

# Arrestiny a jejich role v regulaci buněčných procesů

Fořtová M.<sup>1,2</sup>, Průša R.<sup>1</sup>, Zima T.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

## SOUHRN

Arrestiny jsou významné intracelulární proteiny regulující G-protein-spřaženou receptorovou (GPCR) signalizaci. Tvoří komplexy s většinou GPCRs (po jejich aktivaci navázáním agonisty a fosforylaci) a hrají klíčovou roli v procesech receptorové homologní desenzitizace, sekvestrace a downregulace, které vedou k terminaci aktivace G-proteinů. V lidském organismu je zastoupeno deset typů arrestinů náležících do dvou skupin: mezi zrakové/beta arrestiny a alfa arrestiny. Nedávno bylo zjištěno, že skupina zrakových/beta arrestinů (která je tvořena čtyřmi členy: rod arrestinem,  $\beta$ -arrestinem 1,  $\beta$ -arrestinem 2 a cone arrestinem) je odvozena od nově objevených alfa arrestinů. Označení „alfa“ je velmi výstižné, tato skupina arrestinů je fylogeneticky starší a název je komplementární k názvu skupiny beta. Rod cone arrestiny se nacházejí v buňkách sítnice, kde regulují funkci fotoreceptorů.  $\beta$ -arrestiny jsou ubikvitně vyjádřeny, jejich nejvyšší koncentrace byly zjištěny v mozku a ve slezině. Kromě tradiční role v desenzitizaci (a následujících procesech) podporují  $\beta$ -arrestiny též tvorbu signalizačních komplexů s tyrozinkinázou Src a s mitogenem-aktivovanými proteinkinázami, které umožňují G-protein-spřaženým receptorům signalizovat nezávisle na G-proteinech. V těchto kaskádách slouží jako „scaffolding“ a adaptorové proteiny a regulují buněčné procesy jako např. chemotaxi, apoptózu a metastázování.  $\beta$ -arrestiny se tak stávají lákavým terapeutickým cílem pro léčbu některých nádorových onemocnění (např. karcinomu prsu, plic, kolorekta), alergického astmatu, hypertenze a dalších nemocí.

**Klíčová slova:** arrestin, receptor spřažený s aktivací G-proteinů, tyrozinkináza, mitogenem-aktivovaná proteinkináza, apoptóza.

## SUMMARY

**Fořtová M., Průša R., Zima T.: Arrestins and their roles in regulation of cellular processes**

Arrestins are important intracellular proteins, multifunctional regulators of G-protein-coupled receptor (GPCR) signaling. They form complexes with most GPCRs (following agonist binding and phosphorylation of receptors) and play a central role in the processes of homologous desensitization, sequestration and downregulation of receptors, which lead to termination of G-protein activation. Humans have ten arrestin subtypes pertaining to two subfamilies, visual/beta arrestins and alpha arrestins. Visual/beta subfamily (which contains four members: rod arrestin,  $\beta$ -arrestin 1,  $\beta$ -arrestin 2 and cone arrestin) was branched from new finding alpha arrestins relatively recently. „Alpha“ fits because this subfamily is ancient/ancestral, and it complements the name of the beta class. The rod and the cone arrestins are expressed in the retina, where they regulate photoreceptor function. The  $\beta$ -arrestins are ubiquitously expressed proteins whose highest levels of expression are in the brain and spleen. Besides their role in desensitization (and following processes),  $\beta$ -arrestins promote the formation of signaling complexes with tyrosine kinase Src and mitogen-activated protein kinase cascades allowing G-protein-coupled receptors to signal independently from G-protein. They serve as scaffold and adaptor proteins in these cascades and regulate cellular processes such as chemotaxis, apoptosis, and metastasis. Thus, novel therapies focused on these proteins may prove useful in the treatment of some cancer disorders (for example breast, lung, and colorectal carcinomas), allergic asthma, hypertension, etc.

**Key words:** arrestin, G-protein-coupled receptor, tyrosin kinase, mitogen-activated protein kinase, apoptosis.

## I. Úvod

### 1. 1 Základní charakteristika arrestinů

Arrestiny jsou významné intracelulární proteiny, jejichž působení je úzce spjato s heptahelikálními receptory spřaženými s aktivací G-proteinů (G-protein-coupled receptors, GPCRs). Jejich název je odvozen od jejich nejdéle známé funkce – slovo „arrest“ v angličtině znamená „zastavit, zabrzdit, upoutat“; arrestiny „zastavují“ G-protein-dependentní buněčnou signalizaci. Arrestiny regulují buněčnou diferenciaci, proliferaci, migraci a apoptózu, čímž ovlivňují např. růst a vývoj organismu, ale i vznik zánětlivých či nádorových procesů [1–3].

V lidském organismu jsou zastoupeny dvě podskupiny arrestinů – alfa a beta. Označení podskupiny „beta“ není úplně přesné, náleží do ní dva  $\beta$ -arrestiny, ale také dva zrakové arrestiny. Označení „beta“ vyplynulo z interakce  $\beta$ -arrestinu 1 s „beta“ adrenergními receptory (viz dále). V literatuře je někdy pro podskupinu beta

arrestinů používáno přesnější označení „zrakové/beta arrestiny“ (což budeme užívat i v našem textu).

Podskupina „alfa“ je tvořena šesti arrestiny. O její existenci byla publikována studie teprve nedávno, v červenci 2008. Alfa arrestiny jsou fylogeneticky starší než zrakové/beta arrestiny, na rozdíl od nich jsou i v nepřítomnosti agonisty většinou asociovány s buněčnou membránou a jejich hlavní funkcí je zřejmě rekrutovat proteiny k aktivovaným GPCRs. Označení „alfa“ vzniklo dodatečně (na tuto nově objevenou podskupinu vlastně zbylo), ale velmi treffně. Na fylogeneticky starší alfa arrestiny navazují fylogeneticky mladší zrakové/beta arrestiny.

I nomenklatura jednotlivých typů arrestinů je nejednoznačná a značně složitá, oficiální názvy a zkratky (podle HUGO nomenklatury), synonyma, chromozomální lokalizace a rok objevu jsou uvedeny v tabulce 1 (tučně jsou zvýrazněny názvy, které budeme užívat v tomto článku). Podskupina alfa arrestinů je dosud relativně neprobádaná, v dalším textu se proto budeme věnovat pouze zrakovým/beta arrestinům [4].

**Table 1.** Official HUGO nomenclature names/symbols, other aliases and designations, chromosomal locations and years of discovery of arrestins

	Official symbols	Official names	Other aliases	Other designations	Chromosomal locations	Years of discovery
<b>Beta arrestins</b>	SAG	S-antigen, retina and pineal gland arrestin	ARRESTIN, DKFZp686D1084, DKFZp686L1383, S-AG	S-arrestin, retinal S-antigen, rod photoreceptor arrestin, <b>rod arrestin</b> , arrestin 1	2q37.1	1987
	ARRB1	Arrestin, beta1	ARB1, <b><math>\beta</math>-arr1</b> , formerly ARR1	Arrestin beta 1, <b>beta-arrestin 1</b> , arrestin 2, formerly arrestin 1	11q13	1990
	ARRB2	Arrestin, beta2	ARB2, BARR2, <b><math>\beta</math>-arr2</b> , DKFZp686L0365, formerly ARR2	Arrestin beta 2, <b>beta-arrestin 2</b> , arrestin 3, formerly arrestin 2	17p13	1992
	ARR3	Arrestin 3, (retinal) X arrestin	RP13-26D14.6, ARR3, cArr	<b>Cone arrestin</b> , arrestin C, retinal cone arrestin 3, C-arrestin, arrestin 4	Xcen-q21	1993
<b>Alpha arrestins</b>	ARRDC1	Arrestin domain containing 1	RP11-48C7.5, MGC40555	OTTHUMP0000022707	9q34.3	2008
	ARRDC2	Arrestin domain containing 2	CLONE24945, PP2703, ILAD1	–	19p13.11	2008
	ARRDC3	Arrestin domain containing 3	KIAA1376, TLIMP	thioredoxin-binding protein-2-like inducible membrane	5q14.3	2008
	ARRDC4	Arrestin domain containing 4	FLJ36045, DHR1	–	15q26.3	2008
	ARRDC5	Arrestin domain containing 5	–	–	19p13.3	2008
	TXNIP	Thioredoxin-interacting protein	EST01027, HHCPA78, THIF, VDUP1, TBP2	OTTHUMP0000015596, thioredoxin-binding protein 2, upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3	1q21.1	2008

Zrakové arrestiny (arrestin sítnicových tyčinek neboli rod arrestin a arrestin sítnicových čípků neboli cone arrestin) se nacházejí ve fotoreceptorových buňkách a regulují jejich funkci.  $\beta$ -arrestiny ( $\beta$ -arrestin 1 a  $\beta$ -arrestin 2) jsou ubikvitně vyjádřeny, jejich nejvyšší výskyt byl zjištěn v mozku a ve slezině a účastní se mnohých fyziologických i patologických procesů.  $\beta$ -arrestin 1 se nachází v cytoplasmě i v jádře (distribuce mezi těmito dvěma kompartmenty závisí na typu buněk),  $\beta$ -arrestin 2 a zrakové arrestiny především v cytoplasmě [1, 4, 5].

