

**Received:** 2005.05.13  
**Accepted:** 2005.06.15  
**Published:** 2005.07.08

## Rola arestyn w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

### Role of arrestins in intracellular signaling

**Magdalena Szymiczek, Ewa Kurowska, Wojciech A. Gorczyca**

Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Arestyny są cytosolowymi białkami, które oddziałując z ufosforylowanym regionem cytoplazmatycznym receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) uniemożliwiają związanie się białek G i ich dalszą aktywację. Tym samym zablokowana zostaje kaskada przekazywania sygnału przez GPCR. U ssaków odkryto cztery izoformy arestyn. Dwie z nich występują swoiście w fotoreceptorowych komórkach siatkówki oka, natomiast dwie pozostałe (tzw.  $\beta$ -arestyny 1 i 2) są obecne w rozmaitych komórkach organizmu. Ostatnio wykazano, że białka te oprócz blokowania aktywności sygnalizacyjnej GPCR pełnią również wiele innych, ważnych funkcji w komórkach.

**Słowa kluczowe:**

**arestyny • receptory sprzężone z białkami G • sygnalizacja wewnątrzkomórkowa**

#### Summary

Arrestins are cytosolic proteins involved in the termination of signaling by activated G protein-coupled receptors (GPCR). Four different arrestins are identified in mammals to date. Two of these are specific to retinal photoreceptor cells, while the other two ( $\beta$ -arrestin 1 and 2) are ubiquitously expressed. Recently, several new regulatory functions of arrestins in such processes as receptor ubiquitination, signaling through kinases, and others have been discovered.

**Key words:**

**arrestins • G protein-coupled receptors • intracellular signaling**

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/7716.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7716.pdf)

**Word count:** 3583

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 105

**Adres autora:**

doc. dr hab. Wojciech A. Gorczyca, Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: gorczyca@iitd.pan.wroc.pl

## WPROWADZENIE

Pierwszym opisanym przedstawicielem rodziny arestyn było, wyizolowane z siatkówki oka bydłęcego, cytosolowe białko o ruchliwości elektroforetycznej 48 kDa, znane jako antygen S (soluble) lub białko 48 K [97]. Nazwę arestyna (arrestin) wprowadzono po stwierdzeniu, że blokuje ono przekazywanie sygnału przez ufosforylowaną rodopsynę, „aresztując” jej region cytoplazmatyczny [100]. Wkrótce białko to sklonowano i określono jego pierwowzór i drugorzędową strukturę [89]. Okazało się również, że miejscem jego występowania są fotoreceptorowe komórki pręcikowe [103,104,105]. Badania nad mechanizmami przekazywania sygnału przez receptory  $\beta$ -adrenergiczne ( $\beta$ -AR) doprowadziły do odkrycia dwóch kolejnych arestyn, a przyczyniło się do tego niewątpliwie poznanie procesu hamowania aktywności sygnalizacyjnej rodopsyny przez arestynę siatkówkową. W trakcie oczyszczania kinazy swoiście fosforylującej receptor  $\beta_2$ -adrenergiczny ( $\beta_2$ -AR) stwierdzono, że w miarę uzyskiwania coraz bardziej oczyszczonego enzymu, paradoksalnie obniża się jego zdolność do blokowania aktywności (odczulania) receptora. Zdolność ta była przywracana po dodaniu do układu eksperymentalnego arestyny siatkówkowej, ale proces był mało wydajny w porównaniu z układem zawierającym rodopsynę. Sugerowało to istnienie białka o właściwościach charakterystycznych dla arestyny, lecz zdecydowanie bardziej swoistego względem układu  $\beta$ -adrenergicznego. Jego poszukiwania doprowadziły do identyfikacji dwóch izoform, tzw.  $\beta$ -arestyn. W 1990 roku Lohse i wsp. sklonowali 418 aminokwasowe białko, homologiczne w 60% z arestyną siatkówkową i nazwali je  $\beta$ -arestyną 1 [60], a w dwa lata później Attramadal i wsp. [4] opisali sekwencję  $\beta$ -arestyny 2. Najpóźniej odkrytym białkiem z rodziny arestyn była tzw. arestyna czopkowa, odgrywająca w komórkach czopkowych siatkówki podobną rolę jak arestyna pręcikowa w pręcikach [14].

Badania ekspresji białek z rodziny arestyn wykazały, że arestyny pręcikowa i czopkowa występują głównie w fotoreceptorowych komórkach siatkówki oka, choć ich niewielkie ilości stwierdzono również w szyszynce [16]. Obydwie  $\beta$ -arestyny są obecne w różnych typach komórek [4,48,60,94], ale głównie lokalizowano je w ośrodkowym układzie nerwowym i śledzionie [62,72]. Analogi arestyn ssaczych wykryto również u organizmów niższych, zarówno kręgowców [71], jak i bezkręgowców [41].

Siatkówkowa arestyna bydłęca jest zbudowana z 404 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 45,3 kDa, różniącej się nieznacznie od tej obserwowanej w elektroforezie [77]. Z analizy krystalograficznej wynika, że w jej strukturze wyróżniają się dwie charakterystyczne domeny, N-końcowa (reszty 8-180) i C-końcowa (reszty 188-362), z których każda jest zbudowana z siedmiu łańcuchów o strukturze beta harmonijek. C-końcowy odcinek arestyny (reszty 372-404) i domenę C-końcową łączy tzw. region zawiasowy [35]. Dzięki jego obecności C-końcowy odcinek może oddziaływać z fragmentami obu domen, wpływając na konformację białka [38]. Stwierdzono, że obszar odpowiedzialny za rozpoznawanie aktywowanej rodopsyny znajduje się w obrębie domeny N-końcowej, natomiast miejsce jej wiązania w domenie C-końcowej. Polarne aminokwasy z regionów regulatorowych zarówno N-, jak i C-końcowych tworzą charakterystyczne sku-

pisko zwane rdzeniem polarnym, który jest wrażliwy na ujemny ładunek reszt fosforanowych ufosforylowanego receptora docelowego. Konformacja arestyny jest regulowana przez oddziaływanie rdzenia polarnego z C-końcowym fragmentem receptora [30]. W przypadku braku pobudzenia rdzeń jest osadzony między domeną N- i C-końcową arestyny, natomiast podczas oddziaływania z GPCR jego ufosforylowany fragment wnika w obręb rdzenia, rozrywa oddziaływanie reszt polarnych i uwalnia fragment C-końcowy. Takie rozluźnienie struktury arestyny ułatwia tworzenie jej kompleksu z receptorem. Podobną ogólną strukturę mają  $\beta$ -arestyny. Jednak w odróżnieniu od arestyn siatkówkowych ich region C-końcowy zawiera dodatkowo miejsca fosforylacji oraz miejsca wiążące klatryny i białko AP2, które odgrywają istotną rolę w procesie endocytozy [61]. Wszystkie cztery arestyny wykazują wysoką (~60%) homologię (ryc. 1). Jest ona najwyższa (~80%) między  $\beta$ -arestyną 1 i 2, a niższa między  $\beta$ -arestynami i arestynami komórek fotoreceptorowych. Różnice dotyczą głównie regionów N- i C-końcowych.

Podstawową funkcją wszystkich arestyn jest wspomniana już zdolność blokowania przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego przez aktywowane receptory sprzężone z białkami G [21,48]. Badania ostatnich lat wskazują jednak, że uczestniczą one również w wielu innych procesach, pełniąc czasem zupełnie nieoczekiwane funkcje. I tak  $\beta$ -arestyny, dzięki obecności domeny wiążącej klatryny, stanowią element pośredniczący w endocytozie i recyklicacji receptorów [53,67]. Biorą udział w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej przez oddziaływanie bezpośrednie lub pośrednie z białkowymi kinazami z rodziny Src [63], rodziny MAPK [56] i innymi [15,66]. Obecność arestyn wpływa na proces chemotaksji [98]. Poprzez oddziaływanie z fosfodiesterazami arestyny mogą modulować poziom cAMP w komórce [82]. Ostatnie doniesienia wskazują na ich udział w inhibicji NF- $\kappa$ B [101]. W miarę rozwoju badań liczba procesów komórkowych, w których wykazano udział arestyn stale wzrasta. Te poznane dotychczas postanowiliśmy omówić poniżej.

