

4. GRKs y arrestinas en la regulación de receptores cerebrales

FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid, c/ Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma, 28049 Madrid.

RESUMEN

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y las arrestinas representan un importante punto de convergencia de diferentes rutas de señalización. Estas proteínas fueron inicialmente identificadas como componentes críticos en la desensibilización e internalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), una familia de centenares de proteínas de membrana de gran importancia fisiológica y farmacológica. Datos más recientes indican que tanto GRKs como arrestinas pueden también desempeñar un papel en la propagación de señal, contribuyendo a ensamblar complejos multimoleculares en el entorno del receptor, actuando como proteínas adaptadoras que interactúan con diversas proteínas implicadas en señalización celular. La utilización de modelos celulares y animales está aportando abundante información sobre el papel de estas proteínas en el control de las funciones del sistema nervioso, donde se encuentran abundantemente expresadas. El mejor conocimiento de las funciones de isoformas específicas de GRKs y arrestinas en la señalización de diversos receptores cerebrales permitirá definir su participación en procesos fisiopatológicos y su posible utilidad diagnóstica o terapéutica.

ABSTRACT

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and arrestins represent an important point of convergence of different signalling routes. These proteins were in-

initially identified as central players in the desensitization and internalization of G protein-coupled receptors (GPCR), a family of hundreds of membrane proteins of key physiological and pharmacological importance. On top of that, recent data indicate that both GRKs and arrestins can also play a role in signal propagation by helping assemble macromolecular signalosomes in the receptor environment, acting as agonist-regulated scaffolds able to interact with a variety of proteins involved in cell signaling. The use of cellular and animal models is shedding new light about the role of GRKs and arrestins in the nervous systems, where these proteins are abundantly expressed. A better knowledge of the functional role of specific GRK and arrestins isoforms in the modulation and signaling of relevant brain receptors would allow to delineate its participation in physiopathological processes and to evaluate its potential use as diagnostic tools or therapeutic targets.

INTRODUCCIÓN

La familia de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) es un grupo de siete serina/treonina quinasas en mamíferos, que específicamente reconocen y fosforilizan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) activados, conduciendo a la desensibilización del receptor (1,2). La fosforilación del receptor mediada por GRKs provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas arrestinas, que bloquean la capacidad de los GPCR de interactuar con proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización. Como resultado de la unión de β -arrestinas, los receptores fosforilados son el objeto de endocitosis mediada por clatrina, un proceso que finalmente re-sensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática (3,4).

Los miembros de la familia GRK pueden ser subdivididos en tres grupos principales basados en homología de secuencias (2): la familia rodopsina quinasa o GRK visuales (GRK1 y GRK7), la subfamilia de la quinasa del receptor β -adrenérgico (GRK2/GRK3), y la subfamilia GRK4 (GRK4, GRK5 y GRK6). GRK2, 3, 5 y 6 están expresadas ubicuamente en los tejidos de los mamíferos. Todas ellas comparten una arquitectura de dominios funcionales similar, con un dominio catalítico central bien conservado, un dominio RH (Regulator of G protein signalling homology domain) en la región amino-terminal, y una zona C-terminal que contiene diversos determinantes para su interacción con la membrana plasmática.

En cuanto a las arrestinas, también existen dos tipos de arrestinas visuales, cuya expresión se restringe a las células de la retina, y otras dos isoformas somáticas, la beta-arrestina 1 (a veces denominada arrestina 2) y la beta-arrestina

2 (a veces anotada como arrestina 3) que se expresan en todos los tejidos (5, 6). Las beta-arrestinas sufren un notable cambio conformacional tras su unión al receptor activado, lo que, además de impedir la señalización del GPCR a la proteína G, permite el reclutamiento de la maquinaria de internalización, como clatrina o AP-2 (4, 6). Este fenómeno puede además ayudar a potenciar la activación de caminos de señalización adicionales, en los que las arrestinas actúan como adaptadores (“scaffolds”) regulados por agonistas. En este aspecto, se ha mostrado que las β -arrestinas pueden reclutar diferentes moléculas señalizadoras, como c-Src, JNK-3, componentes de la cascada Raf/MEK/ERK, la fosfodiesterasa PDE4, el regulador del citoesqueleto Ral-GDS, componentes de la vía de señalización NF κ B o la ubiquitina ligasa Mdm2, entre otros, al complejo del receptor (revisado en refs. 3 y 6). Por lo tanto, el reclutamiento de arrestinas mediado por GRK es fundamental para provocar la modulación de importantes cascadas de señalización intracelular por GPCR.

Por otra parte, datos recientes muestran que GRKs y arrestinas pueden también interactuar funcionalmente con otros tipos de receptores de membrana, como los receptores de PDGF o EGF con actividad tirosina-quinasa (7, 8, 9). Están siendo también identificados un número creciente de sustratos citoplásmicos de las GRKs (en particular de GRK2) (10, 11), así como interacciones funcionales independientes de su actividad quinasa, con varias proteínas implicadas en señalización y tráfico celular, como las subunidades G α q y G β γ de las proteínas G, la enzima PI3K, clatrina, GIT, caveolina, MEK, AKT, y RKIP (11, 12, 13), lo que amplía sus potenciales papeles fisiológicos (ver Tabla 1).

Por último, es importante tener en cuenta que se están detectando cambios en los niveles de GRKs y arrestinas en diversas situaciones fisiopatológicas inflamatorias (14), tumorales (15), cardiovasculares (16) o del sistema nervioso (5). También se están poniendo de manifiesto muy diversos mecanismos capaces de modular la expresión, estabilidad, estado de fosforilación y actividad de estas proteínas, particularmente de la isoforma GRK2 (11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ver también Tabla 1).

En base a todo lo anterior, es de esperar que cambios en los niveles y/o funcionalidad de las GRKs y de las arrestinas puedan tener importantes repercusiones fisiopatológicas. Puesto que más del 90% de los GPCRs conocidos se expresan en el cerebro (23) y están implicados en prácticamente todas las funciones vitales controladas por el sistema nervioso, el estudio del papel que desempeñan GRKs y arrestinas en el control de los receptores cerebrales es un campo de gran interés.

TABLA 1. *Resumen de las interacciones funcionales de GRKs con otras proteínas celulares*

Proteína(s)	Subtipos GRK	Consecuencias funcionales
GPCRs	2-6	Fosforilación de GPCR.
Gα	2,3	Inhibición de Gαq y de estimulación de PLCβ.
Gαγ	2,3	Translocación de GRK a la membrana y aumento de actividad GRK.
MEK1/2	2	Inhibición de la estimulación de ERK1/2 por quimioquinas en linfocitos y en astrocitos.
Akt	2	Inhibición de la actividad Akt
PI3K	2	Favorece reclutamiento de PI3K a la membrana y de endocitosis de receptores.
GIT	2,3,5,6	La translocación de GIT1 a la membrana requiere GRK2. Interacción GIT1/GRK2 importante en migración epitelial.
RKIP	2	RKIP fosforilada por PKC se suelta de Raf-1 y se une a GRK2 para inhibir su actividad.
Calmodulina	2-6	Inhibición con potencia muy variable de las diversas GRKs.
p38	2	GRK2 fosforila a p38 e impide su activación y actividad.
p105	2,5,6	GRK5 fosforila 105 y previene su degradación inducida por LPS.
Hsp90	2,3,5,6	Favorece la maduración de GRK2 y estabiliza los niveles de GRK3, 5 y 6.
actina	5	Inhibición de la actividad GRK5.
α-actinina	2-6	Inhibición de la actividad catalítica de GRKs.
caveolina	2,3,5	Inhibición de GRK2 en determinadas localizaciones subcelulares.
ezrina	2	La fosforilación de ezrina por GRK2 favorece su conformación activa.
Tubulina	2,5	Fosforilación de tubulina.
synucleína	2,5	Fosforilación de synucleína que conlleva menor unión a fosfolípidos.
NHERF	6	Fosforilación de NHERF.
DREAM	2,6	Fosforilación de DREAM que afecta al tráfico de canales de potasio K 4.2.
Proteína ribosómal P2	2	La fosforilación por GRK2 aumenta su activación.
PKC	2,5	PKC fosforila GRK2 y la activa, y fosforila GRK5 inhibiéndola.
PIP2	2,6	Reclutamiento de GRKs a la membrana.
PKA	2,5	La fosforilación por PKA aumenta la unión de GRK2 a Gαγ y por tanto su actividad.

