredkuje internalizáciu β_2 -AR do hotového klatrínového váčku (3a). V súčasnosti platí predstava (3b), keď β -arrestin neinteraguje priamo s klatrínom, ale pomocou AP2 adaptérového proteínu. A – agonistom aktivovaný receptor, CCV – klatrínom obalený váčok, AP-2 – adaptorový proteín 2 (Laporte *et al.*, 2000).

β -Arrestin, ktorý je pripojený na plazmatickú membránu pomocou fosfoinositidov (Gaidarov *et al.*, 1999), sa neviaže priamo ku klatrínu; aminokyselinové zbytky Arg394 a Arg396, ktoré sa nachádzajú na C-konci β -arrestinu2, interagujú s adaptorovým proteínom AP-2, ktorý postaví klatrínové

triskeliony do hotového klatrínového váčku (Laporte *et al.*, 2000). Práve preto je nevyhnutné, aby β -arrestin2 zmenil konformáciu pomocou defosforylácie Ser412, ktorý na nachádza na jeho C-konci (Lin *et al.*, 1997), čo je pravdepodobne dôvodom aj toho, že po väzbe β -arrestinu2 sa asi stokrát účinnejšie sekvestruje β_2 -AR ako po väzbe β -arrestinu1 (Kohout *et al.*, 2001). V neposlednom rade β -arrestin ako adaptérový proteín viaže počas sekvestrácie malý G-proteín ADP-ribosylačný faktor (ARF6) a nukleotidový výmenný faktor ARNO (Claing *et al.*, 2001).

4.2 Resenzitizácia

Resenzitizácia je proces, počas ktorého desenzitizovaný β -AR oživí svoju schopnosť odpovedať na biologický stimul. Regenerácia receptora je jeho základná biologická vlastnosť, ktorá prebehne tak účinne, že úplná desenzitizácia nenastane (Wachsman *et al.*, 1997). Desenzitizácia a resenzitizácia sú funkčne oddelené deje, kde fosforylácia β_2 -AR s GRK2 a väzba β -arrestinu sú kľúčové kroky, ktoré určujú mieru resenzitizácie v jednotlivých bunkách a tkanivách. Toto platí aj počas heterológnej desenzitizácie, kedy β_2 -AR fosforylovaný PKA musí prejsť endocytickou dráhou (Zhang *et al.*, 1997).

β_2 -AR, ktoré sú zabudované do membrány klatrínového váčku fúzujú s časnými endozómami (Seachrist *et al.*, 2000), ktoré obsahujú hojné množstvo Ser/Thr fosfatáz (Sibley *et al.*, 1986). Vplyvom zníženej pH hodnoty vo vnútri vezikule dochádza k zmene konformácie β_2 -AR, a pôvodne extracelulárne zbytky β_2 -AR sú protonované; táto konformačná zmena odhalí fosforylované aminokyselinové zbytky β_2 -AR, ktoré sú voľne prístupné pre fosfatázu PP2A (Krueger *et al.*, 1997). Defosforylácia prebehne v momente, keď β_2 -AR prestúpi do časti endozomálneho kompartmentu, ktorý je obohatený o malú GTPázu Rab4 namiesto Rab5; tieto malé GTPázy slúžia ako značky, ktoré nasmerujú váčky k cieľovej destinácii (Seachrist *et al.*, 2000). Podobná značka pre určenie osudu β_2 -AR, ktorá riadi recykláciu je N-ethylmaleimid-citlivého faktor (NSF). Dôkazom toho je prípad mutovaného β_2 -AR, ktorý nie je schopný viazať NSF, a recyklácia tohto receptora je úplne inhibovaná (Wang *et al.*, 2007). Tran a kolegovia poukázali na jednu zvláštnosť pri obnove funkcií β_2 -AR; defosforylácia prebehla veľmi rýchlo, a za normálnych okolností by táto doba nebola dostatočná pre sekvestráciu a putovanie β_2 -AR v klatrínovom váčku. Tento objav naznačuje, že defosforylácia nemusí prebiehať priamo v intracelulárnom prostredí, ale môže sa uskutočniť aj na plazmatickej membráne. Výsledky podporujú názor, že zmena konformácie β_2 -AR v kyslom prostredí umožní priblíženie fosfatáz; rýchla resenzitizácia je výsledkom disociácie β -arrestinu od β_2 -AR (Iyer *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2007). Resenzitizácia β_1 -AR je veľmi podobná k resenzitizácii β_2 -AR, pretože β_1 -AR putuje v klatrínových alebo kaveolinových váčkoch v dôsledku rozdielnej fosforylácie receptora s GRK alebo s PKA (Rapacciuolo *et al.*, 2003). Keď prítomný PDZ-motív inhibuje internalizáciu, defosforylácia desenzitizovaného β_1 -AR prebieha priamo na plazmatickej membráne za prítomnosti kotviaceho proteínu gravinu (Gardner *et al.*, 2007). V prípade β_3 -AR sa neuskutoční obnova odpovedi priamo na úrovni receptora, ale dôjde k reaktivácii AC a k regenerácii G-proteínu (Michel-Reher & Michel, 2013).

4.3 Down-regulácia

Neustála aktivácia β -AR vedie k definitívnemu zníženiu počtu receptorov na membráne; proces, ktorý namiesto recyklácie β -AR vyústi v endozomálnej dráhe, a skončí sa v lysozómoch (Kallal *et al.*, 1998). Táto down-regulácia spôsobí zníženie hustoty receptorovej mRNA, a regenerácia týchto β -AR môže trvať od 12 až 60 hod (Haddock & Malbon, 1988). Tieto popísané deje sú charakteristické pre β_1 - a β_2 -AR po dlhodobej aplikácii agonistu, avšak β_3 -AR sa chová zrejme inak počas kontinuálneho pridania agonistu. Primárna štruktúra β -AR priamo predurčuje ich down-regulačný osud, napr. aminokyselinové zbytky Tyr350 a Tyr354 na C-konci β_2 -AR slúžia ako značky down-regulácie (Valiquette *et al.*, 1990). Ďalej posttranslačné zmeny ako glykosylácia Asn15 môžu ovplyvniť funkciu β_1 -AR s jednonukleotidovým polymorfismom Gly49 (Rathz *et al.*, 2002); zvýšená down-regulácia β_1 -AR v zlyhávajúcom srdci predstavuje prirodzený autoregulačný mechanizmus pred nadmerným vyplavovaním noradrenalínu (Reithmann & Werdan, 1989).

Pripojenie ubikvitínov na β -arrestin2 pomocou E3 Mdm2 ubikvitínligázy umožní internalizáciu β_2 -AR, a spojuje β_2 -AR s ubikvitináčnymi enzýmami, ale ubikvitinácia samotného β -arrestinu2 nevedie k down-regulácii β_2 -AR. K tomu je potreba ubikvitinácia Lys zbytkov na β_2 -AR, ktoré sa nachádzajú na intracelulárnej strane, a fungujú ako značky lyzosomálnej dráhy β_2 -AR (Shenoy *et al.*, 2001). Existujú spôsoby down-regulácie β_2 -AR, ktoré sú nezávislé na predošlej internalizácii, ale degradácia β_2 -AR prebieha v proteazómoch asociovaných s endoplazmatickým retikulom, ktoré regulujú aj hladinu čerstvo syntetizovaných β_2 -AR; alternatívne, proces down-regulácie môže prebiehať priamo na membráne za účasti metaloproteáz (Jockers *et al.*, 1999).

Odpovede na otázku, čo sa stane s β_3 -AR po dlhodobej aktivácii poukázali na rôzne perspektívy osudu tohto atypického receptora, a môžeme pozorovať medzi výsledkami značný rozdiel; prvá možnosť je, že β_3 -AR je down-regulovaný podobne ako podtypy β_1 - a β_2 -AR. Pokus na potkanoch poukázal na to, že podanie orálneho agonistu BRL35135 spôsobil down-reguláciu β_3 -AR mRNA a tak aj zníženie lipolytickej odpovedi v bielom tukovom tkanive. Ďalej dochádzalo aj k desenzitizácii na úrovni AC až po 4 dňoch aplikácie BRL35135, napriek tomu, že po prvých 3 hod aktivita AC bola neporušená (Vicario *et al.*, 1998). Toto a ďalšie štúdie dokázali, že desenzitizácia sa prakticky uskutoční u β_3 -AR pravdepodobne nie na úrovni receptora, ale na úrovni signálnych komponentov smeru regulácie od stimulovaného β_3 -AR, napr. na úrovni AC alebo G-proteínu (Michel-Reher & Michel, 2013). Podobne pokus s myšami, ktoré boli vystavené chladu, podporil názor o down-regulácii β_3 -AR v hnedých adipocytoch; táto down-regulácia bola pravdepodobne výsledkom zastavenia transkripcie receptorovej mRNA kvôli zvýšenej hladiny cAMP dochádzalo k fosforylácii transkripčného faktora s PKA (Bengtsson *et al.*, 1996). Oproti tomu, došlo k up-regulácii β_3 -ARs v 373F42A bunkovej kultúre, ktoré boli vystavené stimulácii ISO a IBMX po 24 až 30 hod; táto up-regulácia receptorov bola dôsledkom zvýšenej transkripcii β_3 -AR pravdepodobne kvôli vplyvu CRE (Thomas *et al.*, 1992).