Arrestiny specificky vážou G-protein-spřážené receptory aktivované navázáním agonisty (v případě  $\beta$ -arrestinů) či působením světelného záření (v případě zrakových arrestinů) a následně fosforylované kinázami receptorů spřáženými s G-proteiny (G-protein-coupled receptor kinases, GRKs). Objev  $\beta$ -arrestinů souvisí se studiem právě těchto kináz v procesu  $\beta$ 2-adrenergní receptorové desenzitizace. Paradoxně bylo zjištěno, že se zvyšující se „čistotou“ a specifickou aktivitou GRK2 kinázy k aktivovanému receptoru klesá její schopnost inaktivovat vazbu receptor-G-protein.  $\beta$ 2-adrenergní receptorová desenzitizace byla obnovena působením retinálního rod arrestinu, což vedlo k hypotéze, že musí existovat další „arrestin-like“ proteiny. „Kofaktor“ esenciální pro GRK2 dependentní desenzitizaci  $\beta$ 2-adrenergního receptoru byl následně nazván  $\beta$ -arrestinem 1. „Beta“ právě podle jejich interakce s „beta“ adrenergními receptory. Dalším výzkumem

bylo potvrzeno, že navázání arrestinu k aktivovanému a fosforylovanému GPCR prostorově blokuje interakci GPCR s G-proteinem, tím dojde k terminaci G-protein-dependentní signalizace.

Receptor-ligand-arrestinové komplexy jsou následně endocytózou vnořeny do buňky. Tento proces se označuje jako receptorová sekvestrace nebo internalizace a je důležitý nejen pro tlumení GPCR signalizace při dlouhodobém působení podnětu, ale také pro receptorovou resenzitizaci a downregulaci.

$\beta$ -arrestiny (na rozdíl od zrakových arrestinů) se významně podílejí také na přenosu nitrobuněčných signálů. Vážou se např. k tyrozinovým kinázám ze skupiny Src nebo ke komponentám z ERK1/2 a JNK 3 MAP kinázových kaskád, rekrutují je k agonisty obsazeným GPCRs a následně formují komplexy:  $\beta$ -arrestin-kináza-agonistou obsazený receptor.  $\beta$ -arrestin-Src komplexy usnadňují endocytózu GPCR, spouštějí kaskádu dějů vedoucích k aktivaci ERK 1/2 (a k následné proliferaci, diferenciaci a růstu buňky) a zprostředkovávají degranulaci neutrofilů. V ERK1/2 a JNK3 kinázových kaskádách fungují  $\beta$ -arrestiny jako jakási kostra (anglicky „scaffold“) usnadňující stupňovitou aktivaci jednotlivých MAP kináz rezultující v buněčnou proliferaci či apoptózu.

Úloha  $\beta$ -arrestinů v GPCR signalizaci je tedy dvojitá: fungují jako terminátory G-protein-závislých signálních procesů a jako potenciální přenašeči buněčných signálů vycházejících z GPCRs [1, 2].

## 1. 2 Struktura arrestinů

Arrestiny jsou složeny ze dvou hlavních domén (N a C) o struktuře sedmkrát stočeného  $\beta$ -skládaného listu, ze spojovací části obsahující fosfát vázající doménu, která tvoří část polárního jádra proteinu, a z koncových domén R1 (na N konci) a R2 (na C konci molekuly proteinu). N-doména (aminokyselinové zbytky 8–180) obsahuje oblasti, jež jsou důležité pro rozpoznání světlem aktivovaného rodopsinu v případě zrakových arrestinů a aktivovaných GPCRů v případě  $\beta$ -arrestinů. C-doména (aminokyselinové zbytky 188–362) je zodpovědná za sekundární receptorové rozpoznávání.

Krystalograficky identifikované N a C domény přibližně korespondují s A a B doménami identifikovanými funkčně. Jeden nebo více PXXP vazebných motivů lokalizovaných v A doméně  $\beta$ -arrestinu 1 zprostředkovává vazbu k c-Src-SH3 doméně. V B doméně se nachází rozpoznávací oblast pro inozitolové fosfolipidy (IP6), MAP kinázové rozpoznávací sekvence (RRSLHL)  $\beta$ -arrestinu 2 interagující s MAP kinázou JNK3, a eventuálně s dalšími MAP kinázami (MAPKs). R2 doména obsahuje vazebný motiv LIEF pro klatrin, vazebný motiv RXR pro  $\beta$ 2-adaptin (tj. podjednotku klatrin asociovaného proteinového komplexu AP2) a hlavní místo fosforylace  $\beta$ -arrestinu 1 (S412). Méně přesně jsou definované interakce mezi  $\beta$ -arrestinem 1 (Ak 1–185) a Ask1, Src-SH1, a případně dalšími MAPKKKs,  $\beta$ -arrestinem 1 a NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) či  $\beta$ -arrestinem 2 a Mdm2. Interakce mezi C-terminálním koncem (R2) a spojovací fosfát vázající oblastí udržuje arrestin v inaktivním stavu. Je přerušena při navázání receptoru a umožňuje arrestin vázat k fosforylovanému receptoru s vysokou afinitou.

$\beta$ -arrestin 1 a  $\beta$ -arrestin 2 vykazují vysoký stupeň homologie (až 80%), homologie  $\beta$ -arrestinů se zrakovými arrestiny je podstatně nižší [1, 6] – obrázek 1.

## 2 Arrestiny v signálních kaskádách

### 2. 1 Arrestiny jako signální terminátory

Déletrvajícím působením agonisty na GPCR vede postupně k zeslabení jeho účinku a úbytku přenosu buněčných signálů. Ačkoliv je vazebné místo receptoru obsazeno ligandem, signál přestane být přenášen dále. Je to důsledek sérií událostí, které můžeme rozdělit do třech zřetelných procesů. Nejdříve nastává receptorová desenzitizace, dalším dějem v časové posloupnosti je sekvestrace (internalizace) receptoru, která může nakonec vyústit v celkové snížení počtu (downregulaci) receptorů.

#### 2. 1. 1 Arrestiny v GPCR desenzitizaci

Pro pojem desenzitizace je vymezen časový úsek po začátku aktivace receptoru agonistou trvající několik sekund. Desenzitizace je iniciována fosforylací receptoru proteinkinázami, které fosforylují GPCRů na serinových a treoninových zbytcích v jejich třetí intracelulární klíče a na jejich karboxylovém konci. Rozlišujeme 2 typy desenzitizace – homologní a heterologní.

V případě heterologní desenzitizace je fosforylace receptorů proteinkinázami (konkrétně kinázami aktivovanými druhými posly – cAMP-dependentní proteinkinázou A (PKA) a proteinkinázou C (PKC)) dostačující k přerušení efektivní vazby receptoru a G-proteinu; arrestiny se procesu neúčastní. Obsazení cílových GPCRů specifickým agonistou není nutné, vazba jednoho ligandu znecitlivuje cílovou buňku vůči jinému ligandu.

Oproti tomu, homologní desenzitizace je iniciována fosforylací receptorů GRKs (kinázami receptorů spřažených s G-proteiny) a následující vazbou arrestinů, v tomto případě ligand znecitlivuje cílovou buňku pouze vůči sobě samému. Je známo sedm typů GRKs.

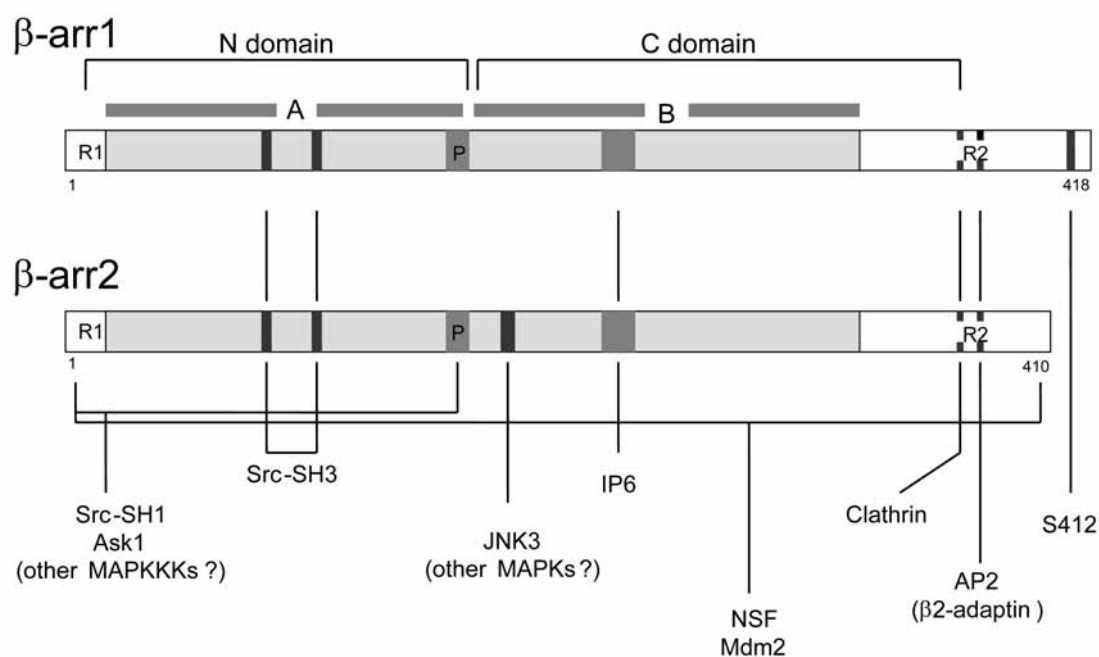


Fig. 1. Putative domain architecture of  $\beta$ -arrestins [Adapted from Luttrell and Lefkowitz, 2002]

Rodopsinová kináza (GRK 1) a opsinová kináza sítnicových čípků (GRK 7) jsou retinální kinázy spojené s regulací rodopsinových fotoreceptorů, GRK2-GRK6 nejsou vázány na konkrétní typ buněk. Směrování všech GRKs k buněčné membráně je zprostředkováno jejich C-terminální koncovou doménou [1, 7] – obrázek 2.

