

Mécanismes d'action et rôles multiples des β -arrestines dans la biologie des récepteurs couplés aux protéines G

Eric Reiter^{1,2,*}

¹ CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, 37380 Nouzilly, France

² Inria, Centre de recherche Inria Saclay-Île-de-France, 91120 Palaiseau, France

Reçu le 7 septembre 2021

Résumé– La stimulation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) induit des réponses biologiques à un large éventail de signaux extracellulaires. Les protéines G hétérotrimériques, qui sont recrutées aux RCPG actifs, conduisent à la génération de divers seconds messagers diffusibles. En plus des protéines G, seules deux familles de protéines présentent également la caractéristique remarquable de reconnaître la conformation active de la majorité des RCPG et de s'y lier : les kinases spécifiques des RCPG (GRK) et les β -arrestines. Ces deux familles de protéines ont initialement été identifiées en tant qu'acteurs clés de la désensibilisation de l'activation des protéines G par les RCPG. Au fil des années, les β -arrestines ont été impliquées dans un nombre croissant d'interactions avec des protéines non réceptrices, élargissant le panel des fonctions cellulaires dans lesquelles elles sont impliquées. Il est maintenant bien établi que les β -arrestines, en échafaudant et en recrutant des complexes protéiques de manière dépendante de l'agoniste, régulent directement le trafic et la signalisation des RCPG. Des avancées remarquables ont été réalisées au cours des dernières années qui ont permis i) d'identifier des ligands biaisés capables, en stabilisant des conformations particulières d'un nombre croissant de RCPG, d'activer ou de bloquer l'action des β -arrestines indépendamment de celle des protéines G, certains de ces ligands présentant un intérêt thérapeutique; ii) de mettre en évidence le rôle des β -arrestines dans la compartimentalisation de la signalisation des RCPG au sein de la cellule, en particulier depuis les endosomes, et, iii) de comprendre les détails moléculaires de leur interaction avec les RCPG et de leur activation grâce à des approches structurales et biophysiques.

Mots clés : β -arrestines, signalisation intracellulaire, trafic intracellulaire, biais pharmacologiques, RCPG

Abstract– β -arrestins, their mechanisms of action and multiple roles in the biology of G protein-coupled receptors. The stimulation of G protein-coupled receptors (GPCRs) induces biological responses to a wide range of extracellular cues. The heterotrimeric G proteins, which are recruited to the active conformation of GPCRs, lead to the generation of various diffusible second messengers. Only two other families of proteins exhibit the remarkable characteristic of recognizing and binding to the active conformation of most GPCRs: GPCR kinases (GRKs) and β -arrestins. These two families of proteins were initially identified as key players in the desensitization of G protein activation by GPCRs. Over the years, β -arrestins have been implicated in an increasing number of interactions with non-receptor proteins, expanding the range of cellular functions in which they are involved. It is now well established that β -arrestins, by scaffolding and recruiting protein complexes in an agonist-dependent manner, directly regulate the trafficking and signaling of GPCRs. Remarkable advances have been made in recent years which have made it possible i) to identify biased ligands capable, by stabilizing particular conformations of a growing number of GPCRs, of activating or blocking the action of β -arrestins independently of that of G proteins, some of these ligands holding great therapeutic interest; ii) to demonstrate β -arrestins' role in the compartmentalization of GPCR signaling within the cell, and iii) to understand the molecular details of their interaction with GPCRs and of their activation through structural and biophysical approaches.

Keywords: β -arrestins, intracellular signaling, intracellular trafficking, pharmacological biases, GPCR

*Auteur correspondant : eric.reiter@inrae.fr

Introduction

Les cellules sont exposées à une combinaison complexe de *stimuli* qui varient selon leurs natures chimiques, leurs concentrations et leurs durées d'exposition. En conséquence, les cellules ont développé des systèmes sophistiqués permettant la réception et l'interprétation des *stimuli* extracellulaires. Au cœur de ces systèmes, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la famille de récepteurs membranaires la plus vaste et la plus polyvalente. Lors de la stimulation par l'agoniste, les RCPG subissent des changements de conformation qui exposent des sites de liaison intracellulaires pour des protéines de transduction. Typiquement, plusieurs voies de signalisation intracellulaires peuvent être activées en parallèle. Pour que des réponses biologiques appropriées (*e.g.*, prolifération, différenciation, migration ou apoptose) puissent être apportées en fonction des situations physiologiques rencontrées, des mécanismes d'orchestration efficaces sont nécessaires. Même si de nombreuses protéines interagissent directement avec les RCPG, seules trois familles de protéines ont la capacité d'interagir spécifiquement avec les RCPG en conformation active : les protéines G hétérotrimériques qui ont donné leur nom aux RCPG, les kinases spécifiques des RCPG (GRK) et les β -arrestines (Reiter & Lefkowitz, 2006; DeWire *et al.*, 2007; Reiter *et al.*, 2012).

Les arrestines constituent une famille de quatre membres numérotés de 1 à 4. L'expression de l'arrestine 1 et de l'arrestine 4 est limitée aux bâtonnets et aux cônes rétiniens, respectivement. En revanche, l'arrestine 2 et l'arrestine 3, mieux connues sous le nom de β -arrestine 1 et β -arrestine 2, sont exprimées de manière ubiquiste (DeWire *et al.*, 2007). Il est largement admis que les GRK et les β -arrestines orchestrent les activités des RCPG à trois niveaux différents : i) l'arrêt du signal induit par le découplage fonctionnel entre le récepteur et les protéines G par un mécanisme connu sous le nom de « désensibilisation homologue », ii) le trafic intracellulaire qui se traduit par l'internalisation, le recyclage et/ou la dégradation des récepteurs et iii) la signalisation qui conduit à l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation intracellulaires, non seulement depuis la membrane plasmique, mais aussi à partir de compartiments intracellulaires.