## KLASYCZNA ROLA ARESTYN W ODCZULANIU GPCR

Receptory sprzężone z białkami G (G protein-coupled receptors – GPCR), zwane również receptorami 7-krotnie przebijającymi błonę komórkową (seven-membrane-spanning receptors – 7MSR), stanowią najliczniejszą rodzinę receptorów komórkowych, reprezentowaną w ludzkim genomie przez co najmniej 1000 potencjalnych członków [75,102]. Odpowiadają na tak różnorodne sygnały zewnątrzkomórkowe, jak: światło, cząsteczki zapachowe, neuroprzekazniki czy hormony [86]. Mechanizm przekazywania sygnału przez GPCR jest schematycznie przedstawiony na rycinie 2. W wyniku oddziaływania z agonistą dochodzi do takiej zmiany konformacyjnej w strukturze receptora, która umożliwia wiązanie się w jego części cytoplazmatycznej heterotrimerycznego białka G. Oddziaływanie z receptorem powoduje wymianę GDP na GTP w podjednostce  $G_\alpha$  białka G i w konsekwencji dysocjację heterotrimeru na dwie podjednostki  $G_\alpha$  i  $G_{\beta\gamma}$ . Obydwie uwolnione podjednostki, w zależności od izoformy oraz rodzaju komórek, mogą z kolei aktywować wiele białek efektorowych, wśród których znajdują się cykazy adenylanowe, fosfodiesterazy, fosfolipazy, czy kanały jonowe [8,27,31,32,73].

Ar1	-----MGDK-GTRVFKKASPNGLTVYLGKRD FVDHIDLVD PVDGVVLVDPEY LKERR	52
Ar2	-----MGEKPGTRVFKKSSPNCKLTVYLGKRD FVDHLDKVD PVDGVVLVDPDY LKDRK	53
ArC	-----MSKVFKKTSNGLKLSIYLGKRD FVDHVDIPEPIDGVVLVDPEY LKCRK	48
ArP	MAASGKTSKSEPNHVLFKKISRDKSVTIYLGNRDIHVSQVQ PVDGVVLVDPDLVKGKK	60
Ar1	VYVTLTCAFRY GREDLDV LGLTFRKDLFVANVQSFP PAPERDKK-PLTRLQERL IKKLGEH	111
Ar2	VFVTLTCAFRY GREDLDV LGLSFRKDLFIATYQAFPPVENPPR-PETRLQDRLLRKLGOH	112
ArC	LFVTLTCAFRY GRDDLEVI GLTFRKDLVYQTLQVVP AESSSPQALTVLQERLLHKLGDN	108
ArP	VYVTLTCAFRY GQEDVDV IGLTFRRDLYFSRVQVYPPVGAAST--PTKLQESLLKKLGSN	118
Ar1	AYPEFTEIIPENLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFE VKAFC AENL---EEKIHKRNSVRLVI	168
Ar2	AHPFEFTIIPONLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFE IRAFCAKSL---EEKSHKRNSVRLVI	169
ArC	AYPEFTLQMVTLNLPCLVTLQPGPEDAGKPCGIDFEVKSFCAENP---EETVSKRDYVRLVV	165
ArP	TYPELLEIFEDYLPCLVTLQPAPOD-SGKSCGVDFE VKAFAIDSTDAEEDKIPKSSVRYLI	178
Ar1	RKVQMAPERPGPQPTAETTRQFLMSDKPLHLEASLDKEIYYHGEPISVNVHVTNNTNKTIV	228
Ar2	RKVQFAPEKPGPQPSAETTRHFILMSDRSLHLEASLDKELIYYHGEPINNVNVHVTNNSTKTV	229
ArC	RKVQFAPEEAGPGPSAQTIRRFLLSACPLQLQAWMDREVHYHGEPISVNVSIINNTNKTIV	225
ArP	RSVQHAPLEMGPQPRAEATWQEFMSDKPLHLAVSLNREIYFHGEPIFVITVITVNTNTEKTV	238
Ar1	KKIKISVRQYADICLEN TAQYKCPVAMEEADDTPVAPSSTFCKVYTLTPFLANNREKRGLA	288
Ar2	KKIKVSVRQYADICLESTAQYKCPVAQLEQDDQVSPSSTFCKVYTIPTLLSDNREKRGLA	289
ArC	KKIKLSVDQITDVLVSLDKYTKIVFIQEFTEVAANSSESQSEFAVTPILAASCQKRGLA	285
ArP	KKIKACVQOVANVVLVSSDYVVKPVAMEEAQEKVPPNSTLTKTLTLLPLANNRERRGIA	298
Ar1	LDGKCLKHEDTNLASSTLLREGANREILGIIVSYKVKVKLVE SRGGLGDLA SSDVAVELP	348
Ar2	LDGKCLKHEDTNLASSTIVKEGANKEVLGILVSYRVKVKLVVSRGG-----DVSVELP	341
ArC	LDGKCLKHEDTNLASSTIIRFGMDKELLGILVSYKVRVNLVMSCGGILGDLTASDVGVLP	345
ArP	LDGKCLKHEDTNLASSTI IKEGIDRIVLGILVSYQIKVKLVTS--GFLGELTSSSEVATEVP	356
Ar1	FVLMHPKPKKEEP---PHREVPENEIPVDTNLIEFDTN---DDDIVFEDFARQLKGMKD	401
Ar2	FVLMHPKPHDHIPLPREQSAAPEIDVVPVDTNLIEFDTNATDDDIVFEDFARLRLKGMKD	401
ArC	LVLTHPKP-----SHEAAS-----SEDIVIEEFTRKGEESOK	378
ArP	FRLMHPQPED-----PAKESIQ-----DANLVFEEFARHNLKDAGE	392
Ar1	DKEEEDGTGSPQLNNR	418
Ar2	DDYDD-----QLC--	409
ArC	AVEAEGD-----EGS--	388
ArP	AEEGKRDKN---DADE-	405

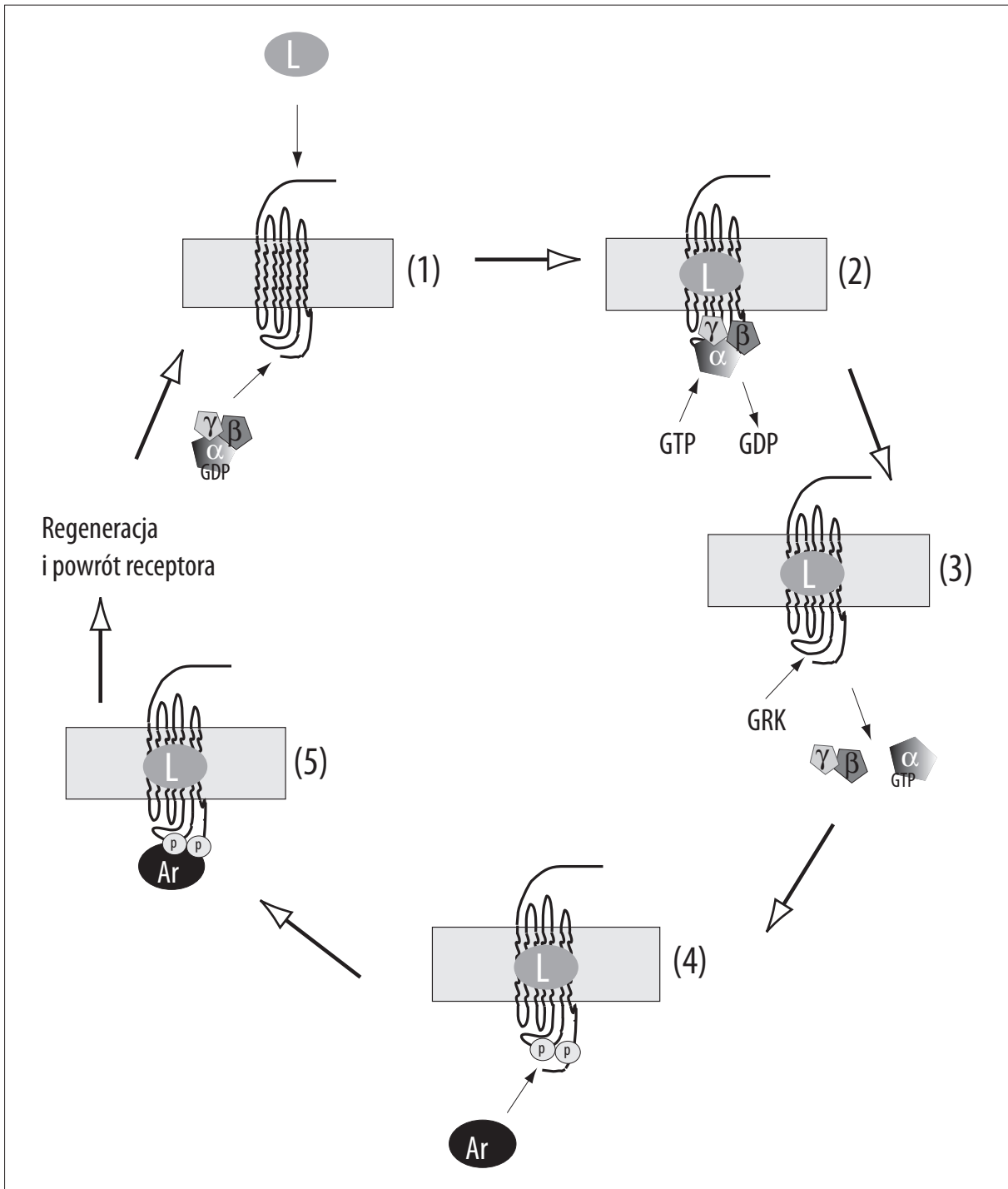
Ryc. 1. Porównanie sekwencji arystyn ludzkich. Białe litery na czarnym tle oznaczają identyczne aminokwasy w danej pozycji, natomiast białe litery na szarym tle aminokwasy podobne; Ar1, Ar2, ArC i ArP oznaczają kolejno: β-arystyny 1 i 2, arystynę czopkową i arystynę przeciękową. Porównanie przeprowadzono korzystając z programu ClustalW