nách, zatímco celkový počet receptorů (včetně těch, které jsou ve váčcích) je nezměněn. Naproti tomu u downregulace nalezneme snížený i celkový počet receptorů (viz dále). GRK fosforylace a následná vazba arrestinu na receptor usnadňuje endocytózu mnoha GPCRs (např. receptory  $\beta$ 2-adrenergní, angiotenzinu II typ 1a, m2-m5 muskarinové cholinergní, endotelinu

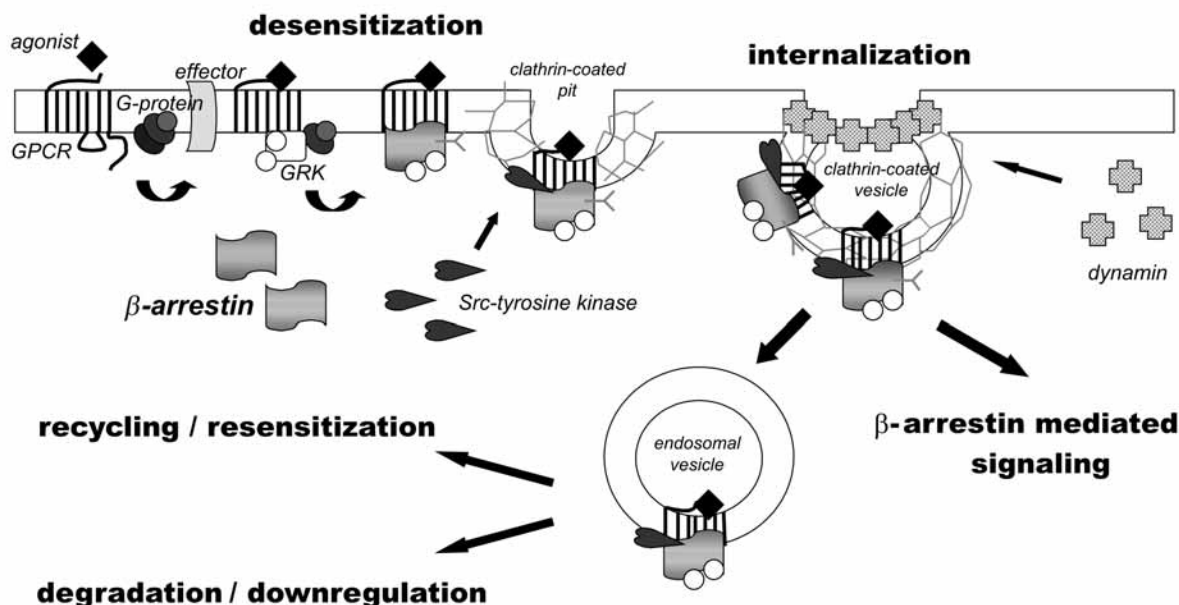


Fig. 2. GPCR intracellular trafficking [Adapted from Luttrell and Lefkowitz, 2002]

Jak již bylo zmíněno v úvodu, GRK fosforylace sama o sobě (v nepřítomnosti arrestinů) k ukončení aktivace G-proteinů receptorem nestačí. Úloha GRK fosforylace spočívá především ve zvýšení afinity receptoru pro arrestiny. V pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že fosforylace  $\beta$ 2-adrenergních receptorů GRK2 kinázou zvýší 10–30krát afinitu  $\beta$ -arrestinu 1 k receptoru.

K homologní desenzitizaci receptoru vede právě vazba arrestinu k receptorovým doménám a G-proteinům. Arrestin může interagovat s fosforylovaným receptorem až po přerušení vazby mezi C-terminálním koncem a fosfát vázající oblastí (jež udržuje arrestin v inaktivním stavu, viz dříve).

Význam arrestinů v regulaci GPCR funkce nepřímo potvrzují pokusy na  $\beta$ -arrestin knockoutovaných myších. Například homozygotní  $\beta$ -arrestin 1 knockoutované myši jsou vývojově normální a projevují normální klidové srdeční parametry (srdeční obrát, krevní tlak a ejekční frakci levé komory). Stimulace  $\beta$ -adrenergních receptorů však způsobí přehnanou hemodynamickou odpověď, což nasvědčuje narušené  $\beta$ -adrenergní receptorové desenzitizaci [1].

### 2. 1. 2 Arrestiny v GPCR sekvestraci (internalizaci, endocytóze)

Receptorová sekvestrace nastává pomaleji než desenzitizace, dochází k ní až po několika minutách od začátku aktivace receptoru agonistou. Biochemicky je charakterizována jako stav, v němž je možné zjistit pouze snížení počtu receptorů na buněčných membrá-

A, D2-dopaminové, folitropinové, monocyte chemoattractant protein-1, CCR-5 a CXCR 1) [1, 7].

Oblasti důležité pro klatrin-dependentní endocytózu GPCRs se nacházejí v C-terminálním (R2) konci molekuly zrakových i  $\beta$ -arrestinů. V případě  $\beta$ -arrestinů se jedná o dva vazebné motivy – LIEF a RXR sekvenci. LIEF sekvence je lokalizována mezi Ak reziduy 374 a 377 a interaguje s oblastí Ak 89 až 100 v N-terminální doméně klatrinového těžkého řetězce. Prostřednictvím RXR sekvence, která je lokalizována mezi reziduy 394 a 396, se  $\beta$ -arrestiny vážou k  $\beta$ 2-adaptinové podjednotce heterotetramerického AP2 komplexu. AP2 komplex se váže ke klatrinu, dynaminu a EPS-15 a je spojený s iniciací formace klatrinem pokrytých jamek. Pro mechanismus endocytózy jsou dále důležité interakce  $\beta$ -arrestinů s fosfoinozitydy a interakce  $\beta$ -arrestinu 1 s NSF. GTPáza dynamin odštěpí klatrinem pokryté jamky od cytoplazmatické membrány [1, 8] – viz obrázek 2.

Funkce  $\beta$ -arrestinu 1 v procesu endocytózy je regulována jeho fosforylací. Cytoplazmatický  $\beta$ -arrestin 1 je fosforylován na S412. Při translokaci k membráně je rychle defosforylován. S412D mutanta  $\beta$ -arrestinu 1 napodobuje fosforylovaný stav, špatně se váže ke klatrinu, a tím inhibuje sekvestraci receptoru. K zajištění endocytózy je proto nutná defosforylace S412 oblasti.

Oproti tomu funkce  $\beta$ -arrestinu 2 není regulována fosforylací, ale posttranslační modifikací po navázání k receptoru. Nedávno bylo zjištěno, že oba  $\beta$ -arrestiny



i některé receptory (např.  $\beta$ 2-adrenergní, V2-vazopresinové,  $\delta$ -opioidní a IGF-1) můžou prodělavat v odpovědi na navázání agonisty rychlou  $\beta$ -arrestin-dependentní ubikvitinaci. Ubikvitinace  $\beta$ -arrestinů,  $\delta$ -opioidních a IGF-1 receptorů je katalyzována E3 ubikvitin ligázou Mdm2, ubikvitinace  $\beta$ 2-adrenergních a V2-vazopresinových receptorů dosud neidentifikovanou ligázou. Ubikvitinace  $\beta$ -arrestinu je zřejmě potřebná pro receptorovou internalizaci, zatímco ubikvitinace receptoru je spojená s jeho degradací [1, 9].

Funkční rozdíly mezi  $\beta$ -arrestinem 1 a  $\beta$ -arrestinem 2 byly studovány na fibroblastových liniích odvozených z myších embryí (MEFs) postrádajících buď jeden, anebo oba  $\beta$ -arrestiny. Desenzitizace  $\beta$ 2-adrenergních a angiotenzin AT1a receptorů byla snížena v  $\beta$ -arrestin 1 i  $\beta$ -arrestin 2 knockoutovaných buňkách a dále redukována v dvojitě knockoutovaných buňkách. V indukcii desenzitizace jsou obě izoformy pravděpodobně stejně efektivní. Jinak tomu bylo v případě receptorové sekvestrace.  $\beta$ 2-adrenergní receptorová sekvestrace byla významně redukována pouze v  $\beta$ -arrestin 2 a double-knockoutovaných buňkách, v  $\beta$ -arrestin 1 knockoutovaných buňkách ovlivněna nebyla. Další pozorování potvrdila cca 100krát větší účinnost  $\beta$ -arrestinu 2 oproti  $\beta$ -arrestinu 1 v procesu  $\beta$ 2-adrenergní receptorové endocytózy. AT1a receptorová sekvestrace byla minimálně ovlivněna v  $\beta$ -arrestin 1 knockoutovaných buňkách a významně snížena pouze v double-knockoutovaných buňkách. Pro AT1a receptorovou sekvestraci je tedy dostačující pouze jeden  $\beta$ -arrestin [1, 2].

### 2. 1. 3 Arrestiny v GPCR downregulaci a resenzitizaci

Při dlouhodobém působení podnětu (trvá-li hodiny až dny) se sníží celkový počet receptorů – nastává downregulace. Z dosud popisovaných buněčných procesů regulujících GPCR signalizaci je downregulace zatím nejméně pochopená. Za asistence arrestinů dochází k přesunu agonistou obsazených receptorů z buněčného povrchu do endocytózových vezikul a k jejich třídění buď pro degradaci, anebo recyklaci zpět k buněčné membráně (neboli resenzitizaci). Je to velmi důležitý mechanismus regulace počtu receptorů a uplatní se přinejmenším v časných stádiích downregulace (viz obr. 2). V pozdějších stádiích dochází k regulaci především na transkripční a posttranskripční úrovni (snížením rychlosti transkripce genu nebo ovlivněním stability mRNA pro příslušný receptor).