Implication des β -arrestines dans la désensibilisation, l'internalisation, le trafic intracellulaire et la signalisation des RCPG

Depuis leur découverte il y a plus de trente ans, la perception des fonctions des β -arrestines n'a cessé de s'élargir, au point qu'elles sont maintenant indissociablement liées à tous les aspects clés de la fonction des RCPG. L'activation, la désensibilisation et l'internalisation de la majorité des RCPG non rétiniens sont régulées de manière critique par les deux β -arrestines. Deux éléments déclencheurs principaux contrôlent le recrutement de la

β -arrestine aux RCPG : la modification induite par l'agoniste de la conformation du récepteur et la phosphorylation, médiée par les GRK, du récepteur occupé par le ligand (Gurevich & Benovic, 1993; Reiter *et al.*, 2012). La première étape de l'activation du récepteur, la liaison au ligand, est elle-même impactée par les β -arrestines. L'augmentation allostérique de l'affinité de liaison d'un ligand lorsque le récepteur est complexé avec sa protéine G a été conceptualisée il y a plus de 35 ans dans le « modèle de complexe ternaire » (De Lean *et al.*, 1980) et a été, par la suite, étayée par des preuves structurales directes (DeVree *et al.*, 2016). De façon intéressante, il a été démontré plus récemment que le recrutement de la β -arrestine à un RCPG induit un effet allostérique positif très similaire sur la liaison du ligand, soutenant l'existence d'un complexe ternaire alternatif impliquant la β -arrestine (Martini *et al.*, 2002; Strachan *et al.*, 2014).

Dès leur découverte, les β -arrestines ont été associées à l'atténuation du couplage des protéines G (DeWire *et al.*, 2007). En effet, le RCPG actif est phosphorylé dans son extrémité C-terminale par les GRK et recrute alors la β -arrestine avec une affinité élevée. Cette interaction conduit à l'inhibition du couplage des protéines G par encombrement stérique (Reiter & Lefkowitz, 2006). Ce processus, généralement appelé « désensibilisation homologue », s'applique à la plupart des RCPG (Freedman & Lefkowitz, 1996). Il a été démontré plus tard que les β -arrestines ont également la capacité de recruter des enzymes de dégradation des seconds messagers, telles que les AMPc phosphodiésterases ou les diacylglycérol kinases, au récepteur actif (Perry *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2007). Cette propriété remarquable implique que les β -arrestines désensibilisent doublement les RCPG : i) en inhibant le couplage des protéines G et ii) en augmentant simultanément le taux de dégradation du second messager à proximité du récepteur actif.

En plus de leur rôle dans la désensibilisation, les β -arrestines jouent également un rôle central dans l'internalisation des RCPG en interagissant avec des éléments clés de la machinerie endocytaire tels que la clathrine (Goodman *et al.*, 1996), l'adaptateur de clathrine AP2 (Laporte *et al.*, 1999), la petite protéine G ARF6 et son facteur d'échange de nucléotide guanine, ARNO (Claing *et al.*, 2001), ainsi que la protéine de fusion sensible au N-éthylmaléimide (NSF) (McDonald *et al.*, 1999). De plus, MDM2, une ubiquitine ligase E3, se lie aux β -arrestines et catalyse leur ubiquitination, ce qui est essentiel pour l'endocytose du RCPG médiée par la clathrine (Shenoy *et al.*, 2001). La présence ou l'absence de clusters de sérine et de thréonine dans l'extrémité C-terminale du RCPG conditionne l'affinité du recrutement de la β -arrestine et affecte ainsi le trafic intracellulaire d'un grand nombre de RCPG (Oakley *et al.*, 2000, 2001). De plus, bien que le mécanisme de recrutement des β -arrestines 1 et 2 aux RCPG soit similaire, l'affinité des RCPG pour la β -arrestine 1 ou 2 n'est pas obligatoirement équivalente. En effet, il a été défini deux classes de RCPG en fonction de leur affinité pour les deux isoformes de β -arrestine (Oakley *et al.*, 2000). Les RCPG de classe A (récepteur β 2 adrénergique,

μ opioïde, ...) ont une affinité plus grande pour la β-arrestine 2 que pour la β-arrestine 1 ainsi qu'une affinité nulle pour les arrestines visuelles. En revanche, les récepteurs de classe B (récepteur de l'angiotensine II, récepteur de la vasopressine, ...) ont une affinité similaire pour les deux isoformes de β-arrestine ainsi qu'une affinité plus faible mais néanmoins existante pour les arrestines visuelles.

Au-delà de leurs rôles dans le contrôle de la désensibilisation et de l'internalisation, les β-arrestines sont désormais considérées comme des protéines de transduction (Lefkowitz & Shenoy, 2005; Reiter & Lefkowitz, 2006). Il a été largement documenté que les β-arrestines sont des échafaudages multifonctionnels qui interagissent avec de nombreux partenaires protéiques, y compris les protéines kinases, et qu'elles ont ainsi un impact sur la phosphorylation de nombreuses cibles intracellulaires (Xiao *et al.*, 2007, 2010). Au fil des ans, plusieurs approches ont été utilisées pour déchiffrer les contributions respectives des protéines G et des β-arrestines à la fonction de RCPG. Il s'agit notamment i) d'invalidations des GRK ou des β-arrestines chez la souris et de l'utilisation de leurs homologues cellulaires MEF dérivés, ii) du blocage sélectif de la protéine G et des constituants de la voie de la β-arrestine *via* des ARN interférents, iii) de l'utilisation de dominants négatifs ou encore de petites molécules inhibitrices. Ces outils ont été utilisés avec succès pour décrypter de nouveaux mécanismes de transduction du signal et mieux caractériser la pharmacologie de RCPG spécifiques (DeWire *et al.*, 2007; DeWire & Violin, 2011). L'émergence récente de la technologie CRISPR Cas9 a cependant conduit deux groupes à contester la capacité des β-arrestines à induire la signalisation indépendamment des protéines G, suggérant que les β-arrestines ne seraient que de simples rhéostats de l'action des protéines G (O'Hayre *et al.*, 2017; Grundmann *et al.*, 2018). Mais il a ensuite été démontré que les lignées CRISPR Cas9 conduisent à un recâblage des voies de signalisation par rapport aux lignées parentales d'origine (Luttrell *et al.*, 2018). L'importance relative des β-arrestines dans la désensibilisation et la signalisation varie donc fortement en fonction du contexte cellulaire, du récepteur et du ligand. En conséquence, une analyse exhaustive et précise des différentes composantes de l'action des β-arrestines et des compensations qui font suite à l'édition du génome est indispensable pour pouvoir interpréter correctement les résultats de signalisation obtenus dans ce type de modèles cellulaires.