5 Klinický význam desenzitizácie β -adrenergických receptorov

Všadeprítomné β -AR sú zodpovedné za reguláciu životne dôležitých fyziologických dejov, a chyba na ktoromkoľvek úrovni môže viesť k fatálnemu dôsledku.

5.1. Kardiovaskulárne choroby

5.1.1 Zlyhanie srdca

V zlyhávajúcom srdci môžeme pozorovať pokles počtu β_1 -AR na plazmatickej membráne v dôsledku down-regulácie receptora a down-regulácie β_1 -AR mRNA ako odpoveď na nadmerné vyplavovanie noradrenalínu (Reithmann & Werdan, 1989; Bristow *et al.*, 1993), ktorá je súčasťou mechanizmu zachraňujúcu srdcovú bunku pred nadmernou katecholamínovou záťažou (Engelhardt *et al.*, 1999). Pretože postupne prevažuje počet β_2 -AR, dochádza k preferenčnému spriahnutiu s G_i (Brown & Harding, 1992). Spriahnutie β_2 -AR s G_i môže viesť k selektívnej aktivácii ERK/MAPK dráhy (Zou *et al.*, 1999), ktorá ochraňuje srdcový sval pred ischemiou (Lips *et al.*, 2004). V poslednej fáze zlyhania srdca spriahnutie β_2 -AR s G_s je škodlivé. V Purkyňových bunkách sa poukázalo na to, že táto G_s signalizácia spôsobí arytmogenné zmeny, ktoré môžu byť fatálne (Lang *et al.*, 2015). β_2 -AR v zlyhávajúcom srdci kompenzuje efekt chýbajúcich β_1 -AR, avšak nárast počtu β_2 -AR na plazmatickej membráne vedie k rýchlej degenerácii srdcového tkaniva a k úmrtiu (Liggett *et al.*, 2000).

Za zlyhanie srdca môže byť zodpovedná aj chyba v regulácii príslušných kináz ako je GRK alebo PKA. Poukázalo sa na to, že umlčanie GRK špecifickými inhibítormi zabraňuje patologickému dopadu kardiomyopatií (Rockman *et al.*, 1998). Počas tohto procesu sa sekvstruje $G\beta\gamma$ – je potrebný pre membránovú lokalizáciu β ARK1 (Tachibana *et al.*, 2005). Up-regulovaná PKA, ktorá hyperfosforyluje ryanodinový receptor a fosfolamban, naruší homeostázu Ca^{2+} iónov (Antos *et al.*, 2001).

V ranej fáze stimulácie, β_3 -AR aktivuje NOS dráhu, ktorá umlčuje β_1 - a β_2 -AR aktivitu (Moniotte *et al.*, 2001), upravuje systolu a diastolu, neutralizuje reaktívne kyslíkové radikály (ROS), má proangiogenetické účinky (Niu *et al.*, 2012). V konečnej fáze zlyhania srdca signalizácia β_3 -AR je ohrozujúca (Moniotte *et al.*, 2001), a vedie k porušeniu homeostázy Ca^{2+} iónov (Cheng *et al.*, 2001).

V súčasnosti najrozšírenejšou liečbou je užívanie β -blokátorov, ktoré potlačia down-reguláciu β_1 -AR, výrazne zlepšujú zdravotný stav a znižujú riziko mortality (Asai *et al.*, 1999). Zistenia, že β -blokátory nie sú dostatočne selektívne (Baker, 2005) a ochranný antiapoptotický efekt ERK/MAPK dráhy v srdci (Lips *et al.*, 2004) viedli k záveru, že klinický ligand, ktorý prednostne aktivuje ERK/MAPK signalizačnú dráhu a inhibuje cAMP-dependntnú dráhu (*biased agonists*), predstavuje perspektívnu možnosť liečby zlyhávajúceho srdca (Drake *et al.*, 2008).

5.1.2 Idiopatická dilatatívna kardiomyopatia

V sére pacientov autoimunitnej choroby idiopatická dilatatívna kardiomyopatia môžeme detegovať špecifické protilátky proti ECLII v β_1 -AR (Magnusson *et al.*, 1990) a protilátky proti ECLI v β_1 -AR (Wallukat *et al.*, 1995). Väzba týchto protilátok môže mať rozdielne efekty v signalizácii v dôsledku zmeny konformácie väzbového miesta (Bornholz *et al.*, 2013). Protilátky fungujú podobne ako katecholamíny, ktoré zvyšujú hladinu PKA, intracelulárnu koncentráciu Ca^{2+} iónov a zosilnia sťahovanie srdca (Christ *et al.*, 2001); práve preto nadmerná stimulácia β_1 -AR s autoprotiátkami môže viesť nielen k desenzitizácii tohto receptora, ale aj k narušeniu elektrických vlastností srdca – tieto zmeny v bunkovej signalizácii zvyšujú pravdepodobnosť mortality (Störk *et al.*, 2006). Na druhej strane, len malá časť protilátok utlmuje aktivitu β_1 -AR (Jahns *et al.*, 2000).

Na liečbu idiopatickej dilatatívnej kardiomyopatie existuje celé spektrum účinných metód, pomocou ktorých sa dá neutralizovať škodlivý vplyv autoprotiátok; nielen, že zmiernujú priebeh choroby, môže dochádzať aj k uzdraveniu pacientov. Podanie β -blokátorov je zatiaľ najrozšírenejšia liečebná metóda (Iwata *et al.*, 2001); ďalej odstránenie autoprotiátok pomocou imunoadsorpcie (Mobini *et al.*, 2003) alebo väzba aptamérov na autoprotiátku (Haberland *et al.*, 2014) predstavujú racionálne spôsoby perspektívnej terapie.

5.2 Respiračné choroby

5.2.1 Astma

Bronchiálna precitlivenosť je spôsobená spoločnou reguláciou muskarinových, tromboxanových receptorov a β_2 -AR. Tieto receptory po stimulácii sa spriahnu s $G_q\alpha$ -proteínom, čo vedie k aktivácii fosfolipázy C (PLC); väzba efektora IP_3 na receptor IP_3 na sarkoplazmatickom retikule (SR) spôsobí uvoľnenie Ca^{2+} iónov zo SR. Toto náhle vyplavenie vysokej koncentrácie Ca^{2+} iónov spôsobí silnú kontrakciu hladkého svalstva dýchacej sústavy (McGraw *et al.*, 2003).

Genetická variabilita medzi populáciami významne prispieva k výskytu bronchiálnej precitlivenosti. Polymorfne varianty β_2 -AR s Gly16 a Gln27 dobre korelujú s výskytom tejto choroby a spôsobia výraznú agonistom stimulovanú desenzitizáciu β_2 -AR (Tan *et al.*, 1997; D'Amato *et al.*, 1998).

Dlhodobá stimulácia (24 hod) β_2 -AR s ISO a so salbutamolom v ľudských mastocytoch viedlo k poklesu počtu týchto receptorov na plazmatickej membráne; tento jav bolo možné pripísať na účet desenzitizácie a následnej internalizácie. V dôsledku desenzitizácie došlo k poklesu hladiny cAMP a PKA *in vitro* a *in vivo*, čo spôsobilo vyplavenie interleukínov IL6, IL8 a histamínu, ktoré zhoršili priebeh bronchiálnej precitlivenosti. Tieto výsledky poukazujú na to, že síce na začiatku aplikácie agonisti môžu inhibovať uvoľnenie cytokínov, dlhodobá stimulácia vedie k tolerancii (Oehme *et al.*, 2015).