K resenzitizaci (recyklaci) GPCRs může dojít až po jejich defosforylaci (GPCR-specifickou proteinfosfatázou PP2A) a disociaci od ligandu. K těmto procesům dochází v acidifikovaných endozomálních vezikulách. V další fázi se defosforylované GPCRs navracejí ve vznikajících recyklačních vezikulách k buněčné membráně. Znovuobjevení receptorů na povrchu membrán není závislé na proteosyntéze, recyklace znamená jednak nižší energetickou náročnost (než by představovala proteosyntéza), jednak je tím umožněna rychlejší reaktivace desenzitizovaného receptoru [1, 2, 7].

GPCRs můžeme rozdělit podle jejich rozdílného chování po internalizaci do dvou tříd. **Receptorová**

**třída A** zahrnuje  $\beta$ 2 a  $\alpha$ 1B-adrenergní,  $\mu$ -opioidní, endotelinové a dopaminové D1A receptory. Tyto receptory se vážou k  $\beta$ -arrestinu 2 s vyšší afinitou než k  $\beta$ -arrestinu 1 a nevážou se k vizuálním arrestinům. Jejich interakce s  $\beta$ -arrestiny je přechodná. Při internalizaci receptoru komplex receptor- $\beta$ -arrestin disociuje, receptor přechází v endozomální pool,  $\beta$ -arrestin recykluje k plazmatické membráně. **Receptorová třída B**, reprezentovaná angiotenzin AT1a, neurotensin 1, vazopresin 2, tyreotropin uvolňující hormon a neurokinin NK-1 receptory, se váže k  $\beta$ -arrestinu 1 a  $\beta$ -arrestinu 2 se stejnou afinitou a interaguje i s vizuálními arrestiny. Tyto receptory tvoří stabilní komplexy s  $\beta$ -arrestiny; komplex receptor- $\beta$ -arrestin se internalizuje jako jednotka, která přechází do endozomů.

Stabilita receptor- $\beta$ -arrestinových komplexů je zakódována v C-terminálním konci receptoru (v oblastech bohatých na serinové a treoninové aminokyseliny) a v C-koncové oblasti  $\beta$ -arrestinu. Záměna C-terminálního konce těchto dvou receptorových tříd a cílené mutace v C-terminální oblasti arrestinu kompletně obrátí vzorec defosforylace a recyklace, receptory třídy A se začnou chovat jako receptory třídy B a naopak.

Osud internalizovaného receptoru určuje právě stabilita interakce receptoru a  $\beta$ -arrestinu.  $\beta$ 2-adrenergní receptor (z třídy A) je rychle defosforylován a recyklován do plazmatické membrány, zatímco V2-vazopresinový receptor (z třídy B) se recykluje pomaleji. Formování přechodného komplexu receptor- $\beta$ -arrestin tudíž podporuje rychlou defosforylaci a návrat do plazmatické membrány, zatímco tvorba stabilního komplexu receptor- $\beta$ -arrestin zpomaluje resenzitizaci a může podporovat cílení receptoru k jeho degradaci [10].

### 2. 2 $\beta$ -arrestiny jako přenašeči signálů

Výzkum na kvasinkách prokázal, že  $\beta$ -arrestiny hrají roli i v buněčné signalizaci. Interagují přímo se Src rodinou tyrozinových kináz a s komponentami z ERK1/2 a JNK3 MAP kinázových kaskád.  $\beta$ -arrestiny tedy „přepínají“ G-protein-dependentní signalizaci na G-protein-independentní a tím určují, jakým směrem se bude buněčná signalizace po navázání ligandu ubírat [1, 11].

#### 2. 2. 1 Interakce $\beta$ -arrestinů se Src kinázami

$\beta$ -arrestiny se mohou přímo vázat ke kinázám ze skupiny Src a rekrutují je k agonistou obsazenému GPCR. Stimulace receptorů (např.  $\beta$ 2-adrenergních v HEK-293 buňkách, neurokinin-1 v KNRK buňkách, CXCR-1 v neutrofilech) spouští přesun receptorů s navázanými  $\beta$ -arrestiny a Src kinázami do klatrinem potažených jamek. Proteinový komplex obsahující aktivovanou Src kinázu,  $\beta$ -arrestin a receptor je zapojený do několika GPCR-mediovaných signalizačních událostí: tyrozinové fosforylace dynaminu, Ras-dependentní aktivace ERK MAP kinázové kaskády a stimulace degranulace neutrofilů (viz obr. 2).

Vazba Src kinázy k  $\beta$ -arrestinu 1 je zprostředkována z velké části interakcí mezi Src homologní (SH) 3 doménou kinázy a na prolin bohatými PXXP motivy

lokalizovanými v reziduích 88–91 a 121–124 v N doméně  $\beta$ -arrestinu 1. Druhé hlavní místo interakce tvoří N-terminální část katalytické domény (SH1) Src kinázy a další epitopy lokalizované v N-terminálních 185 Ak reziduích  $\beta$ -arrestinu 1 [1, 2] – viz obrázek 1.

## 2. 2. 2 $\beta$ -arrestiny jako „kostry“ MAP kinázových kaskád

MAP kinázy (mitogenem aktivované proteinkinázy) patří do rodiny vývojově konzervovaných serin/treoninových kináz, které jsou spojené s transdukcí signálů regulujících buněčný růst, dělení, diferenciaci a apoptózu.

Savčí buňky obsahují přinejmenším tři hlavní třídy MAP kináz: ERK (extracelulárním signálem regulovaná kináza), JNK (c-Jun N-terminální kináza také známá jako stresem aktivovaná proteinkináza, SAPK) a p38/HOG1 MAP kinázy. ERK cesta je důležitá pro kontrolu přechodu G0-G1 fáze buněčného cyklu, správný průběh buněčné mitózy nebo meiózy, a tedy pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. JNK/SAPK a p38/HOG1 MAP kinázy jsou spojeny s regulací zastavení buněčného růstu, apoptózy a aktivací imunitních a retikuloendoteliálních buněk v odpovědi na rozličné stresové vlivy.

Aktivace MAP kináz probíhá kaskádovitě. Každá MAPK je aktivována fosforylací předcházejícími kinázami ze skupiny MAPKK (MAP kináz-kináz neboli MKK či MEK) a ty jsou aktivovány MAPKKK (MAP kinázami-kinázami-kinázami neboli MKKK či MAP3K). Například v ERK1/2 kaskádě proximální kinázy Raf-1 a B-Raf (MAPKKK) fosforylují a aktivují treonin/tyrozinové kinázy MEK1 a MEK2 (MAPKK), které postupně fosforylují a aktivují ERK1/2. Aktivované MAP kinázy fosforylují pestrou škálu membránových, cytoplazmatických, jaderných a cytoskeletálních substrátů, translokují se k jádru a zde fosforylují a aktivují jaderné transkripční faktory spojené s DNA syntézou a buněčným dělením.

V mnoha případech je aktivace MAP kinázových kaskád kontrolována navázáním kináz ke „scaffolding“ proteinům, jež fungují jako kostra či lešení v tomto postupném aktivačním procesu. Scaffolding proteiny zastávají v buňkách přinejmenším tři funkce: zvyšují účinnost signalizace mezi následnými kinázami v fosforylační kaskádě; zajišťují signalizační přesnost tlumením křížové komunikace mezi paralelními MAP kinázovými kaskádami a cílí MAP kinázy do specifických subcelulárních lokalizací.

Tyto „scaffolding“ vlastnosti byly objeveny právě u  $\beta$ -arrestinů. Stimulace proteinázou aktivovaného receptoru 2 (PAR2) v KNRK buňkách či angiotenzinového receptoru AT1a v HEK293 a COS-7 buňkách indukuje tvorbu multiproteinových komplexů obsahujících internalizovaný receptor,  $\beta$ -arrestin, Raf-1, MEK a aktivovanou ERK1/2.

$\beta$ -arrestin 2 je zapojen i v JNK3 MAP kinázové kaskádě. JNK3 je izoforma specifická pro nervovou tkáň. Po stimulaci AT1a receptorů formuje  $\beta$ -arrestin 2 komplexy s MAPKKK Ask1 (apoptotické signály regulující kinázou 1), MAPKK MKK4 a JNK3 (ale ne

s JNK1 nebo JNK2). Ask1 se váže k N-konci  $\beta$ -arrestinu 2, zatímco JNK3 vazba je zprostředkována RRSLHL motivem v C-terminální oblasti  $\beta$ -arrestinu 2. Tento motiv není přítomen v  $\beta$ -arrestinu 1, ale byl identifikován v několika dalších MAPK vázajících proteinech.

Schopnost  $\beta$ -arrestinů kontrolovat jak aktivitu, tak i prostorovou distribuci MAP kináz má důležité funkční důsledky. Mnoho GPCRs souběžně používá více rozdílných mechanismů k aktivaci MAP kináz. Například AT1a receptor může aktivovat ERK1/2 nejen cestou  $\beta$ -arrestin-dependentní dráhy, ale také pomocí G-protein-dependentních signálů a zkříženou komunikací s klasickým receptorem tyrozinových kináz. Zkřížená komunikace mezi GPC a EGF receptory vysvětluje proliferativní odpověď na GPCR stimulaci v mnoha systémech.

Aktivovaná ERK 1/2 v komplexu s  $\beta$ -arrestinem 1 (stejně jako další aktivované MAP kinázy, viz dříve) fosforyluje nejen nukleární transkripční faktory, ale také substráty cytoplazmatické membrány, cytoplazmatické a cytoskeletální. Tyto komplexy zřejmě také specificky cílí ERK1/2 k nenukleárním intracelulárním substrátům, ty jsou ERK 1/2 následně fosforylovány – např. fosforylovaný cytozolový protein p90RSK spojený s transkripční regulací obratem přenáší signály do jádra. Tento mechanismus představuje alternativní cestu transkripce následující aktivaci GPCR, transkripční události mediované přímo nukleárním poolem ERK1/2 jsou v tomto modelu potlačeny [1, 2].