TABLA 1. *Resumen de las interacciones funcionales de GRKs con otras proteínas celulares (Continuación)*

Proteína(s)	Subtipos GRK	Consecuencias funcionales
ERK1/2	2	Fosforila a GRK2, inhibiendo su actividad y promoviendo su degradación.
Mdm2	2	Mdm2 es una E3-Ubiquitina ligasa de GRK2 y promueve su degradación.
clatrina	2	La asociación GRK/clatrina favorece internalización de GPCR.
R-smads	2	La fosforilación de R-smads previene su localización nuclear.
HDAC5	5	GRK5 fosforila a HDAC5.
fosducina	2	La fosforilación de fosducina por GRK2 inhibe su asociación a Gβγ.
Smo	2	GRK2 fosforila Smo y es precisa para su señalización.
NCS-1	2	La interacción NCS1-GRK2 modula la desensibilización de receptores D2 de dopamina.
ENaC	2	La interacción mantiene activo el canal.
Nedd4, Nedd4-2	2	Sustratos de GRK2.

La descripción de la mayor parte de estas interacciones se recoge en diversas revisiones recientes (ver referencias 2, 3, 5, 7, 11 y 13).

GRK2

Distribución de GRK2 en cerebro y alteraciones en distintas situaciones

La quinasa GRK2 tiene una amplia expresión en el cerebro (24). El mensajero de esta quinasa se distribuye de forma prácticamente uniforme en todas las capas corticales, varios núcleos talámicos e hipotalámicos, el hipocampo, la substantia nigra, el locus coeruleus y otras regiones. En el caudado-putamen se detectan unos niveles de expresión menores (25). Como ha descrito nuestro laboratorio, la expresión de GRK2 está regulada durante el desarrollo, destacándose un notable incremento durante la segunda semana post-parto (26).

Se han observado alteraciones en la expresión de GRK2 tras determinados tratamientos farmacológicos y en diversas situaciones patológicas del cerebro (ver resumen en Figura 1). Así, en pacientes con depresión hay un aumento de la inmunoreactividad de GRK2 en la corteza prefrontal, mientras que tratamientos a largo plazo con antidepresivos disminuyen los niveles de esta prote-

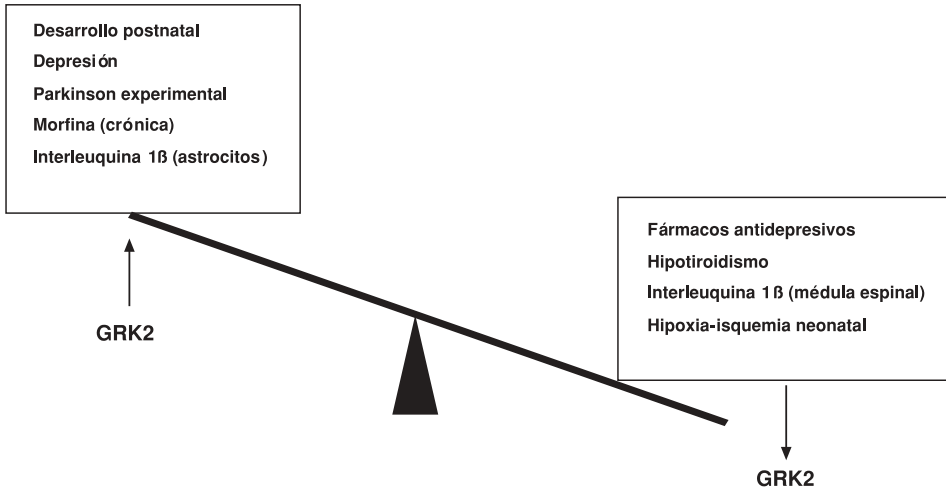


FIGURA 1. *Diversas situaciones y estímulos que modulan la expresión de GRK2 en el sistema nervioso. Ver texto principal para detalles.*

ina (27). GRK2 se encuentra incrementado igualmente en el núcleo caudado de monos con enfermedad de Parkinson experimental sugiriendo un posible papel para esta quinasa en la regulación de receptores de dopamina in vivo (28). Sin embargo, la respuesta de ratones parcialmente deficientes en GRK2 a un tratamiento con cocaína (que bloquea el transportador de dopamina e incrementa por tanto los niveles disponibles de este mensajero) o con el agonista del receptor de dopamina apomorfina no resulta en cambios muy significativos en el comportamiento locomotor de estos animales, sugiriendo que una pérdida parcial de GRK2 no tiene un impacto decisivo en las respuestas mediadas por dopamina (29). Quizá futuros estudios con ratones KO-específicos en regiones cerebrales concretas puedan ayudar a contestar esta pregunta.

El hipotiroidismo experimental también parece modificar los niveles de GRK2 en cerebro. Nuestro laboratorio ha encontrado en ratas hipotiroideas una disminución del 25% en los niveles de GRK2 en corteza cerebral, lo que podría afectar a la regulación de muchos receptores cerebrales (26).

GRK2, receptores μ -opioides y dolor

Diversas evidencias experimentales sugieren un papel para GRK2 en la regulación de receptores μ -opioides (μ OR). Varios grupos, incluido el nuestro en

colaboración con el grupo del Dr. García-Sevilla, han encontrado que los niveles de GRK2 están aumentados en el locus coeruleus y en la corteza de ratas crónicamente tratadas con morfina, así como en las membranas cerebrales de autopsias provenientes de humanos adictos a opiáceos (30-32). El tratamiento crónico con etorfina, pero no con morfina, produce un aumento significativo de los niveles de proteína GRK2 en membranas de médula espinal de ratón (33). GRK2 también parece mediar la desensibilización de receptores opioides en células gabaérgicas que proyectan a la médula espinal (34). Todo ello sugiere que GRK2 contribuye a la desensibilización de receptor μ -opioides in vivo y que puede jugar un papel muy importante en la tolerancia a opiáceos y en la dependencia.