Le mécanisme de signalisation dépendant des β-arrestines le mieux caractérisé à ce jour est certainement celui des MAPK ERK1/2. Il a été démontré que les β-arrestines échafaudent Raf-1, MEK1 et ERK et séquestrent ERK1/2 phosphorylées dans le cytosol (Luttrell *et al.*, 2001). De façon intéressante, les kinases ERK1/2 sont simultanément activées par la protéine G et par les β-arrestines par des mécanismes distincts. L'activation de ERK1/2 dépendante de la protéine G est rapide et généralement transitoire. En revanche, l'activation de ERK1/2 dépendante de la β-arrestine est plus lente mais prolongée. Cependant, dans certains cas,

l'activation de ERK1/2 par la protéine G peut également inclure une phase soutenue, de sorte que la cinétique seule ne peut pas toujours distinguer la signalisation ERK1/2 médiée par la protéine G de celle impliquant la β-arrestine (Luo *et al.*, 2008). En plus des MAPK ERK, de nombreuses autres voies de signalisation sont affectées par les β-arrestines (Ahn *et al.*, 2020). En effet, les β-arrestines favorisent l'assemblage et l'activation des modules MAPK ASK1, MKK4/7 et JNK3 (McDonald *et al.*, 2000) ainsi que MKK4, MKK7 et JNK1/2 (Kook *et al.*, 2013) et déclenchent la signalisation p38 (Sun *et al.*, 2002; Bruchas *et al.*, 2006). La transactivation du récepteur EGF par les RCPG peut être régulée par les β-arrestines *via* l'activation d'une métalloprotéase matricielle transmembranaire qui clive le ligand EGF lié à la membrane (Noma *et al.*, 2007). Les β-arrestines peuvent inhiber la signalisation NF-κB par stabilisation de IκBα (Gao *et al.*, 2004). La β-arrestine 1 peut impacter directement les modifications épigénétiques en interagissant au niveau nucléaire avec les histones acétylases et désacétylases qui régulent la structure de la chromatine (Kang *et al.*, 2005). D'autres mécanismes de signalisation médiés par la β-arrestine incluent, entre autres, la formation de fibres de stress dépendantes de RhoA (Barnes *et al.*, 2005), la déphosphorylation d'Akt par la protéine phosphatase 2A (Beaulieu *et al.*, 2005), l'induction de la traduction protéique dépendante de MNK (DeWire *et al.*, 2008) et les effets anti-apoptotiques dépendant de p90RSK (Ahn *et al.*, 2009), l'activation de la phospholipase A2 par la phosphatidylinositol 3-kinase (Walters *et al.*, 2009) et l'activation de PTEN en aval de RhoA/ROCK (Lima-Fernandes *et al.*, 2011).

Au niveau moléculaire, il a été montré, en utilisant différentes approches expérimentales, que les β-arrestines 1 et 2 subissent des changements de conformation lors de l'interaction avec l'extrémité carboxyle phosphorylée des récepteurs (Xiao *et al.*, 2004; Charest *et al.*, 2005; Nobles *et al.*, 2007). Il a été proposé que les conformations de récepteurs fonctionnellement spécifiques induites par un ligand puissent être traduites en conformations spécifiques de la β-arrestine et avoir un impact sur leurs activités intracellulaires (Shukla *et al.*, 2008). Ce point de vue a été exploré plus avant à l'aide de sondes intracellulaires BRET ou FRET capables de détecter le répertoire conformationnel de la β-arrestine avec une meilleure précision (Lee *et al.*, 2016; Nuber *et al.*, 2016). Ces études ont conclu que des conformations distinctes de la β-arrestine peuvent être stabilisées d'une manière spécifique au récepteur et/ou au ligand. De façon intéressante, il a été rapporté que différents sous-types de GRK exercent des fonctions de régulation spécialisées. Il a ainsi été démontré pour plusieurs RCPG que la génération de seconds messagers est atténuée par GRK2 mais non affectée par GRK5 ou GRK6, alors que l'activation de ERK dépendante de la β-arrestine 2 nécessite l'action de GRK5 et GRK6 (Iwata *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005; Kara *et al.*, 2006; Shenoy *et al.*, 2006; Zidar *et al.*, 2009). À la lumière de ces

résultats, l'hypothèse selon laquelle il existe un « code-barres » de phosphorylation a été émise par les GRK à l'extrémité C terminale des RCPG. Ce code de phosphorylation régulerait la nature des fonctions intracellulaires des β -arrestines (Kim *et al.*, 2005 ; Reiter & Lefkowitz, 2006 ; Shenoy *et al.*, 2006 ; Tobin *et al.*, 2008). Des études indépendantes ont démontré que la phosphorylation des RCPG est en effet préférentiellement dirigée vers des sites spécifiques d'une manière dépendante du ligand et de la kinase (Busillo *et al.*, 2010 ; Butcher *et al.*, 2011 ; Nobles *et al.*, 2011 ; Yan *et al.*, 2011 ; Heitzler *et al.*, 2012).

Modifications post-transcriptionnelles des β -arrestines

Les arrestines, tout comme les RCPG, subissent diverses modifications post-transcriptionnelles qui influencent leur interaction avec les RCPG et avec d'autres protéines accessoires et affectent en particulier le trafic intracellulaire des récepteurs.

Phosphorylation

Deux études publiées en 1997 (Lin *et al.*, 1997) et 2002 (Lin *et al.*, 2002) ont montré que les β -arrestines sont phosphorylées à l'état basal. La stimulation du récepteur β 2 adrénergique favorise leur déphosphorylation, plus particulièrement celle de la sous-population de β -arrestines colocalisées avec le récepteur à la membrane plasmique (Lin *et al.*, 1997). Les sites de phosphorylation et les kinases ne sont pas conservés entre β -arrestine1 et β -arrestine2. La β -arrestine1 est phosphorylée sur la Ser412 par les kinases ERK1/2 (Lin *et al.*, 1997, 1999) tandis que la β -arrestine2 est phosphorylée sur la Thr383 par la caséine kinase de type II et sur la Ser361 par une kinase inconnue (Lin *et al.*, 2002). En utilisant les mutants non phosphorylable β -arrestine-1-S412A et phosphomimétique S412D, les auteurs ont montré que le recrutement d'arrestine au récepteur ainsi que la désensibilisation de ce dernier ne sont pas dépendants du statut de phosphorylation de l'arrestine. En revanche, le mutant S412A favorise la formation du complexe arrestine/clathrine ainsi que l'internalisation du récepteur (Lin *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus en mutant les sites de phosphorylation de la β -arrestine2 (Lin *et al.*, 2002). Toutefois, une étude ultérieure, bien qu'ayant confirmé la phosphorylation de la β -arrestine2 sur la Thr383 par CKII, n'a pas confirmé l'impact de cette phosphorylation sur la formation du complexe arrestine/clathrine (Kim *et al.*, 2002). Plus récemment, un mécanisme moléculaire original impliquant la phosphorylation de la β -arrestine2 sur la Thr383 par MEK en réponse à l'agoniste a été mis en évidence. Cette phosphorylation induirait un changement de conformation de la β -arrestine2 qui apparaît comme un préalable à l'induction de la phosphorylation de ERK par plusieurs RCPG (Cassier *et al.*, 2017). Une autre étude a rapporté un nouveau mécanisme de régulation de la dynamique d'interaction du complexe récepteur/ β -arrestine2 au niveau des endosomes. Cette modulation est

médiée par la phosphorylation du résidu Thr178 de la β -arrestine2 par ERK1/2 qui stabilise le complexe arrestine/récepteur et inhibe le recyclage de ce dernier à la membrane plasmique. Toutefois, le site Thr178 est présent uniquement dans la protéine β -arrestine2 de rat et n'est pas conservé dans la forme humaine. Notons que les deux mutants phosphomimétiques β -arrestine-2-T178D (pour le rat) et -K178D (pour l'humain) altèrent de manière similaire le trafic des récepteurs (Khouri *et al.*, 2014). Ces études montrent que la voie ERK1/2, une des voies de signalisation majeures en aval des RCPG, permet l'activation de boucles de rétroaction qui modulent le trafic et donc l'activité signalétique des RCPG.