## 2. 3 Význam arrestinů při regulaci ubikvitinace a apoptózy

$\beta$ -arrestiny ovlivňují činnost onkoproteinu Mdm2 (mouse double minute 2), který funguje jako E3-ubikvitinligáza proteinu p53,  $\beta$ -arrestinů (vzájemné vztahy Mdm2 a  $\beta$ -arrestinů jsou tedy složitě propojeny), a dokonce i Mdm2 (za určitých podmínek Mdm2 funguje jako „autoubikvitinligáza“); přenáší Mdm2 a další E3-ubikvitinligázy k receptorům (což vede k proteazomální destrukci receptorů) [9, 12, 13].

Proces ubikvitinace (syn. ubikvitinylace) byl zmapován v poměrně nedávné době. A. Hershko, I. Rose a A. Ciechanover se jím zabývali od konce 70. let minulého století, v roce 2004 získali za tento objev Nobelovu cenu za chemii. Ubikvitinace je posttranslační modifikace proteinu, která spočívá v připojení polyubikvitinu k proteinu kovalentní vazbou. Probíhá mechanismem vícestupňové kaskády, která slouží k označení proteinů pro rozklad v proteazomech.

Enzym E1 aktivuje C-konec malého polypeptidu ubikvitinu (76 Ak) a vzniká první meziproduct – thiolový ester E1 – ubikvitin. Aktivovaný ubikvitin je potom přemístěn z E1 na thiolovou skupinu jednoho z konjugčních enzymů E2 opět za vzniku thioesterové vazby. Ve třetím stupni se připojí E3-ubikvitinligáza, která specificky rozpozná substrát. C-koncový glycin ubikvitinu je potom kovalentní izopeptidovou vazbou připojen k  $\epsilon$ -aminoskupině lyzinového zbytku substrátu. V připojení dalších molekul ubikvitinu hraje úlohu elongační faktor E4. Teprve po připojení minimálně čtyř molekul ubikvitinu k substrátu dojde k rozpoznání substrátu

proteazomem a substrát je degradován. Enzym E1 (který aktivuje ubikvitin) je pouze jeden, konjugačních enzymů E2 je více než 40. E3-ubikvitinligázy jsou velmi početnou heterogenní skupinou proteinů (přes 500 proteinů) [14].

E3-ubikvitinligázy se dělí na tři skupiny podle struktury a způsobu rozpoznání substrátu. Onkoprotein Mdm2 náleží do skupiny RING („really interesting new gene“) finger-dependentních E3-ubikvitinligáz a je klíčovým regulátorem proteinu p53. Tumor supresorový gen TP53 a jeho produkt protein p53 zastávají velmi důležitou úlohu při regulaci buněčného cyklu. Je-li jaderná DNA nějakým způsobem poškozena, pozastaví buněčné dělení a aktivací dalších mechanismů zajistí buď opravu DNA, nebo navodí apoptózu. Tím brání vzniku a růstu nádorů.

Mdm2 a p53 jsou propojeny autoregulačním zpětně vazebným mechanismem – transkripce Mdm2 genu je stimulována aktivací p53. Mdm2/p53, zpětněvazebná smyčka, je regulována interakcemi Mdm2 s několika buněčnými proteiny (např. s ARF, Tsg101, MdmX, Rb a také s  $\beta$ -arrestinem 2), kdy dochází buď ke změně v buněčné distribuci Mdm2, ke změně stability Mdm2, nebo k inhibici ligázové aktivity Mdm2.

Mdm2 je nejvíce obsažen v jádře (kde kontroluje funkci p53), v cytoplazmě se nachází v mnohem nižších koncentracích a pouze minimálně je detekován v plazmatické membráně (kde interaguje s GPCRs). Jak již bylo zmíněno výše,  $\beta$ -arrestin 2 je významným vazebným partnerem onkoproteinu Mdm2, moduluje jeho subcelulární distribuci a ligázovou aktivitu. Do vazebné interakce vstupuje N-konec  $\beta$ -arrestinu 2 (1–185 Ak) a centrální oblast Mdm2 (vazebné místo pro  $\beta$ -arrestin 2 sousedí s RING finger doménou Mdm2, která je nezbytná pro ubikvitin ligázovou aktivitu pro samotný Mdm2 a pro p53). Po aktivaci GPCRs extracelulárními signály se síla této interakce zvyšuje, dochází ke změně distribuce Mdm2, Mdm2 se transportuje z jádra směrem do cytoplazmy a k plazmatické membráně.

Důsledkem  $\beta$ -arrestin 2/Mdm2 interakce je jednak podpora ubikvitinace  $\beta$ -arrestinu 2 a asistence při internalizaci GPCRs, jednak regulace Mdm2/p53 zpětněvazebné smyčky (omezení Mdm2 funkce a následná redukce ubikvitinace a degradace p53, omezení autoubikvitinace Mdm2).  $\beta$ -arrestin 2 tedy v návaznosti na GPCRs aktivaci zvyšuje p53-zprostředkovanou apoptózu a tímto mechanismem propojuje GPCR a p53 signalizační dráhy [12, 13].

Teprve v nedávné době bylo zjištěno, že nukleocytoplazmatický transport onkoproteinu Mdm2 je zprostředkován interakcí s oligomery  $\beta$ -arrestinu 2 stabilizovanými inozitol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfátem (IP6). Oproti tomu s GPCRs interagují monomerní  $\beta$ -arrestiny. V minulosti byly  $\beta$ -arrestin oligomery považovány za klidový biologicky inaktivní stav. Mutace IP6 vázajících míst poškodí oligomerizaci, redukuje interakci s Mdm2 a inhibuje p53-dependentní antiproliferativní (proapoptotický) efekt  $\beta$ -arrestinu 2. Intracelulární koncentrace oligomerů  $\beta$ -arrestinu 2 tak kontroluje buněčné přežití a proliferaci [15].

$\beta$ -arrestin 2 podporuje apoptotické děje též dalšími mechanismy nesouvisejícími s ovlivněním onkoproteinu Mdm2. Jak již bylo popsáno výše,  $\beta$ -arrestiny fungují také jako „scaffolding“ proteiny MAP kinázových kaskád a v návaznosti na GPCRs stimulaci spouští kompletování MAP kinázového komplexu Ask1-MKK4-JNK3-agonistou obsazený receptor –  $\beta$ -arrestin 2. Po receptorové internalizaci se komplexy dostávají do endozomálních vezikul a následuje aktivace JNK3 kinázy a stimulace apoptózy [16].

$\beta$ -arrestin 2 významně ovlivňuje interakce transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a jeho inhibitoru I $\kappa$ B. V klidovém stavu se faktor NF- $\kappa$ B nachází hlavně v cytoplazmě a je vázán ke svému specifickému inhibitoru I $\kappa$ B. Tato vazba maskuje sekvence nutné pro transport NF- $\kappa$ B do jádra. Infekční, zánětlivé a stresové podněty (např. TNF- $\alpha$ , LPS, IL-1 $\beta$ ) i UV záření spouští fosforylaci I $\kappa$ B inhibitoru – kasein kinázou 2 (CK2) v případě UV záření a I $\kappa$ B-kinázovým komplexem (IKK) v případě většiny ostatních stimulů. Fosforylovaný I $\kappa$ B je následně ubikvitinován a degradován v proteazomu. Faktor NF- $\kappa$ B je uvolněn z vazby ke svému inhibitoru, tímto je aktivován a translokován do jádra, kde řídí transkripci genů pro řadu antiapoptotických proteinů, cytokinů a jejich receptorů, proteinů ovlivňujících proliferaci buněk a pro adhezivní molekuly a enzymy zúčastněné v zánětlivém procesu [17, 18].

$\beta$ -arrestin 2 interaguje s I $\kappa$ B, brání tak jeho fosforylaci a degradaci, a znemožní aktivaci NF $\kappa$ B.  $\beta$ -arrestin 2 obsahuje dvě vazebné oblasti pro I $\kappa$ B $\alpha$  (mezi Ak reziduy 1–19 a 186–240), interakce je umožněna díky pozitivně nabitým Ak v těchto oblastech. Síla této interakce je významně snížena po fosforylaci především Ser361 a Thr383  $\beta$ -arrestinu 2 kinázou CK2. UV záření vyvolá zvýšení fosforylační aktivity CK2 jak směrem k I $\kappa$ B $\alpha$ , tak k  $\beta$ -arrestinu 2. Fosforylace  $\beta$ -arrestinu 2 tedy zruší supresi NF $\kappa$ B aktivace, NF $\kappa$ B může být translokován do jádra a zde aktivovat antiapoptotické děje. Na druhou stranu, stimulace  $\beta$ 2-adrenergických receptorů podporuje defosforylaci  $\beta$ -arrestinu 2, tím je zvýšena síla interakce  $\beta$ -arrestin 2 – I $\kappa$ B $\alpha$ , citlivost buněk k UV-indukované programované buněčné smrti a epidermální buňky jsou chráněny před vznikem malignit [18].

Výzkum na drozofile prokázal proapoptotické účinky i v případě vizuálního rod arrestinu. Jeho stabilní transport k světlem aktivovanému rodopsinu vedl k apoptóze retinálních buněk. Byl objasněn molekulární mechanismus apoptotické smrti fotoreceptorových buněk – formování stabilních arrestin-rodopsinových komplexů a jejich následná endocytóza, významnou roli zde sehrává právě i „scaffolding“ funkce vizuálních arrestinů.

K postupnému zániku fotoreceptorových buněk však dochází i v případě nedostatku či chybění arrestinu. Změny ve funkci zrakových arrestinů jsou spojeny s retinálními nemocemi jak u much a myší, tak i u lidí. Mutacím v rodopsinové kináze nebo v rodopsinu jsou připisovány některé formy vrozené noční slepoty (např. Oguchiho nemoc). Rezultují v poškozenou fotoreceptorovou desenzitizaci a u mnoha z těchto pacientů dochází k postupnému zániku fotoreceptorových buněk až k rozvoji retinitis pigmentosy [1].