Aunque datos preliminares han sugerido que las respuestas analgésicas a morfina no están alteradas en ratones hemicigotos para GRK2 (35), otro manuscrito reciente indica que los niveles de expresión de GRK2 están fuertemente reducidos en la médula espinal de ratas neuropáticas, y que una reducción del 50% de los niveles de GRK2 aumentan la sensibilización a estímulos mecánicos promovidos por situaciones inflamatorias (36). De hecho, se ha observado que la sensibilidad a diversos receptores tipo GPCR implicados en la transmisión del dolor, como el receptor de neuroquinina 1 (NK1), receptores metabotrópicos de glutamato y el receptor de CGRP está profundamente afectada tanto por los niveles de GRK2 como de GRK6 (37, 38, 39, 40). Todo ello, junto con el hecho de que las GRKs juegan un papel muy importante en procesos inflamatorios, sugiere que estas quinasas y en particular GRK2 pueden desempeñar un papel en el contexto del dolor producido por inflamación o trauma tisular. El papel de GRK2 en estos contextos de hiperalgesia aguda o crónica está siendo muy activamente investigado por el grupo de las Dras. Cobi Heijnen y A. Kavelaars. En este sentido, es interesante constatar que los niveles de expresión de las GRKs puede ser modificadas en tejido nervioso por citoquinas proinflamatorias. Así, la interleuquina 1 β disminuye la expresión de GRK2 en cortex de médula espinal (41). Por el contrario, nuestro grupo ha observado en colaboración con la Dra. Cobi Heijnen que esta citoquina aumenta los niveles de GRK2 en astrocitos, lo que conduce a una señalización alterada de quimioquinas en este tipo celular (42).

GRK2 y situaciones de hipoxia-isquemia

Se ha sugerido también un papel de los niveles de GRK2 en la respuesta del cerebro inmaduro a hipoxia-isquemia. El daño cerebral por hipoxia-isquemia se regula en parte por neurotransmisores y quimioquinas que señalizan a

través de GPCRs. GRK2 protegería en principio de un exceso de estimulación de esos receptores induciendo su desensibilización. Es interesante que daño cerebral hipóxico-isquémico neonatal es acompañado por una reducción en los niveles cerebrales de GRK2 (43). Experimentalmente se ha mostrado que ratones de 9 días hemicigotos para GRK2 muestran un mayor daño en materia blanca y gris a las tres semanas después de un episodio de hipoxia-isquemia que sus hermanos de camada, mostrando además una mayor infiltración por neutrófilos. Todo ello sugiere un papel importante para GRK2 en la modulación de estas vías de señalización relacionadas con daño hipóxico-isquémico.

GRK2 y señalización neuroendocrina

Desde el punto de vista neuroendocrino se ha indicado que GRK2 puede tener un papel en la regulación del receptor del factor liberador de corticotropina en la pituitaria anterior (44), así como en la modulación de la señalización de TSH y de la liberación de gonodotrofinas.

La expresión de GRK2 atenúa la señalización del receptor del factor liberador de gonadotrofinas GnRH en células de pituitaria, y suprime la secreción de la hormona luteinizante LH en respuesta a ese estímulo (45). Por otra parte, un aumento de los niveles de GRK2 en células FRTL-5 disminuye la respuesta de estas células a la hormona TSH, sugiriendo que esta quinasa está tónicamente implicada en la modulación de su receptor (46). Se ha sugerido también que la respuesta de los receptores de hormonas neuroendocrinas presentes en las células del sistema inmune pueda verse afectada por los cambios en los niveles de GRK2 que se producen en esas células en situaciones inflamatorias (47).

GRK2 y enfermedades neurodegenerativas

El posible papel de GRKs en enfermedades neurodegenerativas ha sido aún poco explorado. Las sinucleínas, unas proteínas altamente expresadas en el cerebro y relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer pueden ser fosforiladas tanto por GRK2 como GRK5 (48). Por otra parte, los niveles de GRK2 y GRK5 membranales se han encontrado significativamente reducidos en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer (49). Este cambio en los niveles de GRK2 precede a las alteraciones cognitivas y se correlaciona con una hiperactividad de GPCRs de trombina y glutamato en células de glía. Más recientemente se ha detectado una

relación positiva entre los niveles de GRK2 en sangre periférica y la severidad de la enfermedad en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (50). Sin embargo queda por determinar si esta expresión alterada en sangre refleja cambios en la expresión de GRK2 en el cerebro y si estos cambios son específicos de la enfermedad de Alzheimer frente a otras enfermedades neurodegenerativas. Aunque también se ha detectado la presencia de GRK2 en filamentos helicoidales apareados (“tangles”) en pacientes de esta enfermedad (51), el papel patológico de cambios en los niveles de esta quinasa es aún muy especulativo (52).

Relevancia de nuevas interacciones funcionales de GRK2

El paradigma científico actual siempre ha intentado correlacionar los cambios en la expresión o funcionalidad de GRK2 con la alteración de la señalización mediada por GPCRs, siempre considerando a GRK2 como un modulador negativo de estos receptores, de tal forma que incrementos en la actividad/ niveles de GRK2 u otras GRKs conducirían a una menor señalización, mientras que una disminución en esos parámetros conllevaría necesariamente una más potente transducción de la señal a través de GPCRs. Sin embargo, las nuevas funciones emergentes de GRK2 y de otras GRKs independientes de la fosforilación de GPCRs (Tabla 1) abren nuevas perspectivas y nuevas posibilidades de consecuencias funcionales de alteraciones en estas quinasas, que sólo ahora han comenzado a explorarse.

Entre los primeros ejemplos de estas nuevas funciones reguladoras de GRKs en cerebro se encuentra la capacidad de GRK2 de bloquear la señal de receptores metabotrópicos de glutamato de forma independiente de actividad quinasa y del reclutamiento de la proteína reguladora β -arrestina, y dependiente de su capacidad de interactuar con Gq (53). En otro contexto, nuestro grupo y el de la Dra Heijnen ha descrito que GRK2 atenúa la señalización de la quimioquina CCL2 en astrocitos a través de la regulación específica de las interfases PI3K-AKT y MEK/ERK, pero no a nivel de segundos mensajeros clásicos de GPCRs como son los niveles de calcio (42). La presencia de EGF se ha mostrado recientemente que fomenta la asociación de su receptor con GRK2, seguida por la fosforilación de GRK2 en residuos de tirosina, lo que incrementa el grado de activación de la quinasa y conduce a una mayor “downregulation” de receptores opiáceos co-expresados (9). La posibilidad de que GRK2 modifique el proceso de transmodulación de otros receptores GPCR por aquellos con actividad tirosina quinasa es una interesante posibilidad que todavía no ha sido explorada en el sistema nervioso. Lo mismo sucede con las posibles repercusiones funcionales en el cerebro de la capacidad de GRK2 de fosforilar sustratos no-GPCRs como tubulina, fosducina, canales

de sodio o la p38 MAP quinasa, o de su capacidad de interactuar con otras proteínas celulares (11,54). Por ejemplo, se ha descrito recientemente que la proteína GIT1, capaz de interactuar con GRKs, es un factor que promueve la agregación de huntingtina, y que GIT1 proteolizada se acumula en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Huntington (55). Quizá la acumulación de fragmentos de GIT1 capaces de unir a GRKs pueda alterar las funciones de éstas y su localización en las células nerviosas. Otra hipótesis interesante sugiere que el sensor de calcio neuronal NCS1, cuya expresión se encuentra alterada en esquizofrenia y en desórdenes bipolares, pueda contribuir a través de su interacción con GRK2 a la alteración de la regulación de receptores de dopamina en estas patologías (56,57).