Ubiquitination

C'est *via* leur ubiquitination que les arrestines contrôlent la vitesse de dégradation ou de recyclage des récepteurs. Ainsi, l'ubiquitination d'arrestine par l'E3-ligase Mdm2 favorise l'internalisation du récepteur β 2 adrénergique (Shenoy *et al.*, 2001). De manière intéressante, les sites ubiquitinés sur les β -arrestines varient selon le récepteur activé et pourraient donc être impliqués dans différentes fonctions physiologiques (Perroy *et al.*, 2004 ; Shenoy *et al.*, 2007). En revanche, le même schéma d'ubiquitination semble être partagé entre les récepteurs de classe A et les récepteurs de classe B. Les β -arrestines engagées aux récepteurs de classe A, capables de recycler à la membrane plasmique, sont ubiquitinées de manière transitoire, contrairement aux arrestines en complexe avec les récepteurs de classe B dirigés vers les voies de dégradation lysosomales, dont l'ubiquitination est plus soutenue (Perroy *et al.*, 2004 ; Shenoy *et al.*, 2007). Cette ubiquitination soutenue semble aussi favoriser la formation de signalosomes au niveau des arrestines, qui engagent par exemple des composants de la voie ERK1/2 (Shenoy *et al.*, 2007).

SUMOylation

La SUMOylation de la β -arrestine2 sur les résidus K295 et K400 a été démontrée (Wyatt *et al.*, 2011). La SUMOylation du site majeur K400 est activée par la stimulation du récepteur β 2 adrénergique. Les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle le changement de conformation de la β -arrestine lors de sa fixation au récepteur activé permet d'exposer le résidu K400 de la queue C-ter à l'enzyme Ubc9. L'inhibition de la SUMOylation de la β -arrestine, par mutagenèse dirigée ou par baisse de l'expression d'Ubc9, bloque l'internalisation des récepteurs AT1R de l'angiotensine et du récepteur β 2 adrénergique. Cette inhibition ne correspond pas à une baisse du recrutement de la β -arrestine au récepteur mais à une diminution de son interaction avec AP-2, un des composants de la machinerie endocytaire.

S-nitrosylation

L'oxyde nitrique (NO) participe à la S-nitrosylation des résidus Cys des protéines cibles en convertissant le groupement thiol en S-nitrosothiol (S-NO) (Gould *et al.*,

2013). Il a été démontré que la β -arrestine 2, mais pas la β -arrestine 1, est S-nitrosylée sur le résidu Cys410 après stimulation du récepteur β 2 adrénergique (Ozawa *et al.*, 2008). Cette S-nitrosylation entraîne le découplage du complexe eNOS/arrestine et favorise la liaison d'arrestine à AP-2 et la clathrine, ce qui induit l'internalisation du récepteur β 2 adrénergique. Après stimulation, la β -arrestine 2 est rapidement dénitrétylée. Il est intéressant de noter que dans ce processus, la β -arrestine 2 sert aussi de protéine d'échafaudage pour l'enzyme eNOS activée par le récepteur β 2 adrénergique (Ozawa *et al.*, 2008) et facilite la S-nitrosylation d'autres substrats tels que GRK2 (Whalen *et al.*, 2007). Ainsi, eNOS pourrait permettre la coordination de la régulation de trois éléments majeurs dans l'internalisation et le trafic des RCPG : les GRK, les arrestines et la dynamine.

β -arrestines et signalisation biaisée

De nombreuses évidences structurelles, biophysiques et pharmacologiques accumulées depuis quelques années ont profondément transformé notre vision de l'activation des RCPG et de leur ciblage thérapeutique. Il n'y a pas si longtemps, un large consensus existait pour penser qu'une conformation inactive d'un récepteur est en équilibre avec une unique conformation active liée à un ligand. En conséquence, la force d'un agoniste était censée refléter directement la proportion de conformation de récepteur active par rapport à la conformation inactive. Par la suite, la découverte d'agonistes partiels et d'agonistes inverses a révélé de nouvelles propriétés pharmacologiques au-delà des agonistes complets et des antagonistes neutres, mais ces types d'activités étaient toujours compatibles avec le modèle à deux états. Cependant, plusieurs exemples ont été rapportés qui ne correspondaient pas à ce paradigme : certains composés ont généré différentes puissances relatives dans différents dosages (Watson *et al.*, 2000). Ces résultats, controversés au départ, ont été répétés avec un nombre croissant de RCPG. Entre-temps, le fait que plusieurs conformations de récepteurs actives et inactives coexistent a été étayé par des preuves structurelles et biophysiques très fortes (Kobilka, 2011 ; Nygaard *et al.*, 2013 ; Wacker *et al.*, 2013). Par conséquent, la théorie pharmacologique a été révisée et l'efficacité est désormais considérée comme multidimensionnelle. Elle intègre explicitement la notion selon laquelle les récepteurs engagent des sous-ensembles distincts de leur répertoire de signalisation complet (Galandrin *et al.*, 2007). Cela signifie que différents sous-ensembles de conformations peuvent être stabilisés par différents agonistes ou mutation/polymorphisme pour un RCPG donné et que chacun de ces ensembles conformationnels est connecté à des mécanismes de transduction distincts. C'est le concept de signalisation sélective ou biais pharmacologique (Kenakin, 2003 ; Violin & Lefkowitz, 2007 ; Reiter *et al.*, 2012). Selon ces principes, il est possible de contrôler sélectivement l'activation de telle ou telle voie de signalisation avec des ligands biaisés ou avec des modifications spécifiques d'acides aminés au niveau des récepteurs. Les sites

orthostériques sur les RCPG se lient aux agonistes endogènes et sont également reconnus par les antagonistes compétitifs classiques et les agonistes inverses. En revanche, les sites allostériques sur un récepteur sont distincts du site orthostérique et peuvent affecter soit positivement soit négativement l'activité du récepteur, conjointement avec des ligands orthostériques ou seuls. Il est important de noter que, pour les RCPG, les modulateurs allostériques synthétiques sont maintenant découverts à un rythme élevé et peuvent également entraîner un biais pharmacologique, offrant de nouvelles voies dans la découverte de médicaments (Changeux & Christopoulos, 2016). Ces ligands allostériques peuvent moduler les conformations des récepteurs en présence de ligands orthostériques et ont donc le potentiel d'affiner, positivement ou négativement, les réponses suscitées aussi bien par des ligands endogènes ou synthétiques.