V předchozím textu bylo podrobně vysvětleno, jakými mechanismy  $\beta$ -arrestin 2 a vizuální arrestiny stimulují apoptózu. Intracelulární děje jsou složitě propojeny, arrestiny zastávají v buňce rozličné funkce, a tudíž nepřekvapí objevení naopak blokačního účinku  $\beta$ -arrestinů na apoptotické mechanismy. Bylo zjištěno, že v buňkách postrádajících arrestiny stimulace početných GPCRs (např. N-formyl peptid receptoru (FPR), V2-vazopresin, angiotenzin II1a a CXCR2 receptorů) iniciuje aktivaci fosfoinozimid 3-kinázy, MAPKs a c-Src kinázy, což vyústí v uvolnění cytochromu C z mitochondrií a v aktivaci kaspázy 9 a kaspázy 3. Dochází k rychlému zakulacování buněk, jejich anexin v pozitivitě a následuje programovaná buněčná smrt. K zahájení apoptotických dějů je nezbytná fosforylace a následná internalizace receptorů. K internalizaci zmíněných receptorů nejsou arrestiny nezbytně nutné, a apoptóza tak může být zahájena. Přesný mechanismus spuštění apoptózy dosud nebyl objasněn, předpokládá se, že zde významnou roli hrají ERK a JNK kinázy. V případě těchto receptorů arrestiny hrají rozhodující a naprosto neočekávanou roli v supresi GPCR-zprostředkované apoptózy. Oproti tomu např.  $\beta$ 2-adrenergní a CXCR4 receptory nejsou schopné internalizace v nepřítomnosti arrestinů a apoptotická signalizace nemůže být spuštěna [19].

## 2. 4 Nukleocytoplazmatický „shuttling“ a nukleární funkce arrestinů

Arrestiny jsou poměrně malé proteiny (molekulární hmotnost 44–48 kDa) a díky tomu mohou volně difundovat nukleárními póry. Izolovaná difuze by vyrovnávala jejich koncentraci v cytoplazmě a v jádře. Převážně cytoplazmatická lokalizace vizuálních arrestinů a  $\beta$ -arrestinu 2 napovídá o nutnosti existence aktivního nukleárního transportního mechanismu [20].

Obousměrný aktivní transport proteinů mezi cytoplazmou a jádrem je důležitý regulační mechanismus pro rozmanité buněčné procesy a je kontrolován specializovanými signály – nukleárními lokalizačními importními signály (NLS) a nukleárními exportními signály (NES). Tyto signály se vyskytují v proteinech, jež jsou aktivně transportovány nukleárními póry prostřednictvím speciálního „přejíždějícího-pendlovacího“ (angl. shuttling) mechanismu. Ten je tvořen specifickými solubilními faktory, importiny a exportiny, umožňujícími „pendlování“ proteinů dovnitř a ven z jádra. Jejich navázání k přepravovanému proteinu je regulováno malou GTPázou Ran, která je nezbytná pro správné nasměrování transportu [20, 21].

Klasické NES, které jsou odpovědné za nukleární export většiny „shuttling“ proteinů, jsou charakterizované přítomností leucinových reziduí a jsou rozpoznány exportinem CRM1. Rozdílná distribuce  $\beta$ -arrestinů může být vysvětlena přítomností klasických, na leucin bohatých NES v C-terminální části molekuly  $\beta$ -arrestinu 2, které chybí (respektive jsou maskovány) v  $\beta$ -arrestinu 1. Konstitutivní nukleocytoplazmatický „shuttling“  $\beta$ -arrestinu 2 byl prokázán při kontrole subcelulární distribuce JNK3 po GPCRs aktivaci zachycením JNK3 v cytoplazmě. Také Mdm2, který se obvykle nachází

v jádře v komplexu s p53, je po stimulaci GPCRs translokován pomocí  $\beta$ -arrestinu 2 do cytoplazmy a následně k cytoplazmatické membráně (viz dříve) [20, 22].

Studie z poslední doby (roky 2006, 2007) popisují interakce Mdm2 a JNK3 i se zrakovými arrestiny a překvapivě také s  $\beta$ -arrestinem 1 (které však nejsou dosud plně charakterizovány). I tyto arrestiny zajišťují nukleocytoplazmatický transport Mdm2 a JNK3. Aktivní transport tyčinkového arrestinu jadernými póry je uskutečňován dvěma mechanismy: jednak NES-dependentním (tyčinkový arrestin pravděpodobně obsahuje dvě NES sekvence) a jednak alternativním (dosud nepopsaným) NES-independentním mechanismem.  $\beta$ -arrestin 1 ani čípkový arrestin neobsahují žádné NLS ani NES, jejich cytozolová lokalizace tak musí být zajišťována jinými též dosud neobjasněnými mechanismy. V případě  $\beta$ -arrestinu 1 je jedním z možných regulačních mechanismů zadržujících jej v cytoplazmě jeho interakce s  $\beta$ -arrestinem 2 a vznik cytozolových heterooligomerů [6, 22, 23].

V roce 2006 byla odhalena nová funkce  $\beta$ -arrestinu 1. V transfektovaných fibroblastech se  $\beta$ -arrestin 1 v návaznosti na aktivaci  $\kappa$ - a  $\delta$ -opioidních GPCRs translokoval do jádra. Tento nitrobuňkový přesun koreloval se zvýšenou expresí genů transkripčního faktoru c-fos a inhibitoru cyklin dependentní kinázy p27/kip1. Následně byl popsán molekulární mechanismus této regulace.  $\beta$ -arrestin 1 se podílí na tvorbě nukleárního komplexu v promotorových oblastech p27 a c-fos genů. Tento komplex je tvořen transkripčním faktorem CREB (cAMP response element-binding protein), histon acetyltransferázou p300 a  $\beta$ -arrestinem 1, popř. dalšími dosud neidentifikovanými proteiny.  $\beta$ -arrestin 1 působí jako nukleární „scaffolding“ protein rekrutující p300 k CREB, což vede ke zvýšené acetylaci histonu H4, reorganizaci chromatinu a zvýšené genové transkripci p27 a c-fos. Nukleární funkce  $\beta$ -arrestinu 1 byly potvrzeny pouze v pokusech *in vitro*, *in vivo* dosud sledovány nebyly [24].

## 2. 5 Funkce $\beta$ -arrestinů v chemotaxi

Chemotaxe je definována jako řízená migrace buněk směrem k agonistům. Je klíčovým mechanismem imunitních reakcí, hojení ran, embryogeneze, angiogeneze a migrace neuronů v průběhu vývoje nervové soustavy. Chemotaxe je spojená s GPCRs a s G $\beta\gamma$  podjednotkami G-proteinů, Rho GTPázou, fosfoinozimid 3-kinázou a ERK1/2. Vzhledem ke klasické roli arrestinů v receptorové desenzitizaci se v minulosti předpokládalo, že  $\beta$ -arrestiny budou chemotaxi spíše tlumit. Tato hypotéza však byla v roce 2002 vyvrácena objevením významné role  $\beta$ -arrestinů při stimulaci buněčné chemotaxe.  $\beta$ -arrestin 2 se uplatňuje např. při chemotaxi a chemokinezi spermií a při migraci Th2 lymfocytů (viz dále) [2, 5, 24, 25].

## 2. 6 $\beta$ -arrestin 2, odorantní receptory a migrace spermií

Odorantní („vonné“) receptory (ORs) byly objeveny až v roce 1991 a tvoří nejrozsáhlejší podskupinu



GPCRs. V savčím genomu bylo popsáno až 1000 OR genů, u lidí bylo dosud nalezeno cca 350 typů ORs (cca 60 % lidských OR genů se zatím jeví jako pseudogeny). Jak již název napovídá, tyto receptory jsou exprimovány především v čichových neuronech, konkrétně v jejich sféricky rozšířených dendritech a z nich odstupujících ciliích (zde se nachází též  $\beta$ -arrestin 2) a v jejich axonech. OR váže  $\beta$ -arrestin 2 s vysokou afinitou a klatrin-dependentním mechanismem je tento komplex internalizován. Ve vzniklých endozomech je  $\beta$ -arrestin 2 přítomen i po dlouhodobé expozici odorantu (> 30min), receptory nejsou cíleny k lysozomální degradaci, ale mohou být pomalu recyklovány zpět k plazmatické membráně („long cycle“ recyklace). Tvorba stabilních  $\beta$ -arrestin 2-ORs komplexů tedy spustí pomalý dlouhý recyklační cyklus, kdy endozomy musí být transportovány i perinukleární zónou, ORs jsou poměrně dlouhou dobu zadržovány v cytozolu. Popsané chování umožnilo ORs zařadit do třídy B GPCRs a je podstatou jejich adaptace na opakované a příliš intenzivní čichové vjemy. Adaptace představuje důležitý zpětně vazebný mechanismus, který chrání buňky před akutní i chronickou receptorovou overstimulací a umožní buňkám zůstat citlivými ke změnám intenzity signálů v širokém rozmezí úrovně stimulace.