GRK3

Distribución de GRK3 en el sistema nervioso

GRK3 también se expresa ampliamente en el Sistema nervioso central y periférico, aunque a niveles menores a los que lo hace GRK2 (24). En el sistema nervioso periférico GRK3 se encuentra significativamente expresada en neuronas olfativas y neuronas del ganglio dorsal, donde podría desempeñar un papel importante en la desensibilización de receptores de aromas y en la modulación de receptores α -adrenérgicos, respectivamente (58, 59, 60). De hecho, los ratones que carecen de GRK3 presentan una clara alteración de la respuesta a aromas en el epitelio olfativo (60, ver Tabla 2).

Regulación de receptores cerebrales por GRK3 e implicaciones fisiopatológicas

Diversas evidencias “in vitro” indican que GRK3 tiene un papel relevante en la regulación de receptores de dopamina en el cerebro (29). En este sentido es interesante destacar que la región del cromosoma 22q12 donde se encuentra el gen para GRK3 es un locus de susceptibilidad para el desarrollo de desórdenes bipolares (61). Por otra parte, polimorfismos en la zona 5'UTR del promotor de GRK3 se han asociado también con estas patologías (61). Estos hallazgos sugirieron que una desregulación de la expresión de GRK3 podría afectar la desensibilización de receptores de dopamina, lo que predispondría a determinados pacientes a esta alteración neurológica.

Otros datos recientes indican que el agente antipsicótico haloperidol disminuye los niveles de GRK3 en el caudado-putamen ventrolateral, mientras que este fárma-

GRKS Y ARRESTINAS EN LA REGULACIÓN DE RECEPTORES CEREBRALES

TABLA 2. *Patrón de expresión de GRKs y arrestinas y fenotipos de ratones que carecen de estas proteínas*

GRK o arrestina	Expresión	Fenotipo a que da lugar su carencia en el Sistema nervioso
GRK1	Retina (conos y bastones)	Ceguera nocturna de Oguchi (humano) Degeneración de retina (ratón)
GRK2	Ubicua, alta expresión en Cerebro.	Letal embrionario por hipoplasia cardiaca.
GRK3	Ubicua, menor expresión que GRK2 en cerebro	Desensibilización olfatoria alterada Regulación pulmonar por receptores muscarínicos alterada. Tolerancia reducida a opioides.
GRK4	Testículos y cerebro (bajos niveles)	No fenotipo en Sistema Nervioso.
GRK5	Ubicua	Regulación alterada de receptores M2-muscarínicos centrales y de pulmón, pero no de corazón.
GRK6	Ubicua	Regulación alterada de receptores de dopamina.
GRK7	Conos de la retina	(El gen no está presente en ratones pero sí en humanos).
Arrestina visual	Conos de la retina	Ceguera nocturna de Oguchi (humano). Degeneración de retina (ratón).
β arrestina-1 (arrestina 2)	Ubicua, alta expresión en cerebro	No fenotipo conocido en Sistema Nervioso.
β arrestina-2 (arrestina 3)	Ubicua, menor expresión que β -arrestina-1 en cerebro	Mayor efecto antinociceptivo de morfina y de recompensa. Tolerancia a morfina alterada. Respuestas locomotoras y de comportamiento a dopamina alteradas.

Las referencias se citan en el texto. Adaptado de Premont y Gainetdinov (5).

co promovía la disminución de la quinasa GRK5 en otras regiones (62). Por el contrario el fármaco clozapina promovía un efecto diferencial en la expresión de estas quinasas y también de las proteínas reguladoras arrestinas en otras zonas cerebrales (62), lo que es indicativo de la complejidad de estos efectos y de la importancia de la distribución regional de los cambios observados, ya que los GPCRs cuya función pueda alterarse dependerá mucho de la localización precisa de esos cambios de expresión. En este sentido, otro grupo ha sugerido que GRK3 sería importante en la

desensibilización de autoreceptores de dopamina D3, afectando de esta manera a los procesos que controlan la liberación de dopamina (63). A diferencia de lo que sucede para el caso de GRK2, no ha podido establecerse con claridad la participación de GRK3 en la regulación de receptores μ -opiacéos, existiendo datos muy contradictorios al respecto (5). Sí ha podido establecerse que la activación del sistema KAPPA-opioide por dolor neuropático en médula espinal de ratón y procesos de tolerancia relacionados están disminuidos en ratones carentes de GRK3 (64,65).

En lo que respecta a enfermedades neurodegenerativas hay poca información sobre posibles cambios en los niveles de GRK3, si bien un grupo ha publicado recientemente que los niveles de GRK3 y GRK5 están específicamente aumentados, junto con los de ambas arrestinas, en la región estriada de pacientes con la enfermedad de Parkinson (66).

GRK4

La expresión de GRK4 en el cerebro se limita a las células de Purkinje del cerebelo (67). Esta quinasa podría regular los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 1 y los receptores tipo GABA-B presentes en esa estructura cerebral lo que sugeriría la participación de GRK4 en la coordinación motora (68, 69). Sin embargo, no se han detectado alteraciones en actividad locomotora basal o en la respuesta a cocaína en ratones deficientes para GRK4 (5).

GRK5

Distribución en sistema nervioso

GRK5 es una isoforma de expresión ubicua en todos los tejidos del organismo, y por tanto también en el sistema nervioso central. Su expresión es particularmente elevada, al menos a nivel de mensajero, en regiones como el septum, la corteza cingulada, ciertos núcleos talámicos o el locus coeruleus (25). La expresión de GRK5 parece aumentar durante la diferenciación neuronal (70).

Fenotipos de ratones carentes de GRK5

Los ratones que carecen de GRK5 muestran un fenotipo aparentemente normal, si bien muestran una ligera disminución de la temperatura corporal (71). La esti-

mulación de actividades locomotoras con cocaína o con el agonista de dopamina apomorfina no mostró diferencias significativas en estos animales con respecto a los controles. Los ratones deficientes de GRK5 tampoco mostraban alteraciones en las respuestas hipotérmicas normalmente inducidas por agonistas del receptor 5-HT_{1A} de serotonina (29, 71). Estos datos indicaban que la respuesta de los receptores de dopamina, μ -opiáceos o de serotonina relacionadas con estos procesos fisiológicos y de comportamiento no se afectaba por la delección de GRK5. Sin embargo, la respuesta de estos animales de experimentación al agonista muscarínico oxotremorina, que controla respuestas centrales como hipotermia, temblor, salivación y antinoci-cepción, estaban significativamente aumentados en estos individuos (71), lo que indicaba su participación en la regulación de receptores M₂-muscarínicos “in vivo”. Es curioso hacer notar que otros estudios recientes han confirmado que la respuesta a receptores M₂ en ratones knockout para GRK5 está afectada en otros tejidos como el pulmón pero no en el corazón (5, 72). Todo esto sugiere que la misma GRK puede regular el mismo GPCR de forma diferencial en diferentes tejidos.

GRK5 en enfermedades neurodegenerativas

Como se ha mencionado en un apartado anterior, los niveles tanto de GRK2 como de GRK5 parecen estar alterados en algunos modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer (49). Datos recientes han indicado que la deficiencia en GRK5 da lugar a menores niveles de acetil-colina en el hipocampo, al alterar la desensibilización de autoreceptores M₂/M₄ muscarínicos presinápticos (73), lo que sugiere una correlación funcional con las alteraciones en la señalización colinérgica que se observan en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo aún queda mucho por explorar en el conocimiento de la implicación de GRK5 en el control de las acciones de los neurotransmisores “in vivo”.