Na liečbu symptómov astmy vedľa kortikoidov sa používajú dlhodobo pôsobiace agonisti β_2 -AR, ktoré sú schopné vyvolať desenzitizačnú odpoveď a majú protizápalové účinky. Súčasné podávanie

plného β_2 -AR agonistu formoterolu a kortikoidu budesonidu zmierňilo príznaky astmy a zlepšilo funkciu pľúc (Pauwels *et al.*, 1997). Prekvapivé zistenie bolo, že kombinácia formoterolu a budesonidu nespôsobila toleranciu; oproti tomu, po podaní formoterolu astmatickým pacientom sa znížila bronchodilatačná odpoveď salbutamolu (Haney & Hancox, 2005). Dlhodobó pôsobiace β_2 -AR agonisti indacaterol, formoterol a salmeterol efektívne potlačujú tvorbu prostaglandínov, prozápalových leukotriénov a uvoľnenie histamínu v mastocytoch; najväčšia výhoda indacaterolu tkvie v tom, že densenzitizačná odpoveď, ktorú vyvolala je výrazne menšia než ako je to možné pozorovať u čiastočného agonistu salmeterolu alebo plného agonistu formoterolu, čo znamená menšiu pravdepodobnosť vytvorenia tolerancie na indacaterol (Scola *et al.*, 2009).

5.3 Metabolické choroby

5.3.1 Obezita

Obezita je metabolická choroba, ktorá sa prejavuje neprimeraným ukladaním tuku do podkožných vrstiev s BMI 30 alebo vyššie, a je jednou charakteristikou metabolického syndrómu. Chronické zvýšenie aktivity sympatickej nervovej sústavy často predchádza nielen obezitou, ale je spoločným menovateľom kardiovaskulárnych chorôb, diabetu a rakoviny (Lambert *et al.*, 2010).

Obezita je polygénna choroba, kde vedľa génovej výbavy hrajú veľkú rolu aj environmentálne zložky. Medzi významnými génmi vo vývoji obezity sú gény β -AR, ktoré regulujú energetický výdaj. Jednonukleotidové polymorfizmy β -AR boli v mnohých prípadoch asociované so zmenou na úrovni regulácie receptora. Výskumy prevedené na géne β -AR poukázali na rozporné výsledky, a nedalo sa jednoznačne predpovedať výskyt obezity podľa genotypu. Najrozšírenejšie polymorfizmy β_1 -AR asociované s obezitou sú Ser49Gly a Arg389Gly; v prípade β_2 -AR boli identifikované tri polymorfne varianty *ADRB2*, ktoré by mohli súvisieť s vývojom obezity: Gln27Glu, Arg16Gly a Thr164Ile (Masuo & Lambert, 2011), a sú úzko spojené s reguláciou glukózového metabolizmu. Homozygotné haplotypy *ADRB2* vykazovali inzulínovú odolnosť, glukózovú toleranciu a zvýšené riziko pre nástup diabetu u obéznych postmenopauzálnych žien (Prior *et al.*, 2011). Variant Gln27Glu nemal významný vplyv na energetický výdaj obéznych žien, avšak počas fyzickej aktivity dochádzalo k lipolýze a k oxidácii lipidov; tento výsledok navrhuje akútnu fyzickú aktivitu ako možný terapeutický prostriedok (Lopes Rosado *et al.*, 2015). Variant Thr164Ile sa javil ako významný riskový faktor obezity, ale nesúvisel so zvýšeným BMI (Thomsen *et al.*, 2016). β_3 -AR je hojne zastúpený v bielom tukovom tkanive, a je zodpovedný za reguláciu lipidového metabolizmu, preto je vhodné preskúmať genetické zmeny v tomto receptore (Krief *et al.*, 1993). Variant Trp64Arg β_3 -AR polymorfizmu, ktorý spôsobí zmenu v lipolytickej citlivosti v adipocytoch, je pravdepodobne spojený s váhovým ziskom, ale sám nie je zodpovedný za vývoj obezity (Yamakita *et al.*, 2010). Ďalšia nedávna štúdia potvrdila, že síce variant Trp64Arg nie je priamo asociovaný s nástupom obezity, ale obézne subjekty s touto alélovou výbavou vykazujú zvýšenú koncentráciu triglyceridov v krvi (Chen *et al.*, 2015).

Selektívne agonisti β_3 -AR predstavujú perspektívne klinické ligandy na liečbu obezity. L755507 je schopný aktivovať lipolytickú odpoveď β_3 -AR v tukovom tkanive a znižovať váhu jedincov (Fisher *et al.*, 1998). Mirabegron v hedom tukovom tkanive stimuláciou termogenézie zvyšoval bazálny metabolizmus a energetické výdaje testovaných mužov (Cypess *et al.*, 2015). Dôkazy sa hromadia pre podporu fyzickej aktivity ako efektívnej liečebnej metódy, ktoré poukazujú na priaznivé účinky pohybu. Kardiorespiratórny fitness neprispieje len k rýchlejšiemu lipidovému metabolizmu (Lopes Rosado *et al.*, 2015), ale aj k zosilneniu imunitného systému jedinca znížením hladiny zápalových cytokínov ako sú TNF a IL1 β , v neposlednom rade resenzitizáciou β -AR (Hong *et al.*, 2014).

5.4 Urologické choroby

5.4.1 Hyperaktívny močový mechúr

Hyperaktívny močový mechúr je definovaný ako súbor symptómov, ktoré zahŕňujú nalievavosť močenia s alebo bez prítomnosti inkontinencie, ďalej noktúriu; tieto príznaky neznamenia životné ohrozenie, ale kvalita života pacienta je značne poznamenaná (Abrams *et al.*, 2002). Hyperaktivita močového mechúra je spôsobená zvýšenou kontraktilitou a zníženou relaxáciou hladkého svalstva *m. detrusor* počas plniacej fázy cyklu močenia. Kontrakciu *m. detrusora* spôsobuje aktivácia muskarinových receptov M₂R a M₃R (Chess-Williams, 2002) a relaxácia je sprostredkovaná β_3 -AR (Michel & Vrydag, 2006). Aplikácia antimuskarinových ligandov úspešne eliminuje nadmernú kontrakciu, avšak nevýhoda tkvie v častom výskyte vedľajších účinkov ako sú suché ústa, gastrointestinálne záťaž a niekedy aj neurologické dopady.

Agonisti β_3 -AR sa javia ako perspektívny terapeutický smer zmiernenia symptómov hyperaktívneho močového mechúra; agonisti β_3 -AR priamo blokujú aferentný nerv alebo nepriamo znižujú aktivitu aferentného nervu nezávisle na kontrakcii hladkého svalstva močového mechúra (Kanai *et al.*, 2012). Tieto agonisti sa môžu efektívne používať aj po menopauze (Kullmann *et al.*, 2009). V literatúre sa nájdu početné štúdie prevedené na rôznych organizmoch, kedy aplikácia selektívneho agonistu β_3 -AR významne upravila cyklus močenia. Podávanie mirabegronu makakom dlhochvostým sa prejavilo zvýšením objemu vyprázdnenej moči a znížením frekvencie močenia (Hatanaka *et al.*, 2013). Agonista CL316243 výrazne zvýšil kapacitu myšieho močového mechúra a znížil amplitúdy svalovej kontrakcie (Deba *et al.*, 2009). Solabegron bol schopný vyvolať relaxáciu hladkého svalstva ľudského močového mechúra (Tyagi *et al.*, 2009), a ritobegron sa javil ako urorelaxant makakového močového mechúra (Maruyama *et al.*, 2012).