Pobudzony przez agonistę GPCR może aktywować wiele cząsteczek białka G i jeśli proces ten nie podlegałby ograniczeniom dochodziłoby do niekontrolowanej stymulacji szlaków sygnałowych komórki. Zahamowanie katalitycznej aktywności receptora, zwane odczuleniem, wiąże się z jego fosforylacją i, jak to wykazano dla znacznej ilości GPCR, przyłączeniem w ufosforylowanym regionie arysty-

ny, która „aresztuje” reszty zaangażowane w wiązanie białka G [45,83]. W ten sposób dochodzi do tłumienia przekazywanego przez receptor sygnału [34,54] i rozpoczyna się proces regeneracji receptora.

Do najwcześniej opisanych GPCR należy rodopsyna, będąca receptorem światła [17,50] i receptory β-adrenergiczne





Ryc. 2. Rola arestyn w odczuleniu receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR). Pobudzony przez agonistę (L) receptor ulega konformacyjnym przekształceniom (1). Do jego cytoplazmatycznej części wiąże się białko  $G_{\alpha\beta\gamma}$  (2). Następuje aktywacja trimery i wymiana GDP na GTP w podjednostce  $G_{\alpha}$ , a następnie rozpad cząsteczki na podjednostki  $G_{\alpha}$  i  $G_{\beta\gamma}$  (3). W wyniku fosforylacji receptora przez kinazę swoistą dla GPCR (4) możliwe jest przyłączenie arestyny (5). Arestyna wiążąc się do cytoplazmatycznej części receptora przestrzennie uniemożliwia związanie w tym miejscu białka  $G_{\alpha\beta\gamma}$ , co prowadzi do przerywania kaskady przekazywania sygnału; L – ligand (agonista), Ar – arestyna, P – reszty fosforanowe, GRK – kinaza receptora sprzężonego z białkiem G

wiążące adrenalinę i noradrenalinę [72,91]. Procesy aktywacji i inaktywacji tych receptorów zostały również poznane jako jedne z pierwszych. Rodopsyna po absorpcji fotonu ulega konformacyjnemu przekształceniu w metarodopsynę II, która w cytoplazmatycznej części wiąże specy-

ficzne białko G, zwane transducyną ( $T_{\alpha\beta\gamma}$ ), rozpoczynając proces fototransdukcji, czyli zmianę sygnału świetlnego na sygnał nerwowy [79]. Aktywowana transducyna ulega rozpadowi na podjednostki  $T_{\alpha}$  i  $T_{\beta\gamma}$ . Następuje ciąg reakcji biochemicznych, które prowadzą do odebrania wrze-

nia wzrokowego [16,17,27]. W odczucianiu rodopsyny bierze udział swoista kinaza, zwana kinazą rodopsynową lub kinazą 1 receptora sprzężonego z białkiem G (G protein-coupled receptor kinase 1 – GRK1). Fosforylacja cytoplazmatycznych reszt rodopsyny przez GRK1 umożliwia wiązanie się w tym regionie arestyny siatkówkowej, która blokuje wiązanie transducyny i tym samym zatrzymuje kaskadę aktywacyjną fototransdukcji [22,28,37,78]. Związanie arestyny rozpoczyna proces regeneracji rodopsyny i powrót komórki do stanu przed pobudzeniem.

W przypadku receptorów  $\beta$ -adrenergicznych obserwuje się dwa różne sposoby odczucia. Pierwszy z nich, zwany odczuciem heterologicznym, jest niezależny od agonisty i zachodzi z udziałem kinazy białkowej A (PKA) lub kinazy białkowej C (PKC). Stwierdzono, że PKA fosforyluje  $\beta_2$ AR w dwóch specyficznych miejscach i jest to warunek wystarczający, aby nie doszło do wiązania białka G. Fosforylacja receptora przez PKA prowadzi do depalmitylacji cysteiny 341, co może się przyczyniać do odczucia GPCR [70]. Drugi sposób, tzw. odczucie homologiczne jest zależne od wiązania agonisty i podobnie jak w przypadku rodopsyny, zachodzi dwustopniowo. W pierwszym etapie dochodzi do fosforylacji C-końcowego fragmentu  $\beta$ AR przez swoistą kinazę, a następnie wiązanie  $\beta$ -arestyny, która uniemożliwia dalsze przyłączanie białka G [54]. Kinazami zaangażowanymi w odczucie homologiczne są GRK2 i GRK3, określane również jako kinazy 1 i 2 receptora  $\beta$ -adrenergicznego ( $\beta$ ARK1 i  $\beta$ ARK2) [19]. Konsekwencją fosforylacji i wiązania  $\beta$ -arestyn jest szybko następujący proces internalizacji receptora [13].

Najnowsze dane literaturowe wskazują, że arestyny dzięki obecności miejsc wiążących różne białka mogą jednocześnie oddziaływać z kilkoma z nich [12,24,31]. Pełnią tym samym rolę tzw. „białek szkieletowych” (scaffold protein), które łącząc różne szlaki sygnałowe uczestniczą w różnorodnych procesach komórkowych, wzmagając skuteczność i swoistość przekazywanych przez GPCR informacji.