GRK6

Patrón de expresión

GRK6 se expresa ubicuamente en el sistema nervioso central (74). Esta quina-sa parece ser la más abundante de todas las GRKs en el caudado-putamen, y su mensajero también se expresa en muchos cuerpos neuronales dopaminérgicos como los de la sustancia nigra (25). En el estriado la proteína GRK6 se expresa en neuronas gabaérgicas y en interneuronas colinérgicas que responden a dopamina (75).

Regulación de receptores cerebrales mediada por GRK6

Los ratones deficientes en GRK6 muestran una supersensibilidad locomotora muy significativa a cocaína, anfetamina y morfina (75). Éstas y otras investigaciones han indicado que los receptores de dopamina D2 postsinápticos en el estriado son dianas fisiológicas de la regulación por GRK6, sugiriendo que una estrategia farmacológica dirigida a modular la expresión o actividad de GRK6 sería beneficiosa en situaciones en las que la señalización por dopamina está alterada, como el caso de la enfermedad de Parkinson (5). De hecho, la expresión de GRK6 está significativamente elevada en diversas áreas del cerebro, incluido el estriado en modelos de primates de la enfermedad de Parkinson (28). Por otra parte, puesto que la supersensibilidad a dopamina también está presente en otros desórdenes cerebrales, como adicción y esquizofrenia (76), será interesante estudiar un posible papel de GRK6 en estas situaciones fisiopatológicas. En este sentido, datos recientes sugieren que las respuestas fisiológicas y comportamentales inducidas por morfina están alteradas selectivamente en ratones deficientes en GRK6 (77). Por último, otro campo emergente de notable interés, como sucede en el caso de GRK2, es la participación de GRK6 en la respuesta al dolor postinflamatorio. Así, se ha indicado recientemente que GRK6 controla la hiperalgesia visceral postinflamatoria (78).

 β -arrestinas*Distribución en el sistema nervioso*

La proteína reguladora β -arrestina-1 se expresa ubicuamente en el cerebro (26, 29, 70, 79, 80, 81). Sus niveles de mensajero se estiman dos o tres veces mayores que los de la β -arrestina-2, mientras que los valores de expresión de proteína son 10 veces mayores (81). Por tanto, la isoforma β -arrestina-2, a pesar de este significativo solapamiento en su patrón de expresión con la β -arrestina-1, parece requerir una expresión mucho menor para realizar sus funciones fisiológicas. Existen sin embargo algunas zonas del cerebro, como la amígdala y la mayor parte de los núcleos hipotalámicos, en los que la β -arrestina-2 presenta mayores niveles relativos que la β -arrestina-1 (81). Se ha detectado también una notable inmuno-reactividad de β -arrestina-1 en densidades postsinápticas de la médula espinal (82). Por otra parte, la expresión de β -arrestina-1, como ha demostrado el laboratorio de Gurevich y nuestro propio grupo, aumenta considerablemente durante el desarrollo neuronal sugiriendo un papel específi-

co para esta proteína en la diferenciación neuronal (26, 70). Nuestro grupo también ha descrito un modesto efecto del hipotiroidismo experimental en los niveles de β -arrestina-1 durante el desarrollo postnatal (26). Aunque tratamientos crónicos o agudos con morfina incrementan la expresión de β -arrestina-1 en el locus coeruleus y en otras áreas, la respuesta antinociceptiva a morfina no se ve alterada en ratones carentes de β -arrestina-1 (30, 35, 83).

Es curioso indicar que los niveles de β -arrestina-1 en leucocitos de pacientes depresivos están reducidos mientras que su presencia en corteza cerebral de rata e hipocampo se eleva tras tratamiento crónico con los antidepresivos imipramina o desipramina (84). La reducción de los niveles de β -arrestina en los linfocitos de pacientes con depresión mayor se correlacionaba significativamente con la severidad de los síntomas depresivos (84).

β -arrestinas y acción de opiáceos

Diversos estudios indican que β -arrestina 2 está implicada en la regulación de receptores μ -opioides y en los efectos de los opiáceos. Distintos grupos han mostrado que los tratamientos agudos o crónicos con ligandos μ -opioides, incluyendo la morfina, causan alteraciones significativas en la expresión de β -arrestina-2 en la corteza y el estriado (32, 85, 83). El pretratamiento intratecal con un anticuerpo anti β -arrestina-2 potencia la antinocicepción inducida por agonistas μ -opioides en el ratón, lo que es coherente con un papel en la modulación de la antinocicepción a nivel de médula espinal (86).

Un aspecto muy controvertido de estudios “in vitro” ha sido el efecto diferencial de opiáceos, y en particular de la morfina, en promover el reclutamiento de β -arrestina-2 y la endocitosis del receptor. Aunque trabajos previos en sistemas heterólogos sugerían que la morfina no sería capaz de promover eficazmente el reclutamiento de β -arrestina y la endocitosis del receptor (87, 88) datos más recientes en cultivos primarios de neuronas estriatales y datos “in vivo” indican fuertemente que la morfina es capaz de promover una rápida endocitosis de receptores μ -opioides in vivo y que la β -arrestina-2 juega un papel importante en ese proceso (89, 90, 91, 92). Ello refuerza la importancia de realizar los estudios en los modelos celulares más cercanos a los fisiológicos.

En lo que respecta a estudios con ratones deficientes en β -arrestina-2, estos animales muestran una mayor respuesta antinociceptiva a morfina que se correlaciona con una mayor señalización a través de estos receptores en estas condiciones (90, 93). Más aún, la tolerancia a estos efectos antinociceptivos estaba atenua-

da en los ratones carentes de β -arrestina-2 (91). Otros efectos bien conocidos de la morfina como el estreñimiento o la atenuación de la respiración estaban sin embargo sorprendentemente reducidos en los ratones knockout para β -arrestina-2 (94).

β -arrestinas y modulación de las acciones de receptores de dopamina

El ratón knockout para β -arrestina-2 muestra alteraciones significativas en las respuestas locomotoras y de recompensa de la morfina, que requieren tanto la activación de receptores μ -opioides como indirectamente de dopamina, a través de la estimulación por morfina de mecanismos de liberación de dopamina (95, 96). En los ratones deficientes para β -arrestina-2 la morfina, pero no la cocaína, producen una mayor respuesta de liberación de dopamina y de recompensa en las pruebas habituales en estos casos. Sin embargo, la administración aguda de morfina induce una menor activación locomotora en estos animales, lo que sugeriría que β -arrestina-2 pudiese tener un papel positivo y no sólo de regulador negativo en la señalización dopaminérgica (96).