V roce 1992 byla objevena přítomnost odorantních receptorů též v savčích spermatozoích. V lidských spermatozoích byl přibližně o 10 let později nalezen OR typu hOR17-4 a byla zjištěna jeho účast při vývoji spermií, při jejich chemotaxi a chemokinezi a při interakci oocyt/spermie.  $\beta$ -arrestin 2 se soustřeďuje do stejných subcelulárních kompartmentů spermatozoí jako ORs (nejvyšší výskyt ve „středním oddílu“) a podílí se na regulaci chemoreceptorové odpovědi. Překvapující bylo zjištění, že stimulace testikulárního hOR17-4 indukuje PKA-dependentní translokaci  $\beta$ -arrestinu 2 a fosforylovaných MAPKs (ERK1/2 a p38) z cytozolu do jádra spermie, kde jsou zapojeny do regulace transkripčních dějů. Při fertilizaci proniká hlavička spermie do oocytu, velmi pravděpodobně sem přechází i  $\beta$ -arrestin 2 a fosforylované MAPKs. To by mohlo být důležité pro iniciaci a regulaci genové exprese v samčím prvojádře zygoty, v rýhujícím se vajíčku, popř. i v časných krocích embryonálního vývoje [5, 24].

### 3 Klinické příklady

#### 3.1 Arrestiny a nefrogenní diabetes insipidus

Význam stupně afinity arrestinů k receptorům potvrzují následující příklady. Mutace V2 receptoru R137H (arginin 137 je substituován histidinem) je asociovaná s familiárním X vázaným nefrogenním diabetes insipidus. Patří do skupiny „loss-of-function“ mutací (je spojena se ztrátou či snížením funkce receptoru). Indukuje konstitutivní arrestinem zprostředkovanou desenzitizaci. Na rozdíl od nemutovaného vazopresinového receptoru je R137H receptor stočený do nesprávné konformace, je dokonce i v nepřítomnosti agonisty konstitutivně fosforylovaný a sekvestrovaný

v arrestin-asociovaných intracelulárních vezikulách; není recyklován zpět k buněčné membráně a nemůže se účastnit přenosu buněčných signálů. Eliminace mutovaných míst R137H receptoru, jež kódují tuto vysoce afinitní  $\beta$ -arrestin-receptorovou interakci, receptoru opět umožní jak lokalizaci v cytoplazmatické membráně, tak odpověď na agonistu; je navržena schopnost receptorové signalizace.

Analogická mutace v molekule rodopsinu (R135A nebo L) má za následek zvýšení afinity k rodopsinové kináze a vizuálnímu arrestinu. Významné snížení funkce V2R a rodopsinových mutant souvisí s jejich zvyšující se silou interakce s arrestiny [26].

Mezi významné příčiny GPCR-asociovaných chorob patří defektní receptorová desenzitizace a sekvestrace. Tímto směrem se začaly ubírat potenciální možnosti terapeutického ovlivnění. Bylo zjištěno, že podávání antagonisty vazopresinu SR49059 u několika pacientů významně zmírnilo příznaky diabetes insipidus (došlo ke zvýšené reabsorpci vody a snížení diurézy). SR49059 prostupuje cytoplazmatickou membránou a na receptory se váže v endoplazmatickém retikulu, kde jsou zadržovány. Působí jako farmakologický „chaperon“, který je schopen navrátit správnou konformaci, funkci a schopnost recyklace některým V2R mutantům. Proces desenzitizace a sekvestrace však tímto antagonistou ovlivněn nebyl. Výhledově je plánováno terapeutické snahy cílit právě na proces receptorové sekvestrace, respektive na inhibiční působení na konstitutivní interakci R137H V2R s  $\beta$ -arrestinem [27].

#### 3.2 Arrestiny a hypertenze

V případě mutovaných angiotenzinových receptorů AT1a (L305Q AT1aR) podávání sartanů (antagonistů těchto receptorů) zabrání přímo receptorové sekvestraci a podporuje jejich transport z endocytozového poolu k plazmatické membráně [27].

O antagonistech GPCRs se v poslední době hovoří též v jiných souvislostech. „Klasičtí“ antagonisté těchto receptorů (betablokátory a již zmíněné sartany) patří mezi nejpoužívanější léky na světě. Antagonizují však obě signalizační cesty (jak G-proteinovou, tak i  $\beta$ -arrestinovou), což není vždy žádoucí. Začalo se diskutovat o nové generaci antagonistů (např. SII-angiotenzin II), jež by blokovala škodlivé působení „chronické“ G-proteinové signalizace, na druhou stranu by však neovlivňovala cytoprotektivní a antiapoptotické  $\beta$ -arrestinové signalizační dráhy [9].

#### 3.3 Arrestiny a nádorová onemocnění

Recentní studie nacházejí stále častěji souvislosti mezi  $\beta$ -arrestinem aktivovanou Src kinázou a rozvojem maligního nádorového onemocnění. Zde uvedeme dva příklady – kolorektální karcinom a nemalobuněčný karcinom plic. GPCR ligand-dependentní transaktivace receptorů pro růstové faktory je spojená s proliferací a migrací nádorových buněk. Prostaglandin E2 (vznikající působením cyklooxygenázy 2) aktivuje prostaglandinový receptor EP4R ze skupiny GPCRs, což indukuje jeho fosforylaci GPCR kinázou. Fosforylované intracelulární smyčky EP4 receptoru přitahují a následně

k sobě translokují  $\beta$ -arrestin 1. To spustí defosforylaci  $\beta$ -arrestinu 1 v oblasti serinu-412 a umožní jeho asociaci s c-Src kinázou. Vzniká EP4R/ $\beta$ -arrestin 1/c-Src signalizační komplex, který transaktivuje EGFR a navazující signalizační kaskády fosfatidylinozitol 3-kináza/Akt a Ras/Raf/MEK/ERK. Aktivace těchto signalizačních kaskád je spojená s migrací a metastázováním buněk kolorektálního karcinomu. Na samém počátku těchto dějů se nachází zvýšená exprese cyklooxygenázy 2, která je asociována nejen s metastázami kolorektálního karcinomu, ale i s primárními nádory střev a metastázami karcinomu plic a prsu [28].

Nádorové buňky nemalobuněčného karcinomu plic mohou být stimulovány k proliferaci též nikotinem, cestou nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs). Po této stimulaci vznikají oligomerické komplexy složené z  $\beta$ -arrestinu, Src a nAChRs. Aktivovaná Src následně aktivuje Raf-1, vznikající Rb/Raf-1/E2F1 komplexy obsadí promotory proliferace. Trvalá mitogenní signalizace vede k disociaci Raf-1 a Rb od těchto promotorů, zatímco E2F zůstává k promotorům vázán a buňka může vstoupit do S-fáze svého cyklu. V klidovém stavu je přechod do S-fáze a buněčná proliferace blokována přítomností Rb v promotorové oblasti proliferčních genů. Suprese  $\beta$ -arrestinu zablokuje aktivaci Src kinázy, suprimuje hladinu fosforylované ERK a zruší Rb-Raf-1 vazbu. Tato zjištění otvírají nové možnosti cílené protinádorové terapie [29].

### 3. 4 Arrestiny a psychiatrická onemocnění

Nejvyšší koncentrace  $\beta$ -arrestinů byly zjištěny v nervové tkáni (a ve slezině, viz dříve). Změny koncentrací  $\beta$ -arrestinu 2 v mozku (většinou jejich zvýšení) a následná chybná intracelulární signalizace souvisí s různými psychiatrickými poruchami (např. se schizofrenií, bipolární afektivní poruchou, rozvojem alkoholové závislosti). V těchto regulačních drahách ovlivňuje  $\beta$ -arrestin 2 např. tvorbu komplexů složených ze serin/treoninové kinázy Akt,  $\beta$ -arrestinu 2 a serin/treoninové proteinfosfatázy 2A (PP2A) a funguje jako pozitivní mediátor dopaminergního a  $\mu$ -opioidního synaptického přenosu. Výhledově by se  $\beta$ -arrestin 2 mohl stát možným terapeutickým cílem i v případě těchto psychiatrických poruch [30–32].

### 3. 5 Arrestiny a alergické astma

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest s funkční převahou Th2 lymfocytů. Migrace Th2 buněk do dýchacích cest je pro rozvoj zánětu klíčová. Je regulována prostřednictvím chemokininových GPCRs a teprve v nedávné době bylo zjištěno, že je pro ni nezbytná i přítomnost  $\beta$ -arrestinu 2 v Th2 buňkách. Alergenem senzitivizované myši s defektním genem pro  $\beta$ -arrestin 2 neakumulovaly T lymfocyty v dýchacích cestách a neprojevovaly se u nich žádné zánětlivé projevy typické pro astma.

Mechanismus, jakým  $\beta$ -arrestin 2 může regulovat chemotaxi T buněk, není dosud zcela objasněn.  $\beta$ -arrestiny fungují jako scaffolding proteiny spojující GPCR aktivaci a MAP kinázové kaskády (ERK, JNK-3 a p38, viz dříve). Propojení MAPK kaskády  $\beta$ -arrestinem

2 je pravděpodobně pro receptorem zprostředkovanou migraci některých buněk nezbytné.  $\beta$ -arrestin-MAPK komplexy jsou přednostně cíleny nikoliv k jaderným, ale k cytozolovým substrátům, a právě ty mohou být zapojeny do buněčné chemotaxe. Alternativně mohou  $\beta$ -arrestiny regulovat chemotaxi prostřednictvím terminace chemokin-receptorové signalizace [25].

$\beta$ -arrestin 2 může kromě migrace T buněk regulovat též jejich diferenciaci. K tomu, aby z prekurzorových Th buněk vznikl klon zralých efektorových buněk Th2, je potřeba, aby se prekurzorová buňka setkala s antigenem na povrchu antigen prezentující buňky a za přítomnosti interleukinu-4 (IL-4). Signály předané do prekurzorové Th buňky přes T buněčný receptor aktivují Ras-ERK1/2 cestu, což vystupňuje IL-4 receptorovou signalizaci a dojde k opakovanému dělení a diferenciaci na klon zralých efektorových Th2 buněk. Ačkoliv ani T buněčné receptory, ani IL-4 receptory nepatří do skupiny GPCRs,  $\beta$ -arrestin 2 může modulovat non-GPCR-zprostředkované události prostřednictvím transaktivace nonheptahelikálních receptorů nebo prostřednictvím intracelulární modulační signalizačních drah. Diferenciace Th buněk do Th2 linie byla u  $\beta$ -arrestin 2 deficientních myši redukována pouze za klidových podmínek, v průběhu antigenní senzitivizace narušena nebyla [25, 33, 34].