6 Záver

β -AR predstavujú dôkladne preštudovanú skupinu v rámci rodiny GPCR kvôli ich rozšírenosti v organizme a rôznorodým fyziologickým dráham, ktorých sprostredkujú; ich všadeprítomnosť a centrálna úloha v intracelulárnej signalizácii sú hlavným indikátorom účinkovania v nástupu rôznych chorôb a možnosti terapeutického využitia. Podľa súčasných poznatkov sú identifikované tri typy β -AR podľa ich farmakologických vlastností: β_1 -AR, β_2 -AR a β_3 -AR. Počas aktivácie β -AR sa nastane jav zvaná desenzitizácia, kedy sa prejavuje refraktorná perióda v odpovedavosti β -AR napriek tomu, že stimulácia stále prebieha. Desenzitizácia môže byť homológna – jeden stimul je umlčaný za účinku GRK a β -arrestinu, alebo heterológna – rada stimulov je umlčaných fosforyláciou rôznych GPCR s PKA. Klasický model zahŕňa väzbu ligandu a následnú fosforyláciu β -AR, ktorá spôsobí zmenu konformácie. Aby sa obnovila signalizačná schopnosť β -AR, je potrebná defosforylácia PP2A fosfatázami, ktorá môže prebiehať na plazmatickej membráne za prítomnosti proteínového komplexu gravinu alebo v endozomálnych váčkoch v prostrední kyslej pH. Cesta sekvestrovaných β -AR sa môže uskutočniť v obalenom klatrínovom váčku, ktorá je závislá na predošlej fosforylácii s GRK a prítomnosti β -arrestinu alebo v neobalených kaveolinových váčkoch. Napriek tomu, že β -AR zdieľajú minimálne 50% homológiu, detaily mechanizmov desenzitizácie sa značne líšia. Konvenčný model desenzitizácie a resenzitizácie je definovaný na prototypickom β_2 -AR, ktorý je dominantným receptorom v hladkej svalovine. Desenzitizácia β_1 -AR sa nelíši významne od β_2 -AR, avšak sekvestrácia tohto receptoru nemôže prebiehať kvôli prítomnej PDZ-doméne na C-konci, ktorá inhibuje internalizáciu. V tomto prípade defosforylácia a následná regenerácia musí prebiehať priamo na plazmatickej membráne v prítomnosti gravinu. Posledný charakterizovaný β_3 -AR v tukovom tkanive a močovom mechúre sa výrazne líši od zmienených podtypov, napriek tomu, že patria do jednej rodiny GPCR. β_3 -AR je známy ako atypický adrenergny receptor u ktorého desenzitizácia neprebíha; dôvodom môže byť skrátený C-koniec, ktorý je rozhodujúci pre optimálny priebeh desenzitizácie, pretože obsahuje aminokyseliny potrebné pre fosforyláciu. Aj keď je všeobecne známa odolnosť β_3 -AR voči desenzitizácii, bolo zistené, že signálna odpoveď môže byť umlčaná inými mechanizmami, napr. na úrovni mRNA alebo na úrovni AC a G-proteínu. Z toho dôvodu, že β -AR sú všadeprítomné, ich chybná syntéza a neúplná funkcia vedie k rôznym chorobám, často k fatálnym dôsledkom, ktoré zasahujú kardiovaskulárny systém, dýchaciu sústavu, ďalej nadmerná katecholamínová záťaž môže vyústiť v metabolických ťažkostiach a urologických problémoch. V neposlednom rade literatúra poukazuje na to, že i vývoj rakoviny môže byť spojený so signalizáciou β -AR. Sice β -AR sú v centre vedeckej pozornosti od konca 70. rokov 20. str., niektoré kroky desenzitizácie sú nedostatočne popísané ako je proces resenzitizácie. Vzhľadom k tomu, že β -AR sú mediátormi AC/PKA dráhy, a môžu sprostredkovať prostredníctvom G-proteínov MAPK dráhy, je vhodné uvažovať nad ďalšími signalizačnými dráhami, kde by samotný β -AR mohol slúžiť ako križovatka pestrých fyziologických odpovedí.

7 Literatúra

Review vyznačené tučne.

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Kerrebroeck P Van, Victor A & Wein A (2002). The standardisation of terminology of lower urinary tract function. *Neurol Urodynamics* **21**, 167–178.
- Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ & Daaka Y (1999). Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for β_2 -adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **274**, 1185–1188.
- Angelone T, Filice E, Quintieri a M, Imbrogno S, Recchia A, Pulerà E, Mannarino C, Pellegrino D & Cerra MC (2008). β_3 -Adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol* **193**, 229–239.
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR & Olson EN (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ Res* **89**, 997–1004.
- Arakawa M, Chakraborty R, Upadhyaya J, Eilers M, Reeves PJ, Smith SO & Chelikani P (2012). Structural and functional role of small group-conserved amino acids present on helix-H7 in the β_2 -adrenergic receptor. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1170–1178.
- Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ & Vatner SF (1999). β -Adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic $G_s\alpha$ mouse. *J Clin Invest* **104**, 551–558.
- Atef N, Lafontan M, Double A, Helary C, Ktorza A & Penicaud L (1996). A specific β_3 -adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur J Pharmacol* **298**, 287–292.
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG & Lefkowitz RJ (1992). β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J Biol Chem* **267**, 17882–17890.
- Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ & Houslay MD (2003). β -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates β -adrenoreceptor switching from G_s to G_i . *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 940–945.
- Baker JG (2005). The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **144**, 317–322.
- Barak LS, Tiberi M, Freedman NJ, Kwatra MM, Lefkowitz RJ & Caron MG (1994). A highly conserved tyrosine residue in G-protein-coupled receptors is required for agonist-mediated β_2 -adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* **269**, 2790–2795.
- Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, Simon B, Naline E, Dumas M, Esteve S, Croci T, Chalon P, Frydman R, Sagot P, Manara L, Morcillo EJ & Advenier C (2000). Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible β_3 -adrenoceptor in human near-term myometrium. *Br J Pharmacol* **130**, 1960–1966.
- Beautrait A, Michalski KR, Lopez TS, Mannix KM, McDonald DJ, Cutter AR, Medina CB, Hebert AM, Francis CJ, Bouvier M, Tesmer JGG & Sterne-Marr R (2014). Mapping the putative G-protein-coupled receptor (GPCR) docking site on GPCR kinase 2. *J Biol Chem* **289**, 25262–25275.
- Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L & Groop L (2001). Polymorphism in the β_1 -adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation* **104**, 187–190.
- Bengtsson T, Redegren K, Strosberg AD, Nedergaard J & Cannon B (1996). Down-regulation of β_3 -adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon

- a short-lived protein factor. *J Biol Chem* **271**, 33366–33375.
- Benovic JL & Gomez J (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. *J Biol Chem* **268**, 19521–19527.
- Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1987a). 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). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8879–8882.
- Benovic JL, Mayor F, Staniszewski C, Lefkowitz RJ & Caron MG (1987b). Purification and characterization of the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **262**, 9026–9032.
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1985). Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **260**, 7094–7101.
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG & Lefkowitz RJ (1986). β -Adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2797–2801.
- Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205.**
- Bhattacharya S, Hall SE, Li H & Vaidehi N (2008). Ligand-stabilized conformational states of human β_2 -adrenergic receptor: Insight into G-protein-coupled receptor activation. *Biophys J* **94**, 2027–2042.
- Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A & Andersson B (2000). A novel polymorphism in the gene coding for the β_1 -adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* **21**, 1853–1858.
- Bornholz B, Weidtkamp-Peters S, Schmitmeier S, Seidel CAM, Herda LR, Felix SB, Lemoine H, Hescheler J, Nguemo F, Schäfer C, Christensen MO, Mielke C & Boege F (2013). Impact of human autoantibodies on β_1 -adrenergic receptor conformation, activity, and internalization. *Cardiovasc Res* **97**, 472–480.
- Bouvier M, Collins S, O’Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, MacGregor C, Irons GP, Caron MG & Lefkowitz RJ (1989). Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **264**, 16786–16792.
- Bouvier M, Guilbault N & Bonin H (1991). Phorbol-ester-induced phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor decreases its coupling to G_s . *FEBS Lett* **279**, 243–248.
- Breit A, Lagacé M & Bouvier M (2004). Hetero-oligomerization between β_2 - and β_3 -adrenergic receptors generates a β -adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* **279**, 28756–28765.
- Bristow MR, Minobe WA, Raynolds M V, Port JD, Rasmussen R, Ray PE & Feldman AM (1993). Reduced β_1 -receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* **92**, 2737–2745.
- Brown L a & Harding SE (1992). The effect of pertussis toxin on β -adrenoceptor responses in isolated cardiac myocytes from noradrenaline-treated guinea-pigs and patients with cardiac failure. *Br J Pharmacol* **106**, 115–122.
- Bundgaard H, Liu CC, Garcia A, Hamilton EJ, Huang Y, Chia KKM, Hunyor SN, Figtree GA & Rasmussen HH (2010). β_3 -Adrenergic stimulation of the cardiac Na^+K^+ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification. *Circulation* **122**, 2699–2708.
- Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT & Lefkowitz RJ (2001). β -Arrestin-mediated ADP-ribosylation Factor 6 activation and β_2 -adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 42509–42513.
- Clément K, Vaisse C, Manning BS, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver K, Shuldiner AR, Froguel P & Strosberg AD (1995). Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an

- increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* **333**, 352–354.
- Collins S, Altschmied J, Herbsman O, Caron MG, Mellon PL & Lefkowitz RJ (1990). A cAMP response element in the β_2 -adrenergic receptor gene confers transcriptional autoregulation by cAMP. *J Biol Chem* **265**, 19330–19335.
- Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG & Lefkowitz RJ (1989). cAMP stimulates transcription of the β_2 -adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4853–4857.
- Communal C, Singh K, Sawyer DB & Colucci WS (1999). Opposing effects of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis. Role of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Circulation* **100**, 2210–2212.
- Costa B, Pereira SB, Ribeiro GS & Mesquita ET (2012). β_1 -adrenergic receptor polymorphisms associated with atrial fibrillation in systolic heart failure. 384–389.
- Cypess AM, Weiner LS, Roberts-toler C, Elía EF, Kessler H, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A & Kolodny GM (2015). Activation of human brown adipose tissue by a β_3 -adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* **21**, 33–38.
- D’Amato M, Vitiani LR, Petrelli G, Ferrigno L, di Pietro A, Trezza R & Matricardi PM (1998). Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with β_2 -adrenoceptor (*ADRB2*) haplotypes. *Am J Respir Crit Care* **158**, 1968–1973.
- Daaka Y, Luttrell LM & Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88–91.
- Davies AO & Lefkowitz RJ (1983). *In vitro* desensitization of β -adrenergic receptors in human neutrophils. *J Clin Invest* **71**, 565–571.
- Deba A, Palea S, Rouget C, Westfall TD & Lluell P (2009). Involvement of β_3 -adrenoceptors in mouse urinary bladder function: Role in *detrusor* muscle relaxation and micturition reflex. *Eur J Pharmacol* **618**, 76–83.
- DeBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL & Hosey MM (1996). G-protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* **271**, 22552–22562.
- DeFea KA., Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD & Bunnett NW (2000). β -Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**, 1267–1281.
- Devic E, Xiang Y, Gould D & Kobilka B (2001). β -Adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from β_1 - and β_2 -adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **60**, 577–583.
- Dixon RA, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E & Strader CD (1987). Structural features required for ligand binding to the β -adrenergic receptor. *EMBO J* **6**, 3269–3275.
- Drake MT, Violin JD, Whalen EJ, Wisler JW, Shenoy SK & Lefkowitz RJ (2008). β -Arrestin-biased agonism at the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **283**, 5669–5676.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F & Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in β_1 -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7059–7064.
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S & Summers RJ (1999). Alternative splicing generates two isoforms of the β_3 -adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br J Pharmacol* **127**, 1525–1531.
- Feve B, Emorine LJ, Lasniers F, Blin N, Baude B, Nahmias C, Strosberg AD & Pairaults J (1991). Atypical β -adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* **266**, 20329–20336.
- Fisher MH, Amend AM, Bach TJ, Barker JM, Brady EJ, Candelore MR, Carroll D, Cascieri MA, Chiu SHL, Deng L, Forrest MJ, Hegarty-Friscino B, Guan XM, Hom GJ, Hutchins JE, Kelly LJ, Mathvink RJ, Metzger JM, Miller RR, Ok HO, Parmee ER, Saperstein R, Dtrader CD, Stearns

- RA, Thompson GM, Tota L, Vicario PP, Weber AE, Woods JW, Wyvratt MJ, Zafian PT & MacIntyre DE (1998). A selective human β_3 -adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in rhesus monkeys. *J Clin Invest* **101**, 2387–2393.
- Fraser CM (1989). Site-directed mutagenesis of β -adrenergic receptors. *J Biol Chem* **264**, 9266–9270.
- Fraser IDC, Cong M, Kim J, Rollins EN, Daaka Y, Lefkowitz RJ & Scott JD (2000). Assembly of an A kinase-anchoring protein – β -adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *J Clin Invest* **10**, 409–412.
- Fredericks ZL, Pitcher J a & Lefkowitz RJ (1996). Identification of the G-protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**, 13796–13803.
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG & Lefkowitz RJ (1995). Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **270**, 17953–17961.
- Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ & Kobilka BK (1987). Cloning of the cDNA for the human β_1 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7920–7924.
- Frielle T, Daniel KW, Caron MG & Lefkowitz RJ (1988). Structural basis of β -adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric β_1 -/ β_2 -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9494–9498.
- Fu Q, Kim S, Soto D, Arcangelis V De, DiPilato L, Liu S, Xu B, Shi Q, Zhang J & Xiang YK (2014). A long lasting β_1 -adrenergic receptor stimulation of cAMP/protein kinase A (PKA) signal in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **289**, 14771–14781.
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL & Keen JH (1999). Arrestin function in G-protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* **18**, 871–881.
- Galandrin S & Bouvier M (2006). Signaling profiles of β_1 - and β_2 -adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* **70**, 1575–1584.
- Galitzky J, Langin D, Verwaerde P, Montastruc JL, Lafontan M & Berlan M (1997). Lipolytic effects of conventional β_3 -adrenoceptor agonists and of CGP12,177 in rat and human fat cells: preliminary pharmacological evidence for a putative β_4 -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* **122**, 1244–1250.
- Gardner LA, Naren AP & Bahouth SW (2007). Assembly of an SAP97-AKAP79-cAMP-dependent protein kinase scaffold at the type 1 PSD-95/DLG/ZO1 motif of the human β_1 -adrenergic receptor generates a receptosome involved in receptor recycling and networking. *J Biol Chem* **282**, 5085–5099.
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL & Le Marec H (1998). The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* **102**, 1377–1384.
- Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D & Le Marec H (1996). Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**, 556–562.
- Goodman OB, Krupnick JG, Gurevich V V, Benovic JL & Keen JH (1997). Arrestin/clathrin interaction. *J Biol Chem* **272**, 15017–15022.
- Green SA, Cole G, Jacinto M, Innis M & Liggett B (1993). A polymorphism of the human β_2 -adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* **268**, 23116–23121.
- Gurevich V V, Dion SB, Onorato JJ, Ptasiński J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM & Benovic JL (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, β_2 -adrenergic, and m_2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* **270**, 720–731.

- Haberland A, Wallukat G, Berg S, Schulz A-M, Freyse E-J, Vetter R, Salzsieder E, Müller J, Kreutz R & Schimke I (2014). Neutralization of pathogenic β_1 -receptor autoantibodies by aptamers *in vivo*: The first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* **393**, 177–180.
- Hadcock JR & Malbon CC (1988). Down-regulation of β -adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5021–5025.
- van der Hagen EAE, Tudpor K, Verkaart S, Lavrijsen M, Kemp A Van Der, Zeeland F Van, Bindels RJM & Hoenderop JGJ (2014). β_1 -Adrenergic receptor signaling activates the epithelial calcium channel, transient receptor potential vanilloid type 5 (TRPV5), via the protein kinase A pathway. *J Biol Chem* **289**, 18489–18496.
- Hall RA, Premont RT, Chow C-W, Blitzler JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S & Lefkowitz RJ (1998). The β_2 -adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. *Nature* **392**, 626–630.
- Haney S & Hancox RJ (2005). Rapid onset of tolerance to β -agonist bronchodilation. *Respir Med* **99**, 566–571.
- Hatanaka T, Ukai M, Watanabe M, Someya A, Ohtake A, Suzuki M, Ueshima K, Sato S & Masuda N (2013). Pharmacological profile of the selective β_3 -adrenoceptor agonist mirabegron in cynomolgus monkeys. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**, 1001–1008.
- Hathaway DR, Eaton CR & Adelstein RS (1981). Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature* **291**, 252–254.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG & Lefkowitz RJ (1989). Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**, 12657–12665.
- Hekman M, Feder D, Keenan AK, Gall A, Klein HW, Pfeuffer T, Levitzki A & Helmreich EJM (1984). Reconstitution of β -adrenergic receptor with components of adenylate cyclase. *EMBO J* **3**, 3339–3345.
- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich V V & Sigler PB (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation. *Cell* **97**, 257–269.
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ & Klotz KN (2004). Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes – Characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 151–159.
- Hong S, Dimitrov S, Pruitt C, Shaikh F & Beg N (2014). Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: Role of β -adrenergic receptors. *Brain Behav Immunol* **39**, 113–120.
- Hu LA, Tang Y, Miller WE, Cong M, Lau AG, Lefkowitz RJ & Hall RA (2000). β_1 -Adrenergic receptor association with PSD-95. *J Biol Chem* **275**, 38659–38666.
- Hunton DL, Barnes WG, Kim J, Ren X-R, Violin JD, Reiter E, Milligan G, Patel DD & Lefkowitz RJ (2005). β -Arrestin2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* **67**, 1229–1236.
- Hutchinson DS, Bengtsson T, Evans B a & Summers RJ (2002). Mouse β_{3a} - and β_{3b} -adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol* **135**, 1903–1914.
- Chen CY, Dion SB, Kim CM & Benovic JL (1993). β -Adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem* **268**, 7825–7831.
- Chen Y, Wang X, Shen Z, Fan P, Liu R, Liu Y, Ren R, Ma L & Bai H (2015). Effect of the β_3 -adrenergic receptor Trp64Arg and uncoupling protein 1 – 3826 A > G genotypes on lipid and apolipoprotein levels in overweight/obese and non-obese Chinese subjects. *Lipids Health Dis* **14**, 1–7.
- Cheng H, Zhang Z, Onishi K, Ukai T, Sane DC & Cheng C-P (2001). Upregulation of functional