En línea con esas observaciones, datos muy recientes han mostrado un importante papel para β -arrestina-2 en la señalización mediada por receptores D2 dopaminérgicos “in vivo”. Clásicamente las funciones de los receptores de dopamina se han asociado con la regulación de la vía de transducción AMPc-PKA a través de proteínas G heterotriméricas. Los receptores de dopamina D1 y D5 se acoplan a través de Gs a la estimulación de la producción de AMPc y a la activación de PKA. Por el contrario, los receptores D2, D3 y D4 se acoplan a Gi/o e inhiben la producción de AMP cíclico y la estimulación de PKA. La eficacia clínica de muchos fármacos antipsicóticos se correlaciona con su capacidad para actuar como antagonistas del receptor de dopamina D2 (97). Investigaciones más recientes han mostrado que además de estos efectos “canónicos” los receptores de dopamina ejercen sus efectos “in vivo” también a través de mecanismos independientes de AMPc. La ocupación del receptor D2 por un agonista promueve la fosforilación del receptor por GRKs, lo que a su vez permite el reclutamiento de la proteína β -arrestina, impidiendo el acoplamiento a la proteína Gi. Además, los agonistas D2 activan a la enzima GSK3 β . Esto es así porque el receptor recluta junto con la β -arrestina a la proteína fosfatasa 2 y a la quinasa Akt activa (76, 98). Este reclutamiento promueve un cambio conformacional en la β -arrestina que impulsa a PP2A a defosforilar y desactivar a Akt, lo que a su vez facilita la defosforilación y la activación del sustrato de Akt, GSK3 β (ver Figura 2). Esta compleja regulación ocurre de forma independiente y secuencial (es más tardía) de la tradicional modulación de los niveles de AMPc.

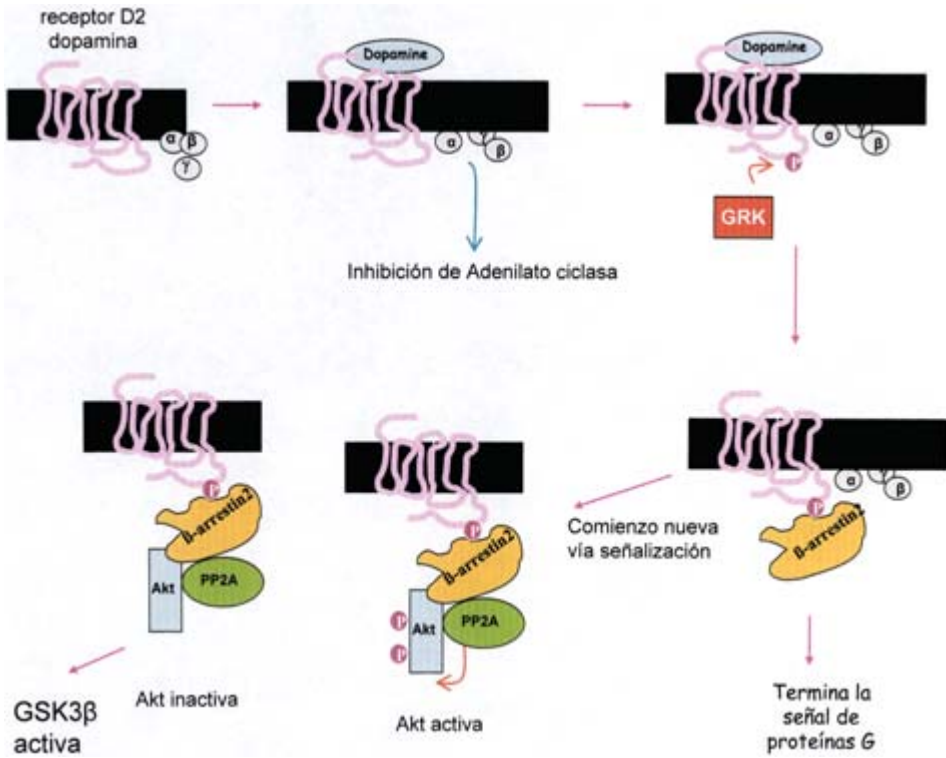


FIGURA 2. La estimulación del receptor D2 de dopamina conduce tanto a la modulación de los niveles de AMPc a través de proteínas G heterotriméricas, como al control de la actividad del eje Akt/GSK3β, por medio del reclutamiento de complejos β-arrestina-2/PP2A/Akt.

Estos estudios “in vitro” del Grupo de Marc G. Caron han sido claves para entender el fenotipo observado en ratones deficientes en β-arrestina 2. Estos animales muestran una reducción de la respuesta conductual a anfetamina y apomorfina, una pérdida de la regulación de la vía de señalización de AKT por dopamina y una abolición de la interacción entre AKT y PP2A dependiente de dopamina. Más aún, la ausencia de β-arrestina-2 resulta en un menor nivel de actividad locomotora espontánea tanto en ratones normales como ratones hiperdopaminérgicos que carecen del transportador de dopamina, lo que demuestra un papel crítico de β-arrestina-2 en la señalización dopaminérgica (76, 97). Estos estudios han mostrado por primera vez “in vivo” el papel dual de β-arrestina en la regulación de GPCRs. Además de su papel “negativo” clásico en la desensibilización de receptores, en el que las β-arrestinas son críticas para inhibir la señalización de receptores a las proteínas G-heterotriméricas, la β-arrestina-2

también puede actuar de forma “positiva” en procesos de señalización, actuando como una proteína andamio de otras quinasas y fosfatasa como PP2A y AKT.

Es también muy interesante destacar que muy recientemente se ha investigado si los fármacos antipsicóticos pueden modular la capacidad de agonistas de receptores de dopamina de reclutar β -arrestina 2. Sorprendentemente, estos antagonistas bloquean el reclutamiento de β -arrestina 2 con mucha mayor potencia que su efecto en la acumulación de AMPc, impidiendo la desactivación de Akt por el agonista (76, 97). Dada la importancia de la cascada AKT/GSK3 en la patología de la esquizofrenia, se abre una posibilidad muy atractiva que es la de identificar fármacos que bloqueen de forma preferencial la capacidad del receptor de dopamina de reclutar β -arrestina 2. Estos bloqueadores específicos o preferentes de la señalización por β -arrestina ya se han identificado en el sistema β -adrenérgico en el contexto cardiovascular (97).

CONCLUSIONES

Las evidencias acumuladas en los últimos años muestran claramente un papel clave para las GRKs y las arrestinas en la modulación de las acciones de los receptores cerebrales. Sin embargo, existen todavía muchas incógnitas que deben ser desveladas. Así, debe investigarse con más detalle la distribución regional y de tipo celular de las diversas GRKs y arrestinas en el sistema nervioso y su especificidad o no en cuanto a la modulación de receptores concretos. Por otra parte, es esencial también identificar las circunstancias fisiopatológicas y los mecanismos que pueden modular los niveles de expresión de estas proteínas en el sistema nervioso.

En cuanto a la repercusión funcional de esas alteraciones, el sistema GRKs/arrestinas presenta la complejidad adicional de su papel dual en señalización, tanto suprimiendo la señalización de GPCRs a través de proteínas G heterotriméricas, como teniendo un papel positivo al iniciar nuevas vías de señalización. Por tanto, una disminución en los niveles de GRKs puede tener efectos opuestos en funciones fisiológicas: puede promover una mayor respuesta de GPCRs al dar lugar a una deficiente desensibilización, o por el contrario puede disminuir aquellas respuestas dependientes de la activación del eje de señalización GPCRs/GRKs/arrestinas. El uso combinado de sistemas celulares y animales, así como un mejor conocimiento del interactoma de las GRKs y las arrestinas nos ayudarán a conocer mejor el papel de estas proteínas en el sistema nervioso y al diseño de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

La investigación de mi grupo está financiada por ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-0552), la RED de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA) del Instituto de Salud “Carlos III” (RD0-0014/0037), la Red de Excelencia INSINET de la Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006) y la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., *et al.* (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem. Med. Chem.* 1: 761-782.
- (2) Penela, P., Ribas, C., y Mayor, F., Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell. Signal.* 15: 973-981.
- (3) Reiter, E., Lefkowitz, R.J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 17: 159-65.
- (4) Moore, C.A., Milano, S.K., y Benovic, JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69: 451-482.
- (5) Premont, R.T., Gainetdinov, R.R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69: 511-534.
- (6) DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., *et al.* (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 69: 483-510.
- (7) Hupfeld, C.J., Olefsky, J.M. (2007) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69: 561-577.
- (8) Hildreth, K.L., Wu, J.H., Barak, L.S., *et al.* (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J. Biol Chem.* 279: 41775-41782.
- (9) Chen, Y., Long, H., Wu, Z., *et al.* (2008) EGF Transregulates Opioid Receptors through EGFR-mediated GRK2 Phosphorylation and Activation. *Mol. Biol. Cell.* 19: 2973-2983.
- (10) Ho, J., Cocolakis, E., Dumas, V.M., *et al.* (2005) The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J.* 24: 3247-3458.