#### UDZIAŁ ARESTYN W INTERNALIZACJI RECEPTORÓW

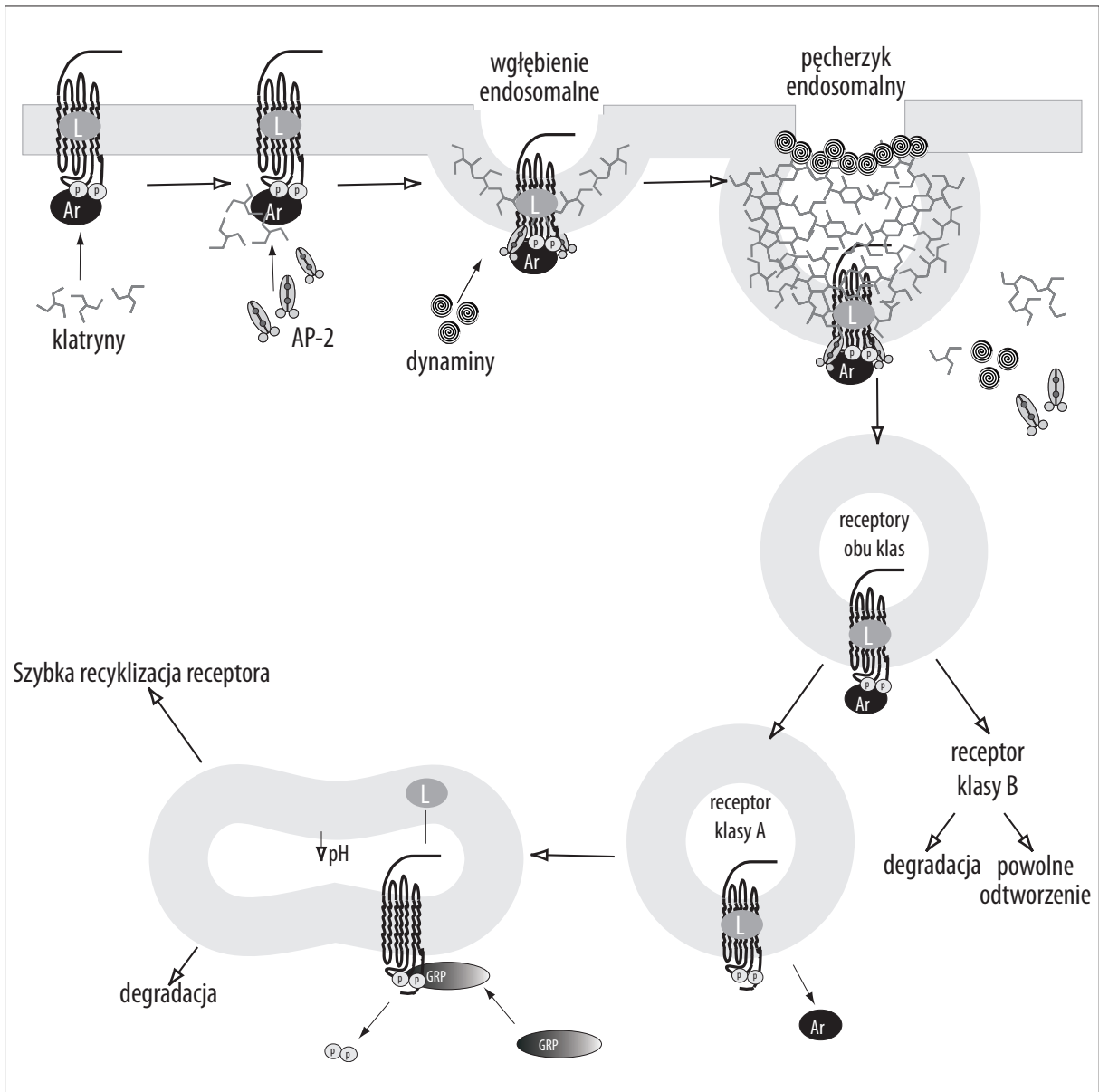
Część GPCR po odczuciu ulega procesowi endocytozy, który jest określany również mianem sekwestracji lub internalizacji. Zachodzi on po kilku minutach od wiązania agonisty [46], a jego konsekwencją jest defosforylacja i ponowne uczucie receptora [47,55]. Wykazano, że internalizacji ulegają m.in. receptory  $\alpha_1$ - i  $\beta_2$ -adrenergiczne, receptor typu Ia angiotensyny II [18], receptor endoteliny A, receptor  $D_1$  dopaminy, receptor folitropiny [19]. Endocytoza GPCR może przebiegać odmiennie (ryc. 3) w zależności od typu receptora,  $\beta$ -arestyny, czy rodzaju komórki [62]. Istotnym elementem procesu endocytozy GPCR jest tworzenie wgłębień w powierzchni komórki i formowanie klatrynowych powłok. Nie stwierdzono jednak bezpośredniego wiązania klatryny przez receptory. Rolę białka łącznikowego między GPCR i klatrynami pełnią właśnie  $\beta$ -arestyny. Odkrycie ich roli w procesie endocytozy, nastąpiło w wyniku zlokalizowania aktywowanej  $\beta$ -arestyny 2 przy błonie cytoplazmatycznej, wewnątrz klatrynowego pęcherzyka [96]. Wykazano następnie, że miejsca bezpośredniego wiązania znajdują się między resztami 373-377  $\beta$ -arestyny 2 [49] i regionem leżącym między resztami 89 i 100 N-końca łańcucha ciężkiego klatryn [26]. Warunkiem od-

działywania z klatryną jest aktywacja  $\beta$ -arestyny poprzez wiązanie z GPCR, w wyniku czego obie izoformy  $\beta$ -arestyn ulegają podobnym zmianom konformacyjnym [33,68]. Stwierdzono, że w przypadku ufosforylowania C-końca np. receptora wazopresyny 2 ( $V_2R$ ) i wiązania  $\beta$ -arestyny 2 następuje rozluźnienie wewnątrz polarnego rdzenia i dysocjacja C-końca arestyny z jego pozycji w stanie podstawowym. Uwolnienie C-końca eksponuje miejsce wiążące klatrynę, co umożliwia endocytozę receptora [102]. Oprócz klatryn, do formowania endosomalnych pęcherzyków niezbędne jest m.in. białko adaptorowe AP2 [44]. Jest ono zaangażowane w rozpoczęcie procesu formowania klatrynowych powłok i pośredniczy w endocytozie wielu receptorów przez wiązanie z klatrynami, dynaminami i białkiem EPS-15. W wiązaniu AP2 z GPCR pośredniczy również  $\beta$ -arestyna [43,51,62]. Wiązanie z podjednostką  $\beta_2$ , wchodzącą w skład AP2, zachodzi poprzez tzw. sekwencję RxR obecną w cząsteczce arestyny (reszty 394-396 w  $\beta$ -arestynie 2) i jest niezależne od wiązania z klatrynami [52].

Ze względu na to, że  $\beta$ -arestyny mogą łączyć ze sobą różne białka uczestniczące w procesie endocytozy szczególne znaczenie mają mechanizmy regulujące ich aktywność. Taką rolę wydaje się odgrywać fosforylacja i defosforylacja arestyn. Cytosolowa  $\beta$ -arestyna 1 jest niemal całkowicie ufosforylowana na Ser<sup>412</sup> [58] przez kinazę ERK1 lub ERK2 [59]. W pobliżu błony cytoplazmatycznej ulega jednak szybkiej defosforylacji i dopiero wtedy jest zdolna do tworzenia kompleksu z klatrynami. Defosforylacja  $\beta$ -arestyny 1 wydaje się istotna dla wiązania z klatrynami, ale nie z receptorem [58]. Chociaż homologia sekwencji aminokwasowych  $\beta$ -arestyny 1 i 2 sięga 80%, to Ser<sup>412</sup> jest charakterystyczna jedynie dla  $\beta$ -arestyny 1 [87]. W przypadku  $\beta$ -arestyny 2 fosforylowana może być reszta treoniny (Thr<sup>383</sup> w arestynie szczerzej, a Thr<sup>382</sup> w bydlęcej) przez kinazę kazeinową typu II (CKII), lecz jedynie w przypadku arestyny szczerzej ma to znaczenie przy wiązaniu klatryn [42,57].

Przy braku pobudzenia receptora zarówno  $\beta$ -arestyna 1, jak i  $\beta$ -arestyna 2 są równomiernie rozproszone w cytosolu. Dopiero po aktywacji GPCR  $\beta$ -arestyny przemieszczają się szybko do powierzchni błony cytoplazmatycznej [6,7]. W procesie tym ważną rolę odgrywa białko NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein), uczestniczące w transporcie  $\beta$ -arestyny 1 [67]. Zauważono, że nadekspresja NSF w komórkach HEK 293 wzmagą proces internalizacji receptora [62]. Odmienny schemat powrotu  $\beta$ -arestyn do przestrzeni wewnątrzkomórkowej stanowił podstawę podziału receptorów sprzężonych z białkiem G na klasy A i B [76]. Klasę A reprezentują receptory adrenergiczne  $\beta_2$  i  $\alpha_{1b}$ , receptor opioidowy  $\mu$ , receptor endoteliny ET<sub>A</sub> i receptor dopaminy D<sub>1A</sub>. Wiążą one preferencyjnie  $\beta$ -arestynę 2 i nie oddziałują z arestyną wizualną. Ponadto ich oddziaływanie z  $\beta$ -arestyną 2 jest nietrwałe. Zauważono, że co prawda wiąże się ona z receptorem tej klasy przy błonie plazmatycznej, jednak podczas internalizacji oddysocjuje i w endosomach nie pojawia się kompleks receptor- $\beta$ -arestyna 2.