- β_3 -adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res* **89**, 599–606.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi H-J, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK & Stevens RC (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265.
- Chess-Williams R (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder : Detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* **22**, 133–145.**
- Christ T, Wettwer E, Dobrev D, Adolph E, Knaut M, Wallukat G & Ravens U (2001). Autoantibodies against the β_1 -adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1515–1525.
- Chuang DM & Costa E (1979). Evidence for internalization of the recognition site of β -adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3024–3028.
- Chuang TT, LeVine III H & De Blasi A (1995). Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* **270**, 18660–18665.
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y & Nishizuka Y (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. **252**, 1610–1616.
- Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H & Ogawa S (2001). Autoimmunity against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors induces β -adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy *in vivo*. *Circ Res* **88**, 578–586.
- Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB & Knoll BJ (2006). Differential phosphorylation and dephosphorylation of β_2 -adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol* **147**, 249–259.
- Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F & Lohse MJ (2000). Modulation of β_1 -adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* **36**, 1280–1287.
- January B, Seibold A, Allal C, Whaley BS, Knoll BJ, Moore RH, Dickey BF, Barber R & Clark RB (1998). Salmeterol-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the human β_2 -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* **123**, 701–711.
- January B, Seibold A, Whaley B, Hipkin RW, Lin D, Schonbrunn A, Barber R & Clark RB (1997). β_2 -Adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem* **272**, 23871–23879.
- Jockers R, Angers S, Da Silva A, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M & Marullo S (1999). β_2 -Adrenergic receptor down-regulation. *J Biol Chem* **274**, 28900–28908.
- Johnson GL, Wolfe BB, Harden TK, Molinoff PB & Perkins JP (1978). Role of β -adrenergic receptors in catecholamine-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* **253**, 1472–1480.
- Johnson M (2006). Molecular mechanisms of β_2 -adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 18–24.**
- Kallal L, Gagnon a W, Penn RB & Benovic JL (1998). Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **273**, 322–328.
- Kanai A, Zabbarova I, Oefelein M, Radziszewski P, Ikeda Y & Andersson K-E (2012). Mechanisms of action of botulinum neurotoxins, β_3 -adrenergic receptor agonists, and PDE5 inhibitors in modulating detrusor function in overactive bladders: ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn* **308**, 300–308.
- Kassis S, Olasmaas M, Sullivan M & Fishman PH (1986). Desensitization of the β -adrenergic

- receptor-coupled adenylate cyclase in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* **261**, 12233–12237.
- Kobilka B (2013). The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 6380–6388.**
- Kobilka BK, Dixon RA, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG & Lefkowitz RJ (1987a). cDNA for the human β_2 -adrenergic receptor: A protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 46–50.
- Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski M, Dixon R, Keller P, Caron MG & Lefkowitz RJ (1987). Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster β_2 -adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem* **262**, 7321–7327.
- Kohout TA, Lefkowitz RJ & Carolina N (2003). Regulation of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* **63**, 9–18.**
- Kohout TA, Lin F-T, Perry SJ, Conner DA & Lefkowitz RJ (2001). β -Arrestin1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1–6.
- Konkar AA, Zhu Z & Granneman JG (2000). Aryloxypropranolamine and catecholamine ligand interactions with the β_1 -adrenergic receptor: Evidence for interaction with distinct conformations of β_1 -adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 923–932.
- Krasel C, Bünemann M, Lorenz K & Lohse MJ (2005). β -Arrestin binding to the β_2 -adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* **280**, 9528–9535.
- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Amer P, Strosberg AD, Ricquier D & Emorine LJ (1993). Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* **91**, 344–349.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA & Lefkowitz RJ (1997). The role of sequestration in G-protein-coupled receptor resensitization. *J Biol Chem* **272**, 5–9.
- Krupnick JG, Goodman OB, Keen JH & Benovic JL (1997). Arrestin/clathrin interaction. *J Biol Chem* **272**, 15011–15016.
- Kullmann FA, Limberg BJ, Artim DE, Shah M, Downs TR, Contract D, Wos J, Rosenbaum JS & Groat WC De (2009). Effects of β_3 -adrenergic receptor activation on rat urinary bladder hyperactivity induced by ovariectomy. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 704–717.
- Kuo F-T, Lu T-L & Fu H-W (2006). Opposing effects of β -arrestin1 and β -arrestin2 on activation and degradation of SRC induced by protease-activated receptor 1. *Cell Signal* **18**, 1914–1923.
- Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB & Schlaich MP (2010). Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome - Causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* **126**, 159–172.**
- Lands AM, Arndold A, McAuliff JP, Luduena FP & Brown TG (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* **214**, 597–598.
- Lang D, Holzem K, Kang C, Xiao M, Hwang HJ, Ewald GA, Yamada KA & Efimov IR (2015). Arrhythmogenic remodeling of β_2 - versus β_1 -adrenergic signaling in the human failing heart. *Circ* **8**, 409–419.
- Lanzara R (2005). Optimal agonist/antagonist combinations maintain receptor response by preventing rapid β_1 -adrenergic receptor desensitization. *Int J Pharmacol* **1**, 122–131.
- Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS & Caron MG (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. *J Biol Chem* **275**, 23120–23126.
- Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K & Filipek S (2012). G-protein-coupled**

receptors - recent advances. *Acta Biochim Pol* 59, 515–529.

- Lavoie C, Mercier J-F, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve L-R, Zhu W-Z, Xiao R-P, Lakatta EG, Bouvier M & Hebert TE (2002). β_1 - β_2 -Adrenergic receptor heterodimerization regulates β_2 -adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**, 35402–35410.
- De Lean A, Stadel JM & Lefkowitz RJ (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**, 7108–7117.
- Lefkowitz RJ, Stadel JM & Caron MG (1983). Adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptors: Structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annu Rev Biochem* 52, 159–186.**
- Lelias JM, Kaghad M, Rodriguez M, Chalon P, Bonnin J, Dupre I, Delpech B, Bensaid M, LeFur G, Ferrara P & Caput D (1993). Molecular cloning of a human β_3 -adrenergic receptor cDNA. *FEBS Lett* **324**, 127–130.
- Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn D a & Lefkowitz RJ (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β_3 - β_2 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3665–3669.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A & Dorn II GW (2000). Early and delayed consequences of β_2 -adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: Critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707–1714.
- Lin F, Wang H & Malbon CC (2000). Gravin-mediated formation of signaling complexes in β_2 -adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J Biol Chem* **275**, 19025–19034.
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA & Lefkowitz RJ (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1. *J Biol Chem* **272**, 31051–31057.
- Lin HC & Gilman AG (1996). Regulation of dynamin I GTPase activity by G-protein $\beta\gamma$ subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **271**, 27979–27982.
- Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, Pagès G, Windt LJ De, Doevendans PA & Molkentin JD (2004). MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury *in vivo*. *Circulation* **109**, 1938–1941.
- Liu R, Ramani B, Soto D, Arcangelis V De & Xiang Y (2009). Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G-protein-coupled receptor kinase regulates β_2 -adrenoceptor coupling to G_i -proteins in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**, 32279–32287.
- Lohse MJ, Benovic L, Caron G & Lefkowitz J (1990). Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *Biol Chem* **265**, 3202–3209.
- Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG & Benovic JL (1989). Inhibition of β -adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of β_2 -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3011–3015.
- Lopes Rosado E, Bressan J & Martínez JA (2015). Environmental factors and β_2 -adrenergic receptor polymorphism: Influence on the energy expenditure and nutritional status of obese women. *Lipids* **50**, 459–467.
- Loudon RP & Benovic JL (1994). Expression, purification, and characterization of the G-protein-coupled receptor kinase GRK6. *J Biol Chem* **269**, 22691–22697.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG & Lefkowitz RJ (1999). β -Arrestin-dependent formation of β_2 -adrenergic receptor-SRC protein kinase complexes. *Science (80-)* **283**, 655–661.
- Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahine A, Guillet JG, Strosberg a D,