- (11) Ribas. C., Penela. P., Murga. C., *et al.* (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 913-922.
- (12) Jimenez-Sainz. M.C., Murga .C., Kavelaars. A., *et al.* (2006) G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Negatively Regulates Chemokine Signaling at a Level Downstream from G Protein Subunits. *Mol Biol Cell.* 17: 25-31.
- (13) Penela. P., Ribas. C., Aymerich. I., *et al.* (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *Embo J.* 27: 1206-1218.
- (14) Vroon. A., Heijnen. C.J., y Kavelaars .A. (2006) GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc Biol.* 80: 1214-21.
- (15) Metaye. T., Gibelin. H., Perdrisot. R., *et al.* (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* 17: 917-28.
- (16) Penela. P., Murga. C., Ribas. C., *et al.* (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 69: 46-56.
- (17) Elorza, A., Sarnago, S., Mayor, F., Jr. (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol.* 57: 778-83.
- (18) Sarnago, S., Elorza, A., Mayor, F., Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J. Biol Chem.* 274: 34411-34416.
- (19) Ramos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R.B., *et al.* (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 101: 2083-2089.
- (20) Penela, P., Elorza, A., Sarnago, S., *et al.* (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* 20: 5129-5138.
- (21) Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S., *et al.* (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* 278: 29164-73.
- (22) Salcedo, A., Mayor, F. J.r., Penela, P. (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* 25: 4752-62.
- (23) Vasilates, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., *et al.* (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4903-4908.
- (24) Arriza, J.L., Dawson, T.M., Simerly, R.B., *et al.* (1992) The G protein-coupled receptor kinase β ARK1 and β ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J. Neurosci.* 12: 4045-4055.

- (25) Erdtmann-vourliotis, M., Mayer, P., Ammon, S., *et al.* (2001) Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2,3,5 and 6 mRNA in the rat brain. *Br. Res. Mol. Br. Res.* 95: 129-137.
- (26) Penela P., Alvarez-Dolado, M., Muñoz, A., *et al.* (2000) Expression patterns of the regulatory proteins G protein-coupled receptor kinase 2 and β -arrestin 1 during rat postnatal brain development: effect of hypothyroidism. *Eur. J. Biochem.* 267: 4390-4396.
- (27) Grange-Midroit, M., García-Sevilla, J.A., Ferrer-Alcon, M., *et al.* (2003) Regulation of GRK 2 and 6, β -arrestin-2 and associated proteins in the prefrontal cortex of drug-free and antidepressant drug-treated subjects with major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 313-317.
- (28) Bezar E., Gross, C.E., Qin, L., *et al.* (2005) L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol. Dis.* 18: 323-335.
- (29) Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., *et al.* (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Ann. Rev. Neurosci.* 27: 107-144.
- (30) Terwilliger, R.Z., J. Ortiz, *et al.* (1994). Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 63: 1983-1986.
- (31) Ozaita, A., P.V. Escriba, *et al.* (1998). Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. *J. Neurochem* 70: 1249-57.
- (32) Hurlle, M.A. (2001). Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. *J. Neurochem* 77: 486-92.
- (33) Narita, M., M. Suzuki, *et al.* (2006). μ -Opioid receptor internalization-dependent and -independent mechanisms of the development of tolerance to μ -opioid receptor agonists: Comparison between etorphine and morphine. *Neuroscience* 138: 609-619.
- (34) Li, A.H. and H.L. Wang (2001) G protein-coupled receptor kinase 2 mediates μ -opioid receptor desensitization in GABAergic neurons of the nucleus raphe magnus. *J. Neurochem* 77: 435-444.
- (35) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R. Caron, M.G. (2004) G protein-coupled receptor kinase/beta-arrestin systems and drugs of abuse: psychostimulant and opiate studies in knockout mice. *Neuromol. Med.* 5: 41-50.
- (36) Kleibeuker, W., Ledebuer, A., Eijkelkamp, N., *et al.* (2007) A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia. *Eur. J. Neurosci.* 25: 1696-1704.

- (37) Aiyar, N., *et al.* (2000) Involvement of G protein-coupled receptor kinase-6 in desensitization of CGRP receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 403: 1-7.
- (38) McColnologue, K., Corvera, C.U., Gamp, P.D., *et al.* (1998). Desensitization of the neurokinin-1-receptor (NK₁-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK₁-R, Galphaq/11, G-protein receptor kinase 2/3, and beta-arrestin-1/2. *Mol. Biol. Cell.* 9: 2305-2324.
- (39) Barak, L.S., Warabi, K., Feng, X., *et al.* (1999) 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.* 274, 7565-7569.
- (40) Dhami, G.K., Fergusson, S.S. (1995) Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol. Ther.* 111: 260-271.
- (41) Kleibeuker, W., Gabay, E., Kavelaars, A., *et al.* (2008) IL-1 beta signaling is required for mechanical allodynia induced by nerve injury and for the ensuing reduction in spinal cord neuronal GRK2. *Brain Behav. Immun.* 22: 200-208.
- (42) Kleibeuker, W., Jurado-Pueyo, M., Murga, C., *et al.* (2008) Physiological changes in GRK2 regulate CCL2-induced signaling to ERK1/2 and Akt but not to MEK1/2 and calcium. *J. Neurochem.* 104: 979-992.
- (43) Nijboer, C.H., Kavelaars, A., Vroon, A., *et al.* (2008) Low endogenous G-protein-coupled receptor kinase 2 sensitizes the immature brain to hypoxia-ischemia-induced gray and white matter damage. *J. Neurosci.* 28: 3324-3332.
- (44) Kageyama, K., Hanada, K., Moriyama, T., *et al.* (2006) G protein-coupled receptor kinase 2 involvement in desensitization of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 1 by CRF in murine corticotrophs. *Endocrinology* 147: 441-450.
- (45) Neill, J.D., Musgrove, L.C., Duck, L.W., *et al.* (1999). High efficiency method for gene transfer in normal pituitary gonadotropes: adenoviral-mediated expression of G protein-coupled receptor kinase 2 suppresses luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 140: 2562-2569.
- (46) Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolíá, D., *et al.* (1999). Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha (1B)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol. Pharmacol.* 56: 316-324.
- (47) Heijnen, C.J. (2007). Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: current knowledge and future perspectives. *Brain Behav. Immun.* 21: 1-8.
- (48) Pronin, A.N., A.J. Morris, *et al.* (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 275: 26515-26522.