L'étude des biais pharmacologiques est rapidement devenue un domaine de recherche extrêmement actif et, une fois de plus, les β -arrestines y occupent une place prépondérante puisqu'un grand nombre de ligands présentant des biais sur les fonctions médiées par la β -arrestine ont été rapportés. Certains ligands biaisés favorisent la transduction dépendante de la protéine G tandis que d'autres déclenchent préférentiellement des voies médiées par la β -arrestine. Il est important de noter que des ligands biaisés capables de stabiliser un sous-ensemble du répertoire de conformations du récepteur ont été rapportés pour améliorer l'équilibre entre les effets secondaires indésirables et les effets bénéfiques (Whalen *et al.*, 2011). L'avènement de nouvelles classes non conventionnelles de composés ciblant les RCPG tels que les peptidines (Carr & Benovic, 2016), les aptamères (Kahsai *et al.*, 2016), les intracorps (Staus *et al.*, 2014) ou les nanobodies (Mujic-Delic *et al.*, 2014 ; Staus *et al.*, 2016) étendent encore plus l'éventail des possibilités d'approches innovantes de découverte de médicaments à développer à l'avenir.

Jusqu'à présent, les ligands biaisés ont concentré l'essentiel de l'attention dans le domaine de la pharmacologie RCPG car ils représentent des pistes potentielles pour le développement de nouveaux médicaments. Cependant, la notion de biais s'applique également aux modifications se produisant au niveau du récepteur (Landomiel *et al.*, 2014). Les premiers exemples de mutations conduisant à un biais β -arrestine ont concerné le récepteur de l'angiotensine de type 2 : DRY-AAY (Wei *et al.*, 2003) et le récepteur β 2 adrénergique : β 2AR-TYY (Shenoy *et al.*, 2006). Cette notion de biais pharmacologique joue donc également un rôle crucial en médecine car elle peut se matérialiser chez les patients portant des mutations ou des polymorphismes critiques au niveau des RCPG. De ce fait, le concept de biais pharmacologique change la façon d'étudier les conséquences fonctionnelles des mutations et des polymorphismes se produisant au niveau du récepteur. Ce type de question était traditionnellement évalué en suivant la perte ou le gain de fonction selon le modèle simple à deux états. À présent, l'exploration doit intégrer les multiples dimensions de l'activité des

récepteurs grâce à des analyses multiplexées des différentes voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs en aval.

Rôle des β -arrestines dans la compartimentalisation de la signalisation des RCPG

Une énigme majeure associée à la signalisation RCPG réside dans le fait que le nombre de ligands et de récepteurs semble largement surpasser le nombre relativement limité de mécanismes de transduction et de voies de signalisation en aval disponibles. Pour contourner ce problème, il a été proposé que la machinerie de signalisation puisse utiliser un encodage spatial et temporel afin de maintenir l'ensemble des informations et la spécificité conférés par la paire récepteur/ligand (Lohse & Hofmann, 2015). Dans cette optique, les événements de signalisation déclenchés par un RCPG sont caractérisés par leur cinétique et leurs schémas spatiaux et correspondent à une signature spécifique du récepteur, du contexte cellulaire et de la nature du ligand. Le régime d'exposition au ligand peut également conduire à des signatures de signalisation spécifiques, une possibilité qui pourrait être particulièrement pertinente dans le contexte des systèmes endocriniens. Les aspects cinétiques et spatiaux de la signalisation RCPG ont commencé à être explorés avec l'élucidation de la dynamique de l'activation des récepteurs, du couplage des protéines G et de l'activation des protéines G pour certains récepteurs (Lohse *et al.*, 2008 ; Jensen *et al.*, 2009). Dans le modèle classique, la signalisation de la protéine G provient de la surface cellulaire et est suivie d'une extinction rapide, médiée par la β -arrestine, de la signalisation de la protéine G. Des découvertes récentes ont commencé à remettre en question ce paradigme. Il a été rapporté qu'un certain nombre de RCPG provoquent une signalisation soutenue de la protéine G, plutôt que d'être désensibilisés après une stimulation agoniste initiale (Calebiro *et al.*, 2009 ; Ferrandon *et al.*, 2009 ; Mullershausen *et al.*, 2009 ; Feinstein *et al.*, 2013 ; Irannejad *et al.*, 2013). Par exemple, il a été proposé que, pour certains RCPG, une série de vagues de signalisation distinctes puisse apparaître lors de l'activation (Lohse & Calebiro, 2013). Dans ce modèle, une première vague est déclenchée à la surface cellulaire lors du couplage de la protéine G et entraîne la libération du second messager. Une deuxième vague suit au niveau des puits recouverts de clathrine lorsque la β -arrestine associée au récepteur induit des signaux tels que l'activation d'ERK. Récemment, une troisième vague a été décrite qui implique la signalisation *via* les protéines G du compartiment endosomal et peut avoir des effets physiologiques spécifiques (Calebiro *et al.*, 2009, 2010 ; Ferrandon *et al.*, 2009 ; Mullershausen *et al.*, 2009 ; Feinstein *et al.*, 2011, 2013 ; Irannejad *et al.*, 2013 ; Vilardaga *et al.*, 2014 ; Tsvetanova *et al.*, 2015 ; Ismail *et al.*, 2016). Ces découvertes sont en contradiction avec la vision classique de la signalisation des RCPG dans laquelle une interaction persistante de la

β -arrestine avec le récepteur devrait empêcher l'activation de la protéine G. La cristallographie aux rayons X du récepteur $\beta 2$ adrénergique en complexe avec G α s a révélé que l'interaction implique à la fois les domaines N-terminal et C-terminal de la sous-unité G α s et le noyau du récepteur (c'est-à-dire la boucle intracellulaire 2 et les domaines transmembranaires 5 et 6) (Rasmussen *et al.*, 2011). Une étude récente a révélé que la β -arrestine interagit avec deux sites différents sur le récepteur, l'un à l'extrémité carboxyle du récepteur phosphorylé et l'autre, au cœur du récepteur (Shukla *et al.*, 2014). Il est important de noter que des complexes de récepteurs internalisés appelés « méga-complexes » composés d'un seul RCPG, d'une β -arrestine et d'une protéine G ont été récemment découverts et leur architecture et leur fonctionnalité décrites (Thomsen *et al.*, 2016). Ceux-ci semblent se former préférentiellement avec des récepteurs qui interagissent fortement avec les β -arrestines *via* une extrémité carboxyle contenant des clusters de phosphorylation sérine/thréonine. En effet, l'analyse par cryo-EM de méga-complexes purifiés a révélé qu'un seul récepteur peut simultanément se lier à travers son noyau transmembranaire avec la protéine G et à travers son extrémité carboxyle phosphorylée avec la β -arrestine (Figure 1).