- Hjalmarson A & Hoebeke J (1990). Mapping of a functional autoimmune epitope on the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* **86**, 1658–1663.
- Malinowska B & Schlicker E (1997). Further evidence for differences between cardiac atypical β -adrenoceptors and brown adipose tissue β_3 -adrenoceptors in the pithed rat. *Br J Pharmacol* **122**, 1307–1314.
- Mantyh PW, Rogers SD, Allen CJ, Catton MD, Maggio JE, Vigna SR & Ghilardi R (1995). Receptors are expressed by glia *in vivo* in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human. *J Neurosci* **15**, 152–164.
- Maruyama I, Tatemichi S, Goi Y, Maruyama K, Hoyano Y, Yamazaki Y & Kusama H (2012). Effects of ritobegron (KUC-7483), a novel selective β_3 -adrenoceptor agonist, on bladder function in cynomolgus monkey. *J Pharmacol Exp Ther* **342**, 163–168.
- Mason DA, Moore JD, Green SA & Liggett SB (1999). A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human β_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **274**, 12670–12674.
- Masuo K & Lambert GW (2011). Relationships of adrenoceptor polymorphisms with obesity. *J Obes* 2011, 1–10.**
- McDonald P, Cote N, Lin F, Premont RT, Pitcher JA & Lefkowitz RJ (1999). Identification of NSF as a β -arrestin1-binding protein. *J Biol* **274**, 10677–10681.
- McGraw DW, Almoosa KF, Paul RJ, Kobilka BK & Liggett SB (2003). Antithetic regulation by β -adrenergic receptors of G_q receptor signaling via phospholipase C underlies the airway β -agonist paradox. *J Clin Invest* **112**, 619–626.
- McGraw DW & Liggett SB (1997). Heterogeneity in β -adrenergic receptor kinase expression in the lung accounts for cell-specific desensitization of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **272**, 7338–7344.
- McNeel RL & Mersmann HJ (1999). Distribution and quantification of β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. *J Anim Sci* **77**, 611–621.
- Mellor H & Parker PJ (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332, 281–292.**
- Michel-Reher MB & Michel MC (2013). Agonist-induced desensitization of human β_3 -adrenoceptors expressed in human embryonic kidney cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**, 843–851.
- Michel MC & Vrydag W (2006). α_1 -, α_2 - and β -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147, S88–S119.**
- Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM & Lefkowitz RJ (2000). β -Arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. *J Biol Chem* **275**, 11312–11319.
- Miller WE, McDonald PH, Cai SF, Field ME, Davis RJ & Lefkowitz RJ (2001). Identification of a motif in the carboxyl terminus of β -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J Biol Chem* **276**, 27770–27777.
- Mobini R, Staudt A, Felix SB, Baumann G, Wallukat G, Deinum J, Svensson H, Hjalmarson Å & Fu M (2003). Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against β_1 -adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* **20**, 345–350.
- Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C & Balligand JL (2001). Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* **103**, 1649–1655.
- Mori A, Miwa T, Sakamoto K, Nakahara T & Ishii K (2010). Pharmacological evidence for the presence of functional β_3 -adrenoceptors in rat retinal blood vessels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **382**, 119–126.

- Myslivecek J, Nováková M, Palkovits M, Krizanová O & Kvetnanský R (2006). Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci* **79**, 112–120.
- Nahmias C, Blin N, Elalouf JM, Mattei MG, Strosberg AD & Emorine LJ (1991). Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: Relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* **10**, 3721–3727.
- Nambi P, Peters JR, Sibley DR & Lefkowitz RJ (1985). Desensitization of the turkey erythrocyte β -adrenergic receptor in a cell-free system. *J Biol Chem* **260**, 2165–2171.
- Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg DA, Bouvier M & Marullo S (1993). The human β_3 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol* **43**, 548–555.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T & Christopoulos A (2003). International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**, 597–606.**
- Nikolaev VO, Bünemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Bu M & Engelhardt S (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β_1 -adrenergic but locally confined β_2 -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**, 1084–1091.
- Niu X, Watts VL, Cingolani OH, Sivakumaran V, Leyton-Mange JS, Ellis CL, Miller KL, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson KL, Paolucci N, Kass DA & Barouch LA (2012). Cardioprotective effect of β_3 -adrenergic receptor agonism. *J Am Coll Cardiol* **59**, 1979–1987.
- Noma T, Lemaire A, Naga Prasad S V., Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ & Rockman H a. (2007). β -Arrestin-mediated β_1 -adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* **117**, 2445–2448.
- O’Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ & Bouvier M (1989). Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* **264**, 7564–7569.
- O’Dowd BF, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG & Lefkowitz RJ (1988). Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β_2 -adrenergic receptor. Localization of regions involved in G-protein-receptor coupling. *J Biol Chem* **263**, 15985–15992.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS & Caron MG (1999). Association of β -arrestin with G-protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**, 32248–32257.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG & Barak LS (2000). Differential affinities of visual arrestin, β -arrestin1, and β -arrestin2 for G-protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**, 17201–17210.
- Oehme S, Mittag A, Schrodler W, Tarnok A, Nieber K & Abraham G (2015). Agonist-induced β_2 -adrenoreceptor desensitization and downregulation enhance pro-inflammatory cytokine release in human bronchial epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther* **30**, 110–120.
- Onorato JJ, Gillis ME, Liu Y, Benovic JL & Ruoho AE (1995). The β -adrenergic receptor kinase (GRK2) is regulated by phospholipids. *J Biol Chem* **270**, 21346–21353.
- De Paiva ACZ, de Lima Marson FA, Ribeiro JD & Bertuzzo CS (2014). Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the β_2 -adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy, Asthma Clin Immunol* **10**, 1–9.
- Pauwels RA, Löfdahl C-G, Postma DS, Tattersfield AE, O’Byrne P, Barnes PJ & Ullman A (1997). Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. *N Engl J Med* **337**, 1405–1411.
- Pitcher JA, Tesmer JJG, Freeman JLR, Capel WD, Stone WC & Lefkowitz RJ (1999). Feedback inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **274**, 34531–34534.

- Port JD, Hadcock JR & Malbon CC (1992a). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. *J Biol Chem* **267**, 8468–8472.
- Port JD, Huang L & Malbon C (1992b). β -Adrenergic agonists that down-regulate receptor mRNA up-regulate a Mr 35,000 protein(s) that selectively binds to β -adrenergic receptor mRNAs. *J Biol Chem* **267**, 24103–24106.
- Povsic TJ, Kohout TA & Lefkowitz RJ (2003). β -Arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 51334–51339.
- Prior SJ, Goldberg AP & Ryan AS (2011). *ADRB2* haplotype is associated with glucose tolerance and insulin sensitivity in obese postmenopausal women. *Obes (Silver Spring)* **19**, 396–401.
- Pronin AN & Benovic JL (1997). Regulation of the G-protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 3806–3812.
- Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ & Rockman HA (2003). Protein kinase A and G-protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates β_1 -adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* **278**, 35403–35411.
- Rathz DA, Brown KM, Kramer LA & Liggett SB (2002). Amino acid 49 polymorphisms of the human β_1 -adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol* **39**, 155–160.
- Reithmann C & Werdan K (1989). Noradrenaline-induced desensitization in cultured heart cells as a model for the defects of the adenylate cyclase system in severe heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **339**, 138–144.
- Revelli JP, Pescini R, Muzzin P, Seydoux J, Fitzgerald MG, Fraser CM & Giacobino JP (1991). Changes in β_1 - and β_2 -adrenergic receptor mRNA levels in brown adipose tissue and heart of hypothyroid rats. *Biochem J* **277**, 625–629.
- Ricquier D (2011). Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler : A historical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**, 1–7.**
- Rockman H a, Koch WJ & Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206–212.**
- Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J, Lefkowitz RJ & Koch WJ (1998). Expression of a β -adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7000–7005.
- Rohlfes EM, Daniel KW, Premont RT, Kozak LP & Collins S (1995). Regulation of the uncoupling protein gene (*UCP*) by β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. *J Biol Chem* **18**, 10723–10732.
- Ruiz-Gómez A & Mayor F (1997). β -adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with β -adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J Biol Chem* **272**, 9601–9604.
- Sato T, Kobayashi H, Nagao T & Kurose H (1999). Ser203 as well as Ser204 and Ser207 in fifth transmembrane domain of the human β_2 -adrenoceptor contributes to agonist binding and receptor activation. *Br J Pharmacol* **128**, 272–274.
- Scola AM, Loxham M, Charlton SJ & Peachell PT (2009). The long-acting β -adrenoceptor agonist, indacaterol, inhibits IgE-dependent responses of human lung mast cells. *Br J Pharmacol* **158**, 267–276.
- Seachrist JL, Anborgh PH & Ferguson SSG (2000). β_2 -adrenergic receptor internalization, endosomal sorting and plasma membrane recycling are regulated by Rab GTPases. *J Biol Chem*.
- Segal M, Markram H & Richter-Levin G (1991). Actions of norepinephrine in the rat hippocampus. *Prog Brain Res* **88**, 323–330.
- Seibold A, Williams B, Huang Z, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ & Clark RB (2000). Localization of the sites mediating desensitization of the β_2 -adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol*

Pharmacol **58**, 1162–1173.