- (49) Suo, Z., M. Wu, *et al.* (2004). Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *J. Neurosci.* 24: 3444-3452.
- (50) Leosco D., Fortunato F., Rengo G., *et al.* (2007) Lymphocyte G-protein-coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 415: 279-82.
- (51) Takahashi, M., Uchikado, H., Caprotti, D., *et al.* (2006) Identification of G-protein coupled receptor kinase 2 in paired helical filaments and neurofibrillary tangles. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 65: 1157-1169.
- (52) Obrenovich, M.E., Morales, L.A., Cobb, C.J. (2009) Insights into cerebrovascular complications and Alzheimer disease through the selective loss of GRKs regulation.. *J. Cell. Mol. Med.* 13: 853-865.
- (53) Ribeiro, F.M., Ferreira, L.T., Paquet, M., *et al.* (2009) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J. Biol. Chem.* 284: 23444-23453.
- (54) Peregrin, S., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., *et al.* (2006) Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38 MAPK. *Curr Biol.* 16: 2042-2047.
- (55) Goehler, H., lalowski, M., Stelzl, U., *et al.* (2004) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol. Cell.* 19: 287.
- (56) Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., *et al.* (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 313-317.
- (57) Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., *et al.* (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamina receptor. *J. Neurosci.* 22: 8476-86.
- (58) Boekhoff, I., J. Inglese, *et al.* (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 269: 37-40.
- (59) Diverse-Pierluissi, M., J. Inglese, *et al.* (1996) G protein-coupled receptor kinase mediates desensitization of norepinephrine-induced Ca²⁺ channel inhibition. *Neuron* 16.
- (60) Peppel, K., I. Boekhoff, *et al.* (1997) G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 272: 25425-25428.

- (61) Niculescu, A.B., Segal, D.S., Kuczenski, R., *et al.* (2000) Identifying a series of candidates genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach. *Physiol. Genom.* 4: 83-91.
- (62) Ahmed, M.R., Gurevich, V.V., Dalby, K.N., *et al.* (2008) Haloperidol and clozapine differentially affect the expression of arrestins, receptor kinases, and extracellular signal-regulated kinase activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325: 276-283.
- (63) Kim, K.M., Gainetdinov, R.R., Laporte, S.A., *et al.* (2005) G protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 receptor signaling by modulating the stability of β -arrestin complex. A case of autoreceptor regulation. *J. Biol. Chem.* 280: 12774-12780.
- (64) Xu, M., Petraschka, M., McLaughlin, J.P., *et al.* (2004) Neurophatic pain activates the endogenous κ opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J. Neurosci.* 24: 4576-4584.
- (65) McLaughlin, J.P., Mayers, L.C., Zarek, P.E., *et al.* (2004) Prolonged κ opioid receptor phosphorylation mediated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance. *J. Biol. Chem.* 279: 1810-1818.
- (66) Bychkov, E.R., Gurevich, V.V., Joyce, J.N., *et al.* (2008). Arrestins and two receptor kinases are upregulated in Parkinson's disease with dementia. *Neurobiol. Aging.* 29: 379-396.
- (67) Salles, M., Salvatore, L., D'Urbano, E., *et al.* (2000) The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J.* 14: 2569-2580.
- (68) Iacovelli, L., Salvatore, L., Capobianco, L., *et al.* (2003) Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and β -arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 278: 12433-12442.
- (69) Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., *et al.* (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22: 3816-3824.
- (70) Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (2004) Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation. *J. Neurochem.* 91: 1404-1016.
- (71) Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Walker, J.K., *et al.* (1999) Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron.* 24: 1029-1036.
- (72) Walker, J.K., Gainetdinov, R.R., Feldman, D.S., *et al.* (2004). G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 286: L312-319.

- (73) Liu, J., Rasul, I., Sun, Y., *et al.* (2009) GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 284: 19564-19571.
- (74) Fehr, C., Fickova, M., Hiemke, C., *et al.* (1997) Molecular cloning of rat G-protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) from brain tissue, and its mRNA expression in different brain regions and peripheral tissues. *Br. Res. Mol. Br. Res.* 49: 278-282.
- (75) Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Sotnikova, T.D., *et al.* (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron.* 39: 391-303.
- (76) Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28: 166-172.
- (77) Raehal, K.M., Schmid, C.L., Medvedev, I.O., *et al.* (2009) Morphine-induced physiological and behavioral responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 6. *Drug Alcohol Depend.* 104: 187-196.
- (78) Eijkelkamp, N., Heijnen, C.J., Elsenbruch, S., *et al.* (2009). G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hyperalgesia. *Brain Behav. Immun.* 23: 18-26.
- (79) Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., *et al.* (1992) β -arrestin2, a novel member of the arrestin/b gene family. *J. Biol. Chem.* 267: 17882-17890.
- (80) Parruti, G., Ambrosini, G., Sallese, M., *et al.* (1993) Molecular cloning, functional expression and mRNA analysis of human β -adrenergic receptor kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 475-81.
- (81) Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (2002) Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience* 109: 421-436.
- (82) Kittel, A., Komori, N. (1999) Ultrastructural localization of β -arrestin-1 and -2 in rat lumbar spinal cord. *J. Compl. Neurol.* 412: 649-655.
- (83) Fan, X.L., Zhang, J.S., Zhang, X.Q., *et al.* (2003) Differential regulation of β -arrestin 1 and β -arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience* 109: 421-436.
- (84) Avissar, S., Matuzany-Ruban, A., Tzukert, K., *et al.* (2004) β -arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain. *Am. J. Psychiat.* 161: 2066-2072.
- (85) Diaz, A., Pazos, *et al.* (2002) Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism. *Neuroscience* 112: 345-53.

- (86) Ohsawa, M., Mizoguchi, H., Narita, M., *et al.* (2003) Involvement of β -arrestin-2 in modulation of the spinal antinociception induced by β -opioid receptor agonists in the mouse. *Neurosci. Lett.* 346: 13-16.
- (87) Whistler, J.L., von Zastrow, M. (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by β -arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9914-19.
- (88) Kooover, A., Celver, J.P., Wu, A., *et al.* (1998) Agonist induced homologous desensitization of β -opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol. Pharmacol.* 54: 704-711.
- (89) Haberstock-Debie, H., Kim, K.A., Yu, Y.J., *et al.* (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of β -opioid receptors in striatal neurons. *J. Neurosci.* 25: 7847-7857.
- (90) Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., *et al.* (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science* 286: 2495-2498.
- (91) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F.T., *et al.* (2000) β -opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408: 720-723.
- (92) Beaulieu, J.M. (2005) Morphine-induced μ -opioid receptor internalization: a paradox solved in neurons. *J. Neurosci.* 25: 10061-10063.
- (93) Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (2002) Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in β -arrestin-1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 22: 10494-10500.
- (94) Raehal, K.M., Walker, J.K., Bohn, L.M. (2005). Morphine effects in β -arrestin 2 knock-out mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 1195-1201.
- (95) Elmer, G.I., Pieper, J.O., Rubinstein, M., *et al.* (2002). Failure of intravenous morphine to serve as an ineffective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice *J. Neurosci.* 22: PX224.
- (96) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., *et al.* (2003). Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in β -arrestin-2 knock-out mice. *J. Neurosci.* 23: 10265-10273.
- (97) Houslay, M.D. (2009) Arrestin times for developing antipsychotics and β -blockers. *Cell Biol.* 2: 1-5.