Do GPCR klasy B zaliczane są m.in. receptor wazopresyny 2 ( $V_2R$ ), receptor angiotensyny 1a (AT<sub>1A</sub>R), receptor hormonu uwalniającego tyrotropinę, receptor neurotensyny 1, czy receptor neurokininy NK-1. Wszystkie one wykazują takie samo powinowactwo do  $\beta$ -arestyny 1, jak



Ryc. 3. Udział  $\beta$ -arestyn w endocytozie GPCR.  $\beta$ -arestyny stanowią łącznik między receptorem a elementami mechanizmu endocytozy: klatrynami, dopaminami i białkami łącznikowymi. Po uformowaniu pęcherzyka endosomalnego przebieg procesu jest zależny od klasy receptora. W przypadku receptorów klasy A (np. receptor  $\beta$ -adrenergiczny) dochodzi do szybkiej dysocjacji  $\beta$ -arestyny. W kwaśnym środowisku pęcherzyków ligand odłącza się od receptora, który ulega defosforylacji prowadzonej przez GRP. Receptor powraca do powierzchni błony plazmatycznej przez GRP. Klasa receptorów B (np. receptor 1a angiotensyny II) tworzy trwałe kompleksy z  $\beta$ -arestyną. GPCR, który uległ akumulacji w pęcherzyku endosomalnym ulega degradacji lub powoli powraca do powierzchni błony w dotychczas słabo poznanym procesie; AP-2 – białko łącznikowe 2, GRP – fosfataza receptora sprzężonego z białkiem G, pozostałe oznaczenia jak na ryc. 2

do  $\beta$ -arestyny 2 i ponadto mogą wiązać arestynę wizualną [76]. Utworzony kompleks receptor-arestyna jest też trwalszy i dłużej ulega kolokalizacji w pęcherzykach endosomalnych, niż w przypadku receptorów klasy A. Być może sposób oddziaływania z arestynami powoduje, że receptory klasy A szybciej ulegają ponownemu uczuleniu i szybciej „wracają do obiegu” niż receptory klasy B [57]. Strukturalne regiony określające stabilność kompleksu receptor/ $\beta$ -arestyna i przynależność do klasy receptorów są umiejscowione wewnątrz skupisk reszt serynowych i treoninowych w regionie C-końcowym receptora [3,75]. Oddziaływanie  $\beta$ -arestyn ze specyficznym motywem, znajdującym się na

C-końcu GPCR, decyduje o kinetyce defosforylacji i ponownym uczuleniu receptora. Ma zatem wpływ na powrót receptora do stanu przed pobudzeniem [74].

#### UDZIAŁ ARESTYN W UBIKWITYNACJI RECEPTORÓW

Potranslacyjne przyłączenie ubikwityny (Ub), jest ważnym procesem regulującym sortowanie i degradację zawartości lizosomów, np. internalizowanego GPCR [65,87]. Pod wpływem pobudzenia  $\beta_2$ AR przez agonistę ubikwitynacji ulega zarówno receptor, jak i  $\beta$ -arestyna 2 [88]. Receptor jednak jest ubikwitynowany tylko w obecności  $\beta$ -arestyny,

która przypuszczalnie sprowadza w jego pobliżu odpowiednią ligazę [88]. Ubikwitynacja nie jest konieczna do internalizacji  $\beta_2$ AR, co wykazano za pomocą mutacji w miejscu wiązania Ub (Lys 268), jest natomiast wymagana do jego degradacji. Jak wspomniano, Ub wiąże się również z  $\beta$ -arestynami (z udziałem ligazy Mdm2), ale w zależności od klasy pobudzonego receptora, proces ma odmienny przebieg. Pobudzenie receptorów klasy A, takich jak  $\beta_2$ AR i  $V_2$ Rb<sub>2</sub>CT ( $V_2$ R z C-kończącą resztą  $\beta_2$ AR), prowadzi do przejściowej ubikwitynacji  $\beta$ -arestyn i do nietrwałego oddziaływania receptor- $\beta$ -arestyna przy błonie plazmatycznej [95]. W przypadku receptorów klasy B,  $V_2$ R lub  $\beta_2$ ARV<sub>2</sub>CT ( $\beta_2$ AR z C-kończącą resztą  $V_2$ R) [95], stan ubikwitynacji  $\beta$ -arestyn jest trwały [85] i są one kolokalizowane z receptorem w endosomie. Ubikwitynacja świadczy o końcowej fazie procesu endocytozy, a  $\beta$ -arestyny również na tym etapie mogą wpływać na jej przebieg [87].

### ODDZIAŁYWANIE $\beta$ -ARESTYN Z KINAZAMI BIAŁKOWYMI

Stwierdzenie, że  $\beta$ -arestyny oddziałują w bezpośredni sposób z kinazami tyrozynowymi Src i kinazami ERK1/2 i JNK3 z rodziny MAPK sugerowało, że dzięki temu mogą one odgrywać znacznie większą rolę niż znana dotychczas.

#### Oddziaływanie z kinazami Src

Jedną z najważniejszych obserwacji było, że  $\beta$ -arestyny oddziałując z kinazami rodziny Src umożliwiają ich wiązanie do GPCR. Luttrell i wsp. [61] zauważyli, że w następstwie pobudzenia  $\beta_2$ AR w komórkach HEK 293 dochodzi do wspólnego umiejscowienia receptora,  $\beta$ -arestyny i kinazy Src w pęcherzykach endosomalnych. Z kolei Miller i wsp. [69] stwierdzili, że aktywacja  $\beta_2$ AR przez agonistę prowadzi do związania c-Src do błony komórkowej, gdzie kinaza ta fosforyluje reszty tyrozynowe dynaminy (białko odłączające pęcherzyk endosomalny od błony komórkowej) i w ten sposób pośredniczy w internalizacji receptora. Tak więc, jednym z zadań kompleksu  $\beta$ -arestyna-Src może być modulowanie endocytozy GPCR [15]. Natomiast Barlik i wsp. [9] w swoich badaniach obserwowali, że  $\beta$ -arestyny oddziałują z Hck i c-Fgr (kinazy tyrozynowe z rodziny Src zaangażowane w uwalnianie ziarnistości) po pobudzeniu receptorów chemokin (CXCR1) przez interleukinę 8. Autorzy ci zauważyli również, że w przypadku mutacji miejsca wiązania  $\beta$ -arestyny z kinazami, w komórkach nie dochodziło do uwalniania ziarnistości po pobudzeniu chemoatraktantem [9].

#### Oddziaływanie z MAPK

Serynowo/treoninowe kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK) są zaangażowane w przenoszenie sygnałów regulujących ekspresję genów, proliferację i apoptozę [64]. Do rodziny tej należą kinazy ERK1 (p44MAPK), ERK2 (p42MAPK), ERK5 (duża MAPK lub BMK), kinazy JNK1–JNK3 zwane też kinazami aktywowanymi przez stres (SAPK) i izoformy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  kinazy p38. Tworzą one tzw. kaskady MAPK i mogą oddziaływać z różnymi białkami szkieletowymi [11,81]. Aktywowane MAPK fosforylują białka błonowe i cytoplazmatyczne, a po translokacji do jądra odpowiednie czynniki transkrypcyjne [81,99]. Stwierdzono, że za pośrednictwem  $\beta$ -arestyny kinaza ERK