Une autre illustration très intéressante de l'importance des β -arrestines dans le contrôle des signaux dans l'espace et dans le temps provient d'une étude de la signalisation de l'AMPc par le récepteur de la relaxine RXFP1 (Halls & Cooper, 2010). La relaxine est connue pour circuler à une concentration très faible et est pourtant capable de déclencher la signalisation de l'AMPc (Halls, 2012). Un mécanisme moléculaire a été proposé qui implique l'assemblage constitutif d'un signalosome au RXFP1. Ce dernier est composé de G α s, de G $\beta\gamma$ et de l'adénylyl cyclase 2 (AC2) couplée fonctionnellement à AKAP79, cette dernière étant liée à l'hélice 8 du RXFP1. De plus, il est important de noter que la β -arrestine 2 s'associe simultanément à l'extrémité carboxyle de RXFP1 et échafaude la protéine kinase A (PKA) et la PDE4D3. Dans ce signalosome, l'activation de l'AC2 est donc toniquement contenue par la PDE4D3 activée par la PKA. Ce signalosome RXFP1 permet au récepteur de répondre à des concentrations attomolaires de relaxine (Halls & Cooper, 2010). D'autres hormones – comme les gonadotrophines par exemple – activent également la signalisation de l'AMPc à très faible concentration circulante (*i.e.*, EC50 dans la gamme picomolaire), ce qui est difficile à expliquer sur la seule base de l'occupation des récepteurs (Ayoub *et al.*, 2015). L'existence de signalosomes pré-assemblés du même type que ceux décrits pour RXFP1 est donc potentiellement intéressante et mérite des investigations à l'avenir.

Récemment, deux articles ont apporté un nouvel éclairage sur les rôles distincts du domaine carboxyle phosphorylé et du noyau du récepteur dans la médiation de l'interaction de la β -arrestine et de l'activation par les RCPG (Eichel *et al.*, 2018 ; Latorraca *et al.*, 2018). Comme discuté plus haut, des études structurales récentes de l'interaction de l'arrestine avec la rhodopsine dans la

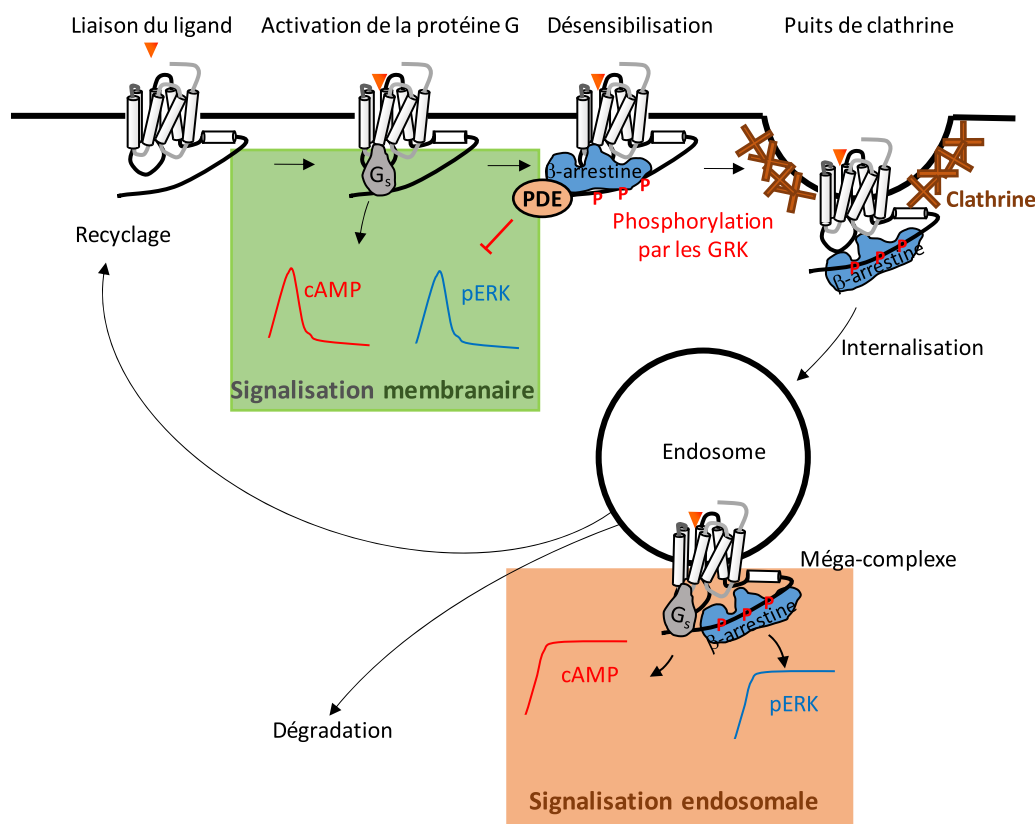


Figure 1. Représentation schématique du rôle des β -arrestines dans les différentes phases de l'activation et du trafic des RCPG. La signalisation est initiée depuis la membrane plasmique puis rapidement désensibilisée. Une seconde phase de signalisation plus persistante est alors déclenchée par la formation d'un méga-complexe dans l'endosome. PDE : phosphodiesterase ; GRK : kinases spécifiques des RCPG.