- Sennitt MV, Kaumann AJ, Molenaar P, Beeley LJ, Young PW, Kelly J, Chapman H, Henson SM, Berge JM, Dean DK, Kotecha NR, Morgan HKA, Rami HK, Ward RW, Thompson M, Wilson S, Smith SA, Cawthorne MA, Stock MJ & Arch JRS (1998). The contribution of classical ($\beta_{1/2}$ -) and atypical β -adrenoceptors to the stimulation of human white adipocyte lipolysis and right atrial appendage contraction by novel β_3 -adrenoceptor agonists of differing selectivities. *J Pharmacol Exp Ther* **285**, 1084–1095.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O & Lefkowitz RJ (2006). β -Arrestin-dependent, G-protein-independent ERK1/2 activation by the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **281**, 1261–1273.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA & Lefkowitz RJ (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* **294**, 1307–1313.
- Shih M, Lin F, Scott JD, Wang HY & Malbon CC (1999). Dynamic complexes of β_2 -adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J Biol Chem* **274**, 1588–1595.
- Sibley DR, Peters JR, Nambi P, Caron MG & Lefkowitz RJ (1984). Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *J Biol Chem* **259**, 1982–1983.
- Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K & Lefkowitz RJ (1986). Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9408–9412.
- Soeder KJ, Snedden ShK, Cao W, Rocca GJ, Daniel KW, Luttrell LM & Collins S (1999). The β_3 -adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a G_i . *Biochemistry* **274**, 12017–12022.
- Stadel JM, Strulovici B, Nambi P, Lavin TN, Briggs MM, Caron MG & Lefkowitz RJ (1983). Desensitization of the β -adrenergic receptor of frog erythrocytes. *J Biol Chem* **258**, 3032–3038.
- Steinle JJ, Booz GW, Meininger CJ, Day JNE & Granger HJ (2003). β_3 -Adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J Biol Chem* **278**, 20681–20686.
- Sterin-Borda L, Bernabeo G, Ganzinelli S, Joensen L & Borda E (2006). Role of nitric oxide/cyclic GMP and cyclic AMP in β_3 -adrenoceptor-chronotropic response. *J Mol Cell Cardiol* **40**, 580–588.
- Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ & Inglese J (1994). Palmitoylation of G-protein-coupled receptor kinase, GRK6. *J Biol Chem* **269**, 27791–27794.
- Störk S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE & Jahns R (2006). Stimulating autoantibodies directed against the cardiac β_1 -adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* **152**, 697–704.
- Strader C, Sigal I & Dixon R (1989). Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* **3**, 1825–1832.**
- Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS & Dixon RA (1988). Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the β -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem* **263**, 10267–10271.
- 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 A activation. *J Biol Chem* **277**, 49212–49219.
- Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS & Kobilka B (2005). Probing the β_2 -adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem* **280**, 22165–22171.
- Tachibana H, Naga Prasad S V, Lefkowitz RJ, Koch WJ & Rockman HA (2005). Level of β -adrenergic receptor kinase 1 inhibition determines degree of cardiac dysfunction after chronic

- pressure overload-induced heart failure. *Circulation* **111**, 591–597.
- Tan S, Hall IP, Dewar J, Dow E & Lipworth B (1997). Association between β_2 -adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* **350**, 995–999.
- Tao J, Wang H & Malbon CC (2003). Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the β_2 -adrenergic receptor. *EMBO J* **22**, 6419–6429.
- Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullières Y, Amouyel P, Roizès G, Dorent R, Schwartz K & Komajda M (1999). Characterization of a unique genetic variant in the β_1 -adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1025–1032.
- Thomas RF, Holt BD, Schwinn D a & Liggett SB (1992). Long-term agonist exposure induces upregulation of β_3 -adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4490–4494.
- Thomsen M, Dahl M, Tybjærg-Hansen A & Nordestgaard BG (2016). β_2 -Adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, obesity, and diabetes: Comparison with *FTO*, *MC4R*, and *TMEM18* polymorphisms in more than 64,000 Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 1074–1079.
- Tran TM, Friedman J, Baameur F, Knoll BJ, Moore RH & Clark RB (2007). Characterization of β_2 -adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol* **71**, 47–60.
- Turnham RE & Scott JD (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA: History, function and physiology. *Gene* **577**, 101–108.**
- Tyagi P, Thomas CA, Yoshimura N & Chancellor MB (2009). Investigations into the presence of functional β_1 - , β_2 - and β_3 -adrenoceptors in urothelium and detrusor of human bladder. *Invest Urol* **35**, 76–83.
- Valiquette M, Bonin H, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ & Bouvier M (1990). Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β_2 -adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5089–5093.
- Vaughan DJ, Millman EE, Godines V, Friedman J, Tran TM, Dai W, Knoll BJ, Clark RB & Moore RH (2006). Role of the G-protein-coupled receptor kinase site serine cluster in β_2 -adrenergic receptor internalization, desensitization, and β -arrestin translocation. *J Biol Chem* **281**, 7684–7692.
- Vicario PP, Candelore MR, Schaeffer M, Kelly L, Thompson MG, Brady EJ, Saperstein R, Macintyre DE, Tota LM & Cascieri MA (1998). Desensitization of β_3 -adrenergic receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sci* **62**, 627–638.
- Vrydag W, Alewijnse AE & Michel MC (2009). Do gene polymorphisms alone or in combination affect the function of human β_3 -adrenoceptors? *Br J Pharmacol* **156**, 127–134.
- Wacker D, Fenalti G, Brown MA, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V & Stevens RC (2010). Conserved binding mode of human β_2 -adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* **132**, 11443–11445.
- Wachsmann DE, Kavalier JP, Sugár IP, Schachter EN, Gonsiorek W & Maayani S (1997). Kinetic studies of desensitization and resensitization of the relaxation response to β_2 -adrenoceptor agonists in isolated guinea pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 332–345.
- Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R & Pitschner HF (1995). Anti- β_1 -adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: Mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 397–406.
- Walsh DA, Perkins JP & Krebs EG (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763–3766.

- Wang T & Duan Y (2009). Ligand entry and exit pathways in the β_2 -adrenergic receptor. *J Mol Biol* **392**, 1102–1115.
- Wang Y, Arcangelis V De, Gao X, Ramani B, Jung Y & Xiang Y (2008). Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct β_2 -adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **283**, 1799–1807.
- Wang Y, Lauffer B, Zastrow M Von, Kobilka BK & Xiang Y (2007). N-Ethylmaleimide-sensitive factor regulates β_2 -adrenoceptor trafficking and signaling in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* **72**, 429–439.
- Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehmé R, Edwards PC, Leslie AGW, Schertler GFX & Tate CG (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a β_1 -adrenergic receptor. *Nature* **469**, 241–244.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG & Schertler FX (2008). Structure of a β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–491.
- Xiang Y, Devic E & Kobilka B (2002). The PDZ-binding motif of the β_1 -adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 33783–33790.
- Xiao R, Avdonin P, Zhou Y, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ & Lakatta EG (1999). Coupling of β_2 -adrenoceptor to G_i -proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* **84**, 43–52.
- Xu J, Paquet M, Lau AG, Wood JD, Ross CA & Hall RA (2001). β_1 -Adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). *J Biol Chem* **276**, 41310–41317.
- Yamakita M, Ando D, Tang S & Yamagata Z (2010). The Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with weight changes in obese Japanese men: A 4-year follow-up study. *J Physiol Anthropol* **29**, 133–139.
- Yang-Feng TL, Xue F, Zhong W, Cotecchia S, Frielle T, Caron MG, Lefkowitz RJ & Francke U (1990). Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1516–1520.
- Yu SS, Lefkowitz RJ & Hausdorff WP (1993). β -Adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* **268**, 337–341.
- Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM & Lefkowitz RJ (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to G_s and G_i . *J Biol Chem* **277**, 31249–31256.
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG & Ferguson SSG (1999). Cellular trafficking of G-protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* **274**, 10999–11006.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG & Ferguson SSG (1997). A central role for β -arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in β_2 -adrenergic receptor resensitization. *J Biol Chem* **272**, 27005–27014.
- Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L & Caron MG (1996). Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G-protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**, 18302–18305.
- Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T & Yazaki Y (1999). Both G_s - and G_i -proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* **274**, 9760–9770.