może tworzyć kompleks receptor- $\beta$ -arestyna-ERK, który następnie zlokalizowano w pęcherzykach endosomalnych. Kinaza ta nie ulegała wówczas przemieszczaniu do jądra [84] i nie dochodziło do proliferacji komórek [62]. MAPK odgrywają też istotną rolę w procesie chemotaksji. Terminem tym określa się ukierunkowany ruch komórki w odpowiedzi na gradient agonisty, zwanego czynnikiem chemotaktycznym. Jest to jedna z najważniejszych właściwości komórek układu immunologicznego, dzięki której mogą się kierować do miejsca inicjowanej reakcji odpornościowej [80]. Wrażliwość i zdolność do szybkiej odpowiedzi komórki na zmianę gradientu czynnika chemotaktycznego wiąże się ze zmianami stopnia aktywacji odpowiednich GPCR. Było więc prawdopodobnym, że  $\beta$ -arestyny, wiążąc zarówno MAPK, jak i receptory czynników chemotaktycznych, mogą wpływać na proces chemotaksji. Istotnie, Ge i wsp. [24] stwierdzili, że  $\beta$ -arestyna 1 bierze udział w przemieszczaniu się komórek. Po aktywacji receptora PAR-2 (protease-activated receptor 2), obecnego m.in. na neutrofilach, makrofagach oraz komórkach nowotworowych, dochodzi do tworzenia klatrynowych wgłębień zawierających kompleks PAR-2- $\beta$ -arestyna-ERK. Umożliwia to kinazie fosforylację białek biorących udział w wydłużaniu pseudopodiów i chemotaksji. Istnieją również inne dowody na to, że  $\beta$ -arestyna pośredniczy w ukierunkowanym ruchu komórek. Sun i wsp. [93], prowadząc badania na dwóch różnych liniach komórkowych (HeLa i HEK 293) stwierdzili, że w wyniku nadekspresji  $\beta$ -arestyny 2 maksymalna chemotaksja zachodziła nawet przy 10-krotnie mniejszym stężeniu czynnika chemotaktycznego. Zależało to od szlaku sygnałowego kontrolowanego przez receptor CXCR4 chemokin. Sugerowano, że skoro intensywność przemieszczania się  $\beta$ -arestyn w kierunku błony jest proporcjonalna do ilości pobudzonych GPCR, to  $\beta$ -arestyny wpływają na tworzenie się gradientu wewnątrzkomórkowego, a to prowadzi do polaryzacji komórki i wpływa na chemotaksję [20].

Oddziaływanie  $\beta$ -arestyn z MAP kinazami może wpływać na inne jeszcze procesy komórkowe. Ostatnie doniesienia wskazują, że  $\beta$ -arestyna 2 jest zaangażowana w jednej z odmian programowanej śmierci komórki [12]. Zauważono, że w wyniku aktywacji receptora neurokininy 1 (NK<sub>1</sub>R)  $\beta$ -arestyna 2 oddziałuje z jego regionem C-kończącym i wiąże elementy kaskady MAPK wywołując fosforylację kolejnych białek, co prowadzi w końcowej fazie procesu do pobudzenia NUR-77 i do programowanej śmierci komórki [12].

### ODDZIAŁYWANIE $\beta$ -ARESTYN Z PDE4

Obserwacje poczynione niedawno przez Perry'ego i wsp. [82] pozwoliły na poznanie kolejnej roli  $\beta$ -arestyn. Okazało się mianowicie, że układ GRK i  $\beta$ -arestyna, który odczuła  $\beta_2$ AR, nie tylko wpływa hamująco na wytwarzanie cAMP, ale także przyspiesza lokalną degradację nukleotydu. Było to zbieżne z obserwacją, że fosfodiesteraza 4D (PDE4D), swoiście hydrolizująca cAMP, wiąże się do tego receptora [82]. Występujące w wielu izoformach PDE4 są ważnym elementem metabolizmu cAMP w komórkach układu odpornościowego i przypisuje się im istotną rolę w przebiegu procesów zapalnych, a także w chorobach o podłożu alergicznym, np. astmie [25,36,39]. Białkiem łącznikowym w procesie translokacji PDE4D z cytosolu do receptora może

być zarówno  $\beta$ -arestyna 1, jak i  $\beta$ -arestyna 2. Stwierdzono, że obie wiążą co prawda wszystkie izoformy PDE4, ale preferencyjnie wiązana jest PDE4D [10]. Sugerowało to istnienie swoistych, charakterystycznych miejsc wiązania  $\beta$ -arestyn znajdujących się na PDE4D. Obszar ten zidentyfikowano jako składający się z 88 aminokwasów region znajdujący się na N-końcu PDE4D5 [10]. Konsekwencją translokacji PDE4 w pobliżu  $\beta_2$ AR jest zmiana lokalnego stężenia cAMP, a co za tym idzie aktywności regulowanej przez nukleotyd kinazy (PKA) i fosforylowanego przez nią receptora [5]. Niedawno wykazano również, że aktywacja kompleksu TCR/CD28 w limfocytach T prowadzi do przemieszczania się  $\beta$ -arestyn wraz z PDE4 do wysepki lipidowych, co wpływa na obniżenie lokalnego stężenia cAMP i wzmocnienia odpowiedzi tych komórek [1].

### WPLYW $\beta$ -ARESTYN NA AKTYWNOŚĆ NF- $\kappa$ B

Kolejne, nieznanie wcześniej, oblicze arestyn ujawniono, kiedy okazało się, że mogą one modulować również aktywność jednego z najistotniejszych w odpowiedzi odpornościowej czynników transkrypcyjnych, jakim jest jądrowy czynnik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), pod kontrolą którego pozostają geny wielu cytokin, cząstek adhezyjnych i enzymów. W stanie nieaktywnym NF- $\kappa$ B połączony jest w cytosolu z podjednostką inhibitorową (I $\kappa$ B). Aktywacja prowadzi do fosforylacji I $\kappa$ B, jej ubikwitynacji i degradacji, co umożliwia NF- $\kappa$ B translokację do jądra komórki [90]. Wpływ  $\beta$ -arestyn na aktywności NF- $\kappa$ B pierwszy raz zaobserwowano przy nadekspresji zarówno  $\beta$ -arestyny 1, jak i  $\beta$ -arestyny 2. Stwierdzono wówczas obniżenie aktywności NF- $\kappa$ B [101]. Jednocześnie zaobserwowano, że w wyniku zahamowania ekspresji endogennych  $\beta$ -arestyn wzrost aktywności NF- $\kappa$ B następował jedynie przy redukcji poziomu  $\beta$ -arestyny 1. Sugerowało to, że endogenna  $\beta$ -arestyna 1 znacznie silniej hamuje NF- $\kappa$ B, chociaż przy nadekspresji skutki zahamowania obserwowano dla każdej z nich. Być może  $\beta$ -arestyna 2 w większym stężeniu jest zdolna do naśladowania efektu wywieranego przez  $\beta$ -arestynę 1. Podobną rozbieżność skutków nadekspresji i redukcji  $\beta$ -arestyn obserwowano w procesach regulowanych przez kinazy ERK. Obniżenie poziomu endogennej  $\beta$ -arestyny 2 eliminowa-

ło aktywację ERK, podczas gdy redukcja poziomu  $\beta$ -arestyny 1 powodowała wzrost ich aktywności [2]. Ostatnio stwierdzono, że pobudzenie receptora  $\beta_2$ AR w widoczny sposób wzmacniało oddziaływanie  $\beta$ -arestyny 2 z inhibitorową podjednostką I $\kappa$ B. Zauważono, że  $\beta$ -arestyna 2 oddziaływała z I $\kappa$ B i w ten sposób zapobiegała jej fosforylacji i degradacji. Wskazuje to na istotny udział  $\beta$ -arestyny 2 w przenikaniu sygnałów zależnych od receptora  $\beta_2$ AR i NF- $\kappa$ B i tym samym na nieznanego dotychczas mechanizmu regulacji systemu immunologicznego przez współczulny układ nerwowy [23].

### PODSUMOWANIE

W przedstawionej pracy, zgodnie z jej tytułem, skupiliśmy się głównie na omówieniu roli arestyn w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Jest jednak jeszcze inny aspekt badań związanych z arestynami. Arestyna siatkówkowa okazała się silnym immunogenem wywołującym doświadczone zapalenie błony naczyniowej i siatkówki oka [92]. Już dawno stwierdzono występowanie autooprzeciwciał przeciwko arestynie siatkówkowej i  $\beta$ -arestynom, pojawiających się w surowicach pacjentów chorych na choroby neurodegeneracyjne i zapalne narządu wzroku [77]. Późniejsze badania nie wykazały jednak istotnej korelacji pomiędzy częstością występowania tych przeciwciał, a daną chorobą [29,40]. Być może dokładniejsze metody detekcji i charakterystyki przeciwciał antyarestynowych umożliwiłyby znalezienie takiego związku.

Pomimo niemal 20 lat, jakie minęły od odkrycia pierwszych arestyn liczba prac ukazujących się każdego roku na ich temat wzrosła ponad dwukrotnie w okresie ostatnich pięciu lat w porównaniu z latami wcześniejszymi. Świadczy to o wzroście zainteresowania tymi białkami, będącym wynikiem odkrycia ich nowych funkcji, omówionych w tej pracy. Biorąc pod uwagę szerokie zakres działania arestyn w komórce, związany z ich możliwością tworzenia „rusztowań białkowych”, można się spodziewać, że najbliższe lata przyniosą kolejne doniesienia o nowych funkcjach arestyn i poszerzą wiedzę dotyczącą tych rozpoznanych niedawno.