rétiline et de celle de la β -arrestine avec d'autres RCPG ont révélé deux types d'interactions au sein des complexes récepteur-arrestine : l'une impliquant la queue cytoplasmique phosphorylée du RCPG et l'autre impliquant son cœur transmembranaire ou noyau (Shukla *et al.*, 2014 ; Kang *et al.*, 2015). Il a été suggéré que ces deux modes d'interaction fassent intervenir deux sites distincts des arrestines : un « capteur de phosphorylation » et un « capteur d'activation ». Utilisant des simulations moléculaires dynamiques de l'arrestine au niveau atomique, Latorraca *et al.* (2018) ont étudié les mécanismes structurels par lesquels la queue cytoplasmique phosphorylée et le noyau transmembranaire régulent l'activation de l'arrestine. Les auteurs montrent que le déplacement de sa queue carboxyle conduit à une prolongation de l'état actif de l'arrestine, même lorsqu'elle n'est pas liée au récepteur. Cela peut expliquer le fait que la β -arrestine reste active et continue de « signaler » même après sa dissociation du RCPG activé (Eichel *et al.*, 2016). En utilisant la structure rhodopsine-arrestine comme modèle pour leur simulation, les auteurs démontrent que le noyau du récepteur et la queue carboxyle stabilisent chacun individuellement les conformations actives de l'arrestine. La liaison simultanée des deux régions ajoute une stabilisation supplémentaire. De façon intéressante, les résultats de Latorraca *et al.* (2018), obtenus principalement

par des simulations moléculaires dynamiques, sont cohérents avec ceux d'Eichel *et al.* (2018) qui, à l'aide de diverses techniques de biologie cellulaire, démontrent également que les interactions transitoires du cœur transmembranaire du RCPG sont suffisantes pour activer la β -arrestine. Eichel *et al.* (2018) montrent que l'activation et la signalisation soutenues de la β -arrestine après sa dissociation du RCPG nécessitent une interaction uniquement avec le cœur transmembranaire et pas avec la queue cytoplasmique. Cette activation de la β -arrestine dans la membrane plasmique implique une série d'interactions avec les phosphoinositides membranaires, et son accumulation dans les puits à clathrine (Figure 2).

Une telle activation multimodale des arrestines par le biais d'interactions avec le cœur transmembranaire du RCPG ou avec sa queue cytoplasmique souligne la chorégraphie complexe qui sous-tend les diverses fonctions régulatrices des β -arrestines.

Conclusions

Les β -arrestines sont reconnues comme des acteurs majeurs de la fonction des RCPG depuis près de trois décennies. La mise en évidence de leur implication dans le phénomène de biais pharmacologiques a ouvert la possibilité d'activer ou d'inhiber, tout ou partie de leurs

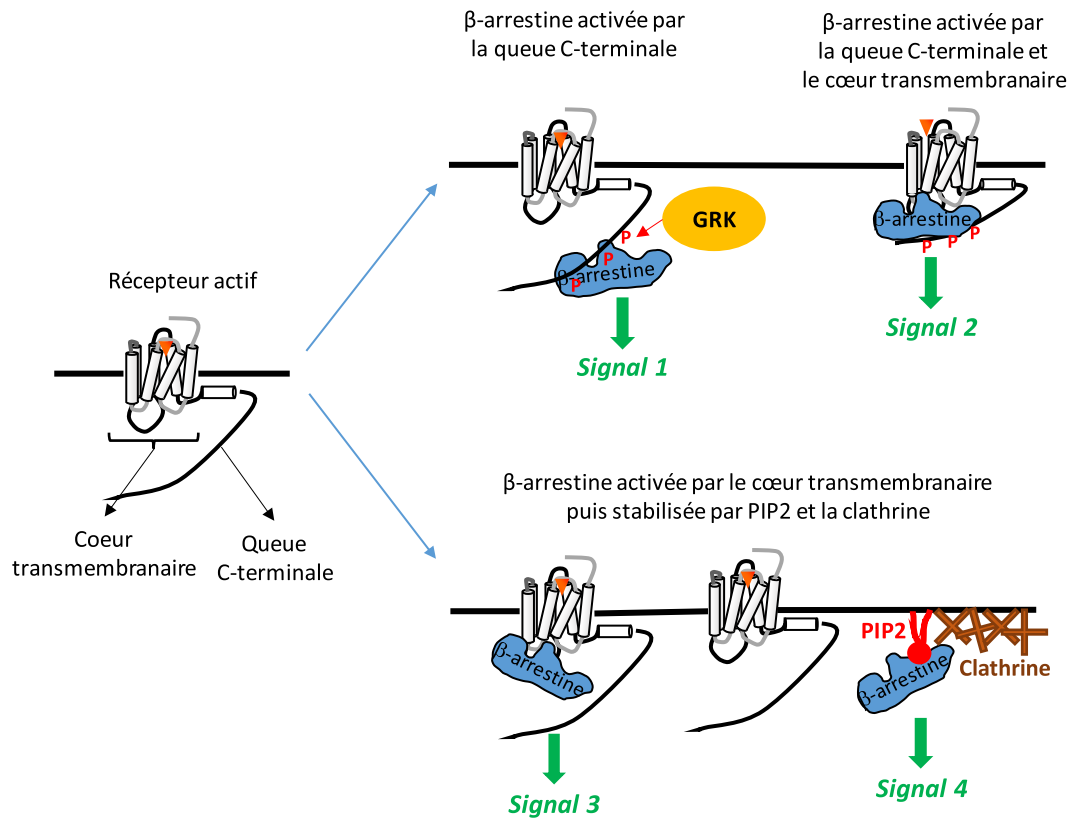


Figure 2. Représentation schématique des différents mécanismes d'activation de la signalisation par les β -arrestines. Les β -arrestines peuvent induire des signaux intracellulaires soit en s'associant au RCPG phosphorylé *via* sa queue C-terminale ou *via* sa queue C-terminale et son cœur transmembranaire (mécanisme classique, en haut), soit en s'associant transitoirement au RCPG non phosphorylé *via* son cœur transmembranaire, ce qui induit l'association de phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) avec les β -arrestines, stabilisant ainsi la conformation active de ces dernières qui peuvent alors induire des signaux depuis des structures membranaires contenant la clathrine (mécanisme émergent, en bas). L'existence même et/ou la proportion entre ces différents modes d'activation varient en fonction du récepteur et du contexte cellulaire.

fonctions, grâce à des ligands sélectifs de RCPG. L'intérêt thérapeutique de certains ligands biaisés de ce type est maintenant avéré. Ces avancées, conjuguées à la meilleure compréhension que nous avons maintenant des mécanismes moléculaires et cellulaires utilisés par les β -arrestines pour induire des réponses biologiques, ouvrent la voie au développement rationnel de médicaments capables de contrôler les contributions relatives des protéines G et celles des β -arrestines en aval de RCPG cibles. De tels médicaments présenteront potentiellement une meilleure fenêtre thérapeutique et sont donc porteurs d'innovation et d'espoir.