Působení bakteriálních lipopolysacharidů na  $\beta$ -arrestin 2 deficientní myši u nich vyvolalo neutrofilní plicní zánět a zvýšilo hyperreaktivitu dýchacích cest, srovnatelné výsledky byly získány u  $\beta$ -arrestin 2 pozitivních myši. Je tedy důležité zdůraznit, že nepřítomnost  $\beta$ -arrestinu 2 nesníží migraci všech zánětlivých buněk, ale pouze lymfocytů [33].

$\beta$ -arrestin 2 reguluje rozvoj zánětlivé odpovědi na začátku celé zánětlivé kaskády, tím se stává atraktivním terčem pro eventuální novou terapii astmatu [25].

O  $\beta$ -arrestinu 2 a bronchiálním astmatu se v poslední době diskutuje též v jiných souvislostech. Chronické užívání inhalačních  $\beta$ 2-agonistů astmatiky je asociováno s postupnou ztrátou bronchoprotektivního účinku a se zhoršením kontroly astmatu. Studie z roku 2008 dokazuje, že podstatou je desenzitivace  $\beta$ 2-adrenergních receptorů hladkého svalstva dýchacích cest zprostředkovaná GRK a  $\beta$ -arrestinem 2. Odstranění genu pro  $\beta$ -arrestin 2 u myši bronchodilatační účinky  $\beta$ 2-agonistů obnovilo. I tyto výsledky by mohly přispět k vývoji nových antiastmatik zaměřených právě na  $\beta$ -arrestin 2 [35].

#### Použití zkratky:

Ak	– aminokyselina
AP2	– adaptor protein 2
Ask1	– apoptotické signály regulující kináza 1
AT1aR	– angiotenzinový receptor typu 1a
CK2	– kasein kináza 2
CREB	– cAMP response element-binding protein
EGF	– epidermální růstový faktor
ERK	– extracelulárním signálem regulovaná kináza
GPCR	– receptor spřažený s aktivací G-proteinů
GRK	– kináza receptorů spřažených s G-proteiny
HUGO	– Human Genom Organisation

IκB	– inhibitor nukleárního faktoru kappa
IKK	– IκB-kinázový komplex
IL-4	– interleukin-4
IP6	– inozitol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfát
JNK	– c-Jun N-terminální kináza
LPS	– lipopolysacharid
MAPK	– mitogenem aktivované proteinkinázy
Mdm2	– mouse double minute 2
MEFs	– fibroblastové linie odvozené od myších embryí
nAChR	– nikotinový acetylcholinový receptor
NES	– nukleárními exportní signály
NF-κB	– nukleární faktor kappa B
NSF	– N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
NSL	– nukleární lokalizační importní signály
OR	– odorantní receptor
PAR2	– proteínázou-aktivovaný receptor 2
PKA	– proteinkináza A
PKC	– proteinkináza C
PP2A	– serin/treoninová proteinfosfatáza 2A
SAPK	– stresem-aktivovaná proteinkináza
SH	– Src homologní
TNF $\alpha$	– tumor necrosis factor alpha
V2R	– V2 vazopresinový receptor

## Literatura

- Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.*, 2002, 115, 3, p. 455–465.
- Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.*, 2003, 375, 3, p. 503–515.
- Buchanan, F. G., DuBois, R. N. Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle*, 2006, 5, 18, p. 2060–2063.
- Alvarez, C. E. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol. Biol.*, 2008, 8, p. 222–234.
- Neuhaus, E. M., Mashukova, A., Barbour, J., Wolters, D., Hatt, H. Novel function of  $\beta$ -arrestin 2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J. Cell Sci.*, 2006, 119, 15, p. 3047–3056.
- Song, X., Gurevich, E. V., Gurevich, V. V. Cone arrestin binding to JNK3 and Mdm2: conformational preference and localization of interaction sites. *J. Neurochem.*, 2007, 103, 3, p. 1053–1062.
- Myslivoček, J., Trojan, S. Regulace přenosu signálu receptory spřaženými s G proteiny (desenzitizace, fosforylace, down-regulace). *Psychiatrie*, 2002, 6, 3, dostupný z [www: <http://tigris.cz/PSYCHIATR/psychsupp302/10.htm](http://tigris.cz/PSYCHIATR/psychsupp302/10.htm).
- Goodman, O. B. Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L., Keen, J. H. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 23, p. 15017–15022.
- Lefkowitz, R. J., Rajagopal, K., Whalen, E. J. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell*, 2006, 24, 5, p. 643–652.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, beta-arrestin 1, and beta arrestin 2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, p. 17201–17210.
- Dromey, J. R., Pflieger, K. D. G protein receptors as drug targets: the role of beta-arrestins. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets*, 2008, 8, 1, p. 51–61.
- Wang, P., Gao, H., Ni, Y. et al.  $\beta$ -arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 8, p. 6363–6370.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., Weissman, A. M. Mdm2 is a RING Finger-dependent Ubiquitin Protein Ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 12, p. 8945–8951.
- Fuchs, O., Neuwirtová, R. Ubikvitiny, proteazomy, sumoylace a použití dnes a zítra v terapii nádorů i jiných chorob I., Ubikvitin-proteazomový systém a transkripční faktor NF- $\kappa$ B. *Vnitř. Lék.*, 2006, 52, 4, s. 371–378.
- Boualaran, C., Scott, M. G. H., Bourougaa, K. et al.  $\beta$ -arrestin 2 oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53. *PNAS*, 2007, 104, 46, p. 18061–18066.
- Miller, W. E., McDonald, P. H., Cai, S. F., Field, M. E., Davis, R. J., Lefkowitz, R. J. Identification of a motif in the carboxyl terminus of  $\beta$ -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 30, p. 27770–27777.
- Kato, T. Jr., Delhase, M., Hoffmann, A., Karin, M. CK2 is a C-terminal I $\kappa$ B kinase responsible for NF- $\kappa$ B activation during the UV response. *Mol. Cell.*, 2003, 12, 4, p. 829–839.
- Luan, B., Zhang, Z., Wu, Y., Kang, J., Pei, G.  $\beta$ -Arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.*, 2005, 24, 24, p. 4237–4246.
- Revankar, Ch. M., Vines, Ch. M., Cimino, D. F., Prossnitz, E. R. Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 23, p. 24578–24584.
- Weis, K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 2003, 112, 4, p. 441–451.
- Weis, K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.*, 1998, 23, 5, p. 185–189.
- Song, X., Raman, D., Gurevich, E. V., Vishnivetskiy, S. A., Gurevich, V. V. Visual and both non-visual arrestin in their “inactive” conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 30, p. 21491–21499.
- Storez, H., Scott, M. G. H., Issafras, H. et al. Homo- and hetero-oligomerization of  $\beta$ -arrestins in living cells. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 48, p. 40210–40215.
- Mashukova, A. Investigation of all factory receptor desensitization. Doctoral dissertation, International graduate school of neurosciences, RUHR Universität Bochum 2006. 108 p.
- Walker, J. K. L., Fong, A. M., Lawson, B. L. et al.  $\beta$ -arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *J. Clin. Invest.*, 2003, 112, 4, p. 566–574.
- Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A., Caron, M. G. Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *PNAS*, 2001, 98, 1, p. 93–98.
- Bernier, V., Legacé, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Bichet, D. G., Bouvier, M. Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol. Endocrinol.*, 2004, 18, 8, p. 2074–2084.



28. **Buchanan, F. G., Gorden, D. L., Matta, P., Shi, Q., Matrisian, L. M., DuBois, R. N.** Role of  $\beta$ -arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *PNAS*, 2006, 103, 5, p. 1492–1497.
29. **Dasgupta, P., Rastogi, S., Pillai, S. et al.** Nicotine induces cell proliferation by  $\beta$ -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J. Clinical Invest.*, 2006, 116, 8, p. 2208–2217.
30. **Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G.** An Akt/ $\beta$ -arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, 2005, 122, 2, p. 261–273.
31. **Beaulieu, J. M., Marion, S., Rodriguiz, R. M. et al.** A  $\beta$ -arrestin2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell*, 2008, 132, 1, p. 125–136.
32. **Björk, K., Rimondini, R., Hansson, A. C. et al.** Modulation of voluntary ethanol consumption by  $\beta$ -arrestin 2. *FASEB J.*, 2008, 22, p. 2552–2560.
33. **Fong, A. M., Premont, R. T., Richardson, R. M., Yu, Y. R. A., Lefkowitz, R. J., Patel, D. D.** Defective lymphocyte chemotaxis in  $\beta$ -arrestin2 and GRK6-deficient mice. *PNAS*, 2002, 99, 11, p. 7478–7483.
34. **Johnson, E. N., Druey, K. M.** Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation. *JACI*, 2002, 109, 4, p. 592–602.
35. **Deshpande, D. A., Theriot, B. S., Penn, R. B., Walker, J. K.**  $\beta$ -Arrestins specifically constrain  $\beta$ 2-adrenergic receptor signaling and function in airway smooth muscle. *FASEB J.*, 2008, 22, p. 2134–2141.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ č.NR/8793-3/2006.

Do redakce došlo 27. 11. 2008.

Adresa pro korespondenci:  
 MUDr. Ing. Magdaléna Fořtová  
 Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN  
 U Nemocnice 2  
 128 08 Praha 2  
 e-mail: MagdalenaFortova@seznam.cz