### PIŚMIENICTWO

- [1] Abrahamson H., Baillie G., Ngai J., Vang T., Nika K., Ruppelt A., Mustelin T., Zaccolo M., Houslay M., Tasken K.: TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling. *J. Immunol.*, 2004; 173: 4847–4858
- [2] Ahn S., Nelson C.D., Garrison T.R., Miller W.E., Lefkowitz R.J.: Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 1740–1744
- [3] Anborgh P.H., Seachrist J.L., Dale L.B., Ferguson S.S.: Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol. Endocrinol.*, 2000; 14: 2040–2053
- [4] Attramadal H., Arriza J.L., Aoki C., Dawson T.M., Codina J., Kwatra M.M., Snyder S.H., Caron M.G., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -arrestin2, a novel member of the arrestin/ $\beta$ -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 17882–17890
- [5] Baillie G.S., Sood A., McPhee I., Gall I., Perry S.J., Lefkowitz R.J., Houslay M.D.:  $\beta$ -arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates  $\beta$ -adrenoceptor switching from G<sub>s</sub> to G<sub>i</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 940–945
- [6] Barak L.S., Ferguson S.S., Zhang J., Caron M.G.: A  $\beta$ -arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 27497–27500
- [7] Barak L.S., Warabi K., Feng X., Caron M.G., Kwatra M.M.: Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and  $\beta$ -arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7565–7569
- [8] Barańska J.: Współzależności między szlakami przekazywania sygnałów w komórce – rola białek G w tych procesach. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 133–146
- [9] Barlic J., Andrews J.D., Kelvin A.A., Bosinger S.E., DeVries M.E., Xu L., Dobransky T., Feldman R.D., Ferguson S.S.G., Kelvin D.J.: Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through  $\beta$ -arrestin by CXCR1. *Nat. Immunol.*, 2000; 1: 227–233
- [10] Bolger G.B., McCahill A., Huston E., Cheung Y.F., McSorley T., Baillie G.S., Houslay M.D.: The unique amino-terminal region of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase isoform confers preferential interaction with  $\beta$ -arrestins. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 49230–49238
- [11] Burack W.R., Shaw A.S.: Signal transduction: Hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12: 211–216



- [12] Castro-Oregon S., Rao R.V., del Rio G., Chen S.F., Poksay K.S., Rabizadeh S., Vesce S., Zhang X.K., Swanson R.A., Bredesen D.E.: Alternative, nonapoptotic programmed cell death. Mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17543–17553
- [13] Claing A., Laporte S.A., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.*, 2002; 66: 61–79
- [14] Craft C.M., Whitmore D.H., Wiechmann A.F.: Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 4613–4619
- [15] DeFea K.A., Zalevsky J., Thoma M.S., Dery O., Mullins R.D., Bunnett N.W.:  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.*, 2000; 148: 1267–1281
- [16] Dejda A., Gorczyca W.A.: Zmiany ewolucyjne układu fotoreceptyjnego szyszynki kręgowców. *Post. Biol. Kom.*, 2001; 28: 571–588
- [17] Dejda A., Matczak I., Nowak J.Z.: Rodopsyna – receptor światła i układ modelowy w badaniach receptorowych. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, PWN, Warszawa 2004, 237–244
- [18] Dinh D.T., Qian H., Seeber R., Lim E., Pfleger K., Eidne K.A., Thomas W.G.: Helix I of  $\beta$ -arrestin is involved in postendocytic trafficking but is not required for membrane translocation, receptor binding and internalization. *Mol. Pharmacol.*, 2005; 67: 375–382
- [19] Ferguson S.S.G.: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.*, 2001; 53: 1–24
- [20] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 7478–7483
- [21] Gainetdinov R.R., Premont R.T., Bohn L.M., Lefkowitz R.J., Caron M.G.: Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2004; 27: 107–144
- [22] Ganong W.F.: Podstawy fizjologii lekarskiej W: Fizjologia, PZWL, 1994; 194–197
- [23] Gao H., Sun Y., Wu Y., Luan B., Wang Y., Qu B., Pei G.: Identification of  $\beta$ -arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- $\kappa$ B pathways. *Mol. Cell.*, 2004; 14: 303–317
- [24] Ge L., Ly Y., Hollenberg M., DeFea K.: A  $\beta$ -arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 34418–34426
- [25] Gienbycz M.A.: Phosphodiesterase 4 and tolerance to beta 2-adrenoceptor agonists in asthma. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1996; 17: 331–336
- [26] Goodman O.B. Jr, Krupnick J.G., Santini F., Gurevich V.V., Penn R.B., Gagnon A.W., Keen J.H., Benovic J.L.:  $\beta$ -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Nature*, 1996; 383: 447–450
- [27] Gorczyca W.A.: Role of calcium ions in vertebrate phototransduction. *Pol. J. Pharmacol.*, 1999; 51: 167–172
- [28] Gorczyca W.A.: Cyklazy guanylanowe i ich udział w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, PWN, Warszawa 2004, 64–89
- [29] Gorczyca W.A., Ejma M., Witkowska D., Misiuk-Hojlo M., Kuropatwa M., Mulak M., Szymaniec S.: Retinal antigens are recognized by antibodies present in sera of patients with multiple sclerosis. *Ophthalmic Res.*, 2004; 36: 120–123
- [30] Gurevich V.V., Benovic J.L.: Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 6010–6016
- [31] Hall R.A., Lefkowitz R.J.: Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ. Res.*, 2002; 91: 672–680
- [32] Hall R.A., Premont R.T., Lefkowitz R.J.: Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.*, 1999; 145: 927–932
- [33] Han M., Gurevich V.V., Vishnivetskiy S.A., Sigler P.B., Schubert C.: Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure (Camb.)*, 2001; 9: 869–880
- [34] Hausdorff W.P., Bouvier M., O'Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: Phosphorylation sites on two domains of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 12657–12665
- [35] Hirsch J.A., Schubert C., Gurevich V.V., Sigler P.B.: The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, 1999; 97: 257–269
- [36] Houslay M.D.: PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001; 69: 249–315
- [37] Hyde D.R., Mecklenburg K.L., Pollock J.A., Vihtelic T.S., Benzer S.: Twenty *Drosophila* visual system cDNA clones: one is a homolog of human arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 1008–1012
- [38] Imamoto Y., Tamura C., Kamikubo H., Kataoka M.: Concentration-dependent tetramerization of bovine visual arrestin. *Biophys. J.*, 2003; 85: 1186–1195
- [39] Jacob C., Martin-Chouly C., Lagente V.: Type 4 phosphodiesterase-dependent pathways: role in inflammatory processes. *Therapie*, 2002; 57: 163–168
- [40] Jankowska R., Witkowska D., Porębska I., Kuropatwa M., Kurowska E., Gorczyca W.A.: Serum antibodies to retinal antigens in lung cancer and sarcoidosis. *Pathobiology*, 2004; 71: 323–328
- [41] Johnson E.C., Bohn L.M., Barak L.S., Brise R.T., Nassel D.R., Caron M.G., Taghert P.H.: Identification of *Drosophila* neuropeptide receptors by G protein-coupled receptors- $\beta$ -arrestin2 interactions. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 52172–52178
- [42] Kim Y.M., Barak L.S., Caron M.G., Benovic J.L.: Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 16837–16846
- [43] Kim Y.M., Benovic J.L.: Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 30760–30768
- [44] Kirchhausen T.: Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1999; 15: 705–732
- [45] Krasel C., Bunemann M., Lorenz K., Lohse M.J.:  $\beta$ -arrestin binding to the  $\beta_2$ -adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 9528–9535
- [46] Krasel C., Vilardaga J.P., Bunemann M., Lohse M.J.: Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004; 32: 1029–1031
- [47] Krueger K.M., Daaka Y., Pitcher J.A., Lefkowitz R.J.: The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 5–8
- [48] Krupnick J.G., Benovic J.L.: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998; 38: 289–319
- [49] Krupnick J.G., Goodman O.B.Jr., Keen J.H., Benovic J.L.: Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 15011–15016
- [50] Kuhn H., Hall S.W., Wilden U.: Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.*, 1984; 176: 473–478
- [51] Laporte S.A., Miller W.E., Kim K.M., Caron M.G.:  $\beta$ -arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization. Identification of a  $\beta$ -arrestin binding site in  $\beta_2$ -adaptor. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 9247–9254
- [52] Laporte S.A., Oakley R.H., Holt J.A., Barak L.S., Caron M.G.: The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta_2$ -adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 23120–23126
- [53] Laporte S.A., Oakley R.H., Zhang J., Holt J.A., Ferguson S.S.G., Caron M.G., Barak L.S.: The  $\beta_2$ -adrenergic receptor/ $\beta$  arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 3712–3717
- [54] Lefkowitz R.J.: G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 18677–18680
- [55] Lefkowitz R.J., Pitcher J., Krueger K., Daaka Y.: Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv. Pharmacol.*, 1998; 42: 416–420
- [56] Lefkowitz R.J., Whalen E.J.:  $\beta$ -arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2004; 16: 162–168
- [57] Lin F.T., Chen W., Shenoy S., Cong M., Exum S.T., Lefkowitz R.J.: Phosphorylation of  $\beta$ -arrestin2 regulates its function in internalization of  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Biochemistry*, 2002; 41, 10692–10699
- [58] Lin F.T., Krueger K.M., Kendall H.E., Daaka Y., Fredericks Z.L., Pitcher J.A., Lefkowitz R.J.: Clathrin-mediated endocytosis of the  $\beta$ -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of  $\beta$ -arrestin1. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 31051–31057
- [59] Lin F.T., Miller W.E., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.: Feedback regulation of  $\beta$ -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 15971–15974

- [60] Lohse M.J., Benovic J.L., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: Beta-arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 1990; 248: 1547–1550
- [61] Luttrell L.M., Ferguson S.S.G., Daaka Y., Miller W.E., Maudsley S., Della Rocca G.J., Lin F.T., Kawakatsu H., Owada K., Luttrell D.K., Caron M.G., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -Arrestin-dependent formation of  $\beta_2$  adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 1999; 283: 655–661
- [62] 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: 455–465
- [63] Luttrell L.M., Roudabush F.L., Choy E.W., Miller W.E., Field M.E., Pierce K.L., Lefkowitz R.J.: Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by  $\beta$ -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 2449–2454
- [64] Marshall C.J.: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 1995; 80: 179–185
- [65] Martin N.P., Lefkowitz R.J., Shenoy S.K.: Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 45954–45959
- [66] McDonald P.H., Chow C.W., Miller W.E., Laporte S.A., Field M.E., Lin F.T., Davis R.J., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, 2000; 290: 1574–1577
- [67] McDonald P.H., Cote N.L., Lin F.T., Premont R.T., Pitcher J.A., Lefkowitz R.J.: Identification of NSF as a  $\beta$ -arrestin1-binding protein. Implications for  $\beta_2$ -adrenergic receptor regulation. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 10677–10680
- [68] Milano S.K., Pace H.C., Kim Y.M., Brenner C., Benovic J.L.: Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry*, 2002; 41: 3321–3328
- [69] Miller W.E., Maudsley S., Ahn S., Khan K.D., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of  $\beta$ -arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 11312–11319
- [70] Moffett S., Adam L., Bonin H., Loisel T.P., Bouvier M., Mouillac B.: Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 21490–21497
- [71] Nakagawa M., Orii H., Yoshida N., Jojima E., Horie T., Yoshida R., Haga T., Tsuda M.: Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 5112–5118
- [72] Nalepa I., Vetulani J.: Receptory adrenergiczne. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. PWN, Warszawa 2004, 245–273
- [73] Neer E.J.: G proteins. Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.*, 1994; 3: 3–14
- [74] Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Barak L.S., Caron M.G.: Association of  $\beta$ -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 32248–32257
- [75] Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Barak L.S., Caron M.G.: Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin complexes after receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 19452–19460
- [76] Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Caron M.G., Barak L.S.: Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ -arrestin1, and  $\beta$ -arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 17201–17210
- [77] Palczewski K.: Structure and function of arrestins. *Protein Sci.*, 1994; 3: 1355–1361
- [78] Palczewski K., Hargrave P.A.: Studies of ligand binding to arrestin. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 4201–4206
- [79] Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000; 289: 739–745
- [80] Parent C.A., Devreotes P.N.: A cell's sense of direction. *Science*, 1999; 284: 765–770
- [81] Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 2001; 22: 153–183
- [82] Perry S.J., Baillie G.S., Kohout T.A., McPhee I., Magiera M.M., Ang K.L., Miller W.E., McLean A.J., Conti M., Houslay M.D., Lefkowitz R.J.: Targeting of cyclic AMP degradation to  $\beta_2$ -adrenergic receptors by  $\beta$ -arrestins. *Science*, 2002; 298: 834–836
- [83] Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J.: G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 653–692
- [84] Post G.R., Collins L.R., Kennedy E.D., Moskowitz S.A., Aragay A.M., Goldstein D., Brown J.H.: Coupling of the thrombin receptor to  $G_{12}$  may account for selective effects of thrombin on gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *Mol. Biol. Cell*, 1996; 7: 1679–1690
- [85] Qian H., Pipolo L., Thomas W.G.: Association of  $\beta$ -Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. *Mol. Endocrinol.*, 2001; 15: 1706–1719
- [86] Revankar C.M., Vines C.M., Cimino D.F., Prossnitz E.R.: Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 24578–24584
- [87] Shenoy S.K., Lefkowitz R.J.: Multifaceted roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signaling. *Biochem. J.*, 2003; 375: 503–515
- [88] Shenoy S.K., McDonald P.H., Kohout T.A., Lefkowitz R.J.: Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated  $\beta_2$ -adrenergic receptor and  $\beta$ -arrestin. *Science*, 2001; 294: 1307–1313
- [89] Shinohara T., Dietzschold B., Craft C.M., Wistow G., Early J.J., Donoso L.A., Horwitz J., Tao R.: Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 6975–6979
- [90] Siednienko J., Gorczyca W.A.: Regulacja aktywności NF- $\kappa$ B. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 19–32
- [91] Strader C.D., Sigal I.S., Dixon R.A.: Structural basis of beta-adrenergic receptor. *FASEB J.*, 1989; 3: 1825–1832
- [92] Sueda J., Hikita N., Mochizuki M., Jimi A., Kojiro M.: Kinetics of apoptotic cells in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000; 41: 799–804
- [93] Sun Y., Cheng Z., Ma L., Pei, G.:  $\beta$ -arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 49212–49219
- [94] Vishnivetskiy S.A., Hosey M.M., Benovic J.L., Gurevich V.V.: Mapping the arrestin-receptor interface: structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1262–1268
- [95] Vishnivetskiy S.A., Paz C.L., Schubert C., Hirsch J.A., Sigler P.B., Gurevich V.V.: How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 11451–11454
- [96] von Zastrow M., Kobilka B.K.: Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 3530–3538
- [97] Wacker W.B.L., Donoso L.A., Kalsow C.M., Yankeelov J.A.Jr., Organisciak D.T.: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.*, 1977; 119: 1949–1958
- [98] Walker J.K.L., Fong A.M., Lawson B.L., Savov J.D., Patel D.D., Schwartz D.A., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 566–574
- [99] Whitmarsh A.J., Davis R.J.: Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 1996; 74: 589–607
- [100] Wilden U., Hall S.W., Kühn H.: Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 1174–1178
- [101] Witherow D.S., Garrison T.R., Miller W.E., Lefkowitz R.J.:  $\beta$ -arrestin inhibits NF- $\kappa$ B activity by means of its interaction with the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 8603–8607
- [102] Xiao K., Shenoy S.K., Nobles K., Lefkowitz R.J.: Activation-dependent conformational changes in  $\beta$ -arrestin 2. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 55744–55753
- [103] Yamaki K., Takahashi Y., Sakuragi S., Matsubara K.: Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 142: 904–910
- [104] Zhang H., Huang W., Zhang H., Zhu X., Craft C.M., Baehr W., Chen C.K.: Light-dependent redistribution of visual arrestin and transducin subunits in mice with defective phototransduction. *Mol. Vis.*, 2003; 9: 231–237
- [105] Zhu X., Brown B., Li A., Mears A.J., Swaroop A., Craft C.M.: GRK1-dependent phosphorylation of S and M opsins and their binding to cone arrestin during cone phototransduction in the mouse retina. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 6152–6160