Références

- Ahn, S., Kim, J., Hara, M.R., Ren, X.R., Lefkowitz, R.J. (2009). β -arrestin 2 mediates anti-apoptotic signaling through regulation of BAD phosphorylation. *J Biol Chem*, 284, 8855-8865.
- Ahn, S., Shenoy, S.K., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2020). SnapShot: beta-arrestin functions. *Cell*, 182, 1362-1362.e1.
- Ayoub, M.A., Landomiel, F., Gallay, N., Jegot, G., Poupon, A., Crépieux, P., Reiter, E. (2015). Assessing gonadotropin receptor function by resonance energy transfer-based assays. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 130.
- Barnes, W.G., Reiter, E., Violin, J.D., Ren, X.R., Milligan, G., Lefkowitz, R.J. (2005). Beta-arrestin 1 and G-protein-coupled receptor coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem*, 280, 8041-8050.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2005). An akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, 122, 261-273.
- Bruchas, M.R., Macey, T.A., Lowe, J.D., Chavkin, C. (2006). Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*, 281, 18081-18089.
- Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., Benovic, J.L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*, 285, 7805-7817.
- Butcher, A.J., Prihandoko, R., Kong, K.C., McWilliams, P., Edwards, J.M., Bottrill, A., Mistry, S., Tobin, A.B. (2011). Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem*, 286, 11506-11518.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., De Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., Lohse, M.J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol*, 7, e1000172.

- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Persani, L., Lohse, M.J. (2010). Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 221-228.
- Carr, R. 3rd, Benovic, J.L. (2016). From biased signalling to polypharmacology: Unlocking unique intracellular signalling using peptidic ligands. *Biochem Soc Trans*, 44, 555-561.
- Cassier, E., Gallay, N., Bourquard, T., Claeysen, S., Bockaert, J., Crépieux, P., Poupon, A., Reiter, E., Marin, P., Vandermoere, F. (2017). Phosphorylation of beta-arrestin2 at Thr (383) by MEK underlies beta-arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife*, 6.
- Changeux, J.P., Christopoulos, A. (2016). Allosteric modulation as a unifying mechanism for receptor function and regulation. *Cell*, 166, 1084-1102.
- Charest, P.G., Terrillon, S., Bouvier, M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep*, 6, 334-340.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Prémont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2001). beta-arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276, 42509-42513.
- De Lean, A., Stadel, J.M., Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 255, 7108-7117.
- DeVree, B.T., Mahoney, J.P., Velez-Ruiz, G.A., Rasmussen, S. G., Kuzak, A.J., Edwald, E., Fung, J.J., Manglik, A., Masureel, M., Du, Y., Matt, R.A., Pardon, E., Steyaert, J., Kobilka, B.K., Sunahara, R.K. (2016). Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs. *Nature*, 535, 182-186.
- DeWire, S.M., Violin, J.D. (2011). Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology. *Circ Res*, 109, 205-216.
- DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69, 483-510.
- DeWire, S.M., Kim, J., Whalen, E.J., Ahn, S., Chen, M., Lefkowitz, R.J. (2008). Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem*, 283, 10611-10620.
- Eichel, K., Jullie, D., von Zastrow, M. (2016). beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol*, 18, 303-310.
- Eichel, K., Jullie, D., Barsi-Rhyné, B., Latorraca, N.R., Masureel, M., Sibarita, J.B., Dror, R.O., von Zastrow, M. (2018). Catalytic activation of beta-arrestin by GPCRs. *Nature*, 557, 381-386.
- Feinstein, T.N., Wehbi, V.L., Ardura, J.A., Wheeler, D.S., Ferrandon, S., Gardella, T.J., Vilardaga, J.P. (2011). Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol*, 7, 278-284.
- Feinstein, T.N., Yui, N., Webber, M.J., Wehbi, V.L., Stevenson, H.P., King, J.D., Jr., Hallows, K.R., Brown, D., Bouley, R., Vilardaga, J.P. (2013). Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem*, 288, 27849-27860.
- Ferrandon, S., Feinstein, T.N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J.T., Gardella, T.J., Vilardaga, J.P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*, 5, 734-742.
- Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res*, 51, 319-351; discussion 352-353.
- Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: Implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 423-430.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., Pei, G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell*, 14, 303-317.
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, 383, 447-450.
- Gould, N., Doulias, P.T., Tenopoulou, M., Raju, K., Ischiropoulos, H. (2013). Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem*, 288, 26473-26479.
- Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Ruttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N. K., Ishida, S., Muller, I., Reher, R., Kawakami, K., Inoue, A., Rick, U., Kuhl, T., Imhof, D., Aoki, J., König, G.M., Hoffmann, C., Gomeza, J., Wess, J., Kostenis, E. (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun*, 9, 341.
- Gurevich, V.V., Benovic, J.L. (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem*, 268, 11628-11638.
- Halls, M.L. (2012). Constitutive formation of an RXFP1-signalosome: a novel paradigm in GPCR function and regulation. *Br J Pharmacol*, 165, 1644-1658.
- Halls, M.L., Cooper, D.M. (2010). Sub-picomolar relaxin signalling by a pre-assembled RXFP1, AKAP79, AC2, beta-arrestin 2, PDE4D3 complex. *EMBO J*, 29, 2772-2787.
- Heitzler, D., Durand, G., Gallay, N., Rizk, A., Ahn, S., Kim, J., Violin, J.D., Dupuy, L., Gauthier, C., Piketty, V., Crépieux, P., Poupon, A., Clément, F., Fages, F., Lefkowitz, R.J., Reiter, E. (2012). Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and beta-arrestin signaling. *Mol Syst Biol*, 8, 590.
- Irannejad, R., Tomshine, J.C., Tomshine, J.R., Chevalier, M., Mahoney, J.P., Steyaert, J., Rasmussen, S.G., Sunahara, R. K., El-Samad, H., Huang, B., von Zastrow, M. (2013). Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, 495, 534-538.
- Ismail, S., Gherardi, M.J., Froese, A., Zanon, M., Gigoux, V., Clerc, P., Gaits-Iacovoni, F., Steyaert, J., Nikolaev, V.O., Fourmy, D. (2016). Internalized receptor for glucose-dependent insulinotropic peptide stimulates adenylyl cyclase on early endosomes. *Biochem Pharmacol*, 120, 33-45.
- Iwata, K., Luo, J., Penn, R.B., Benovic, J.L. (2005). Bimodal regulation of the human H1 histamine receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, 280, 2197-2204.
- Jensen, J.B., Lyssand, J.S., Hague, C., Hille, B. (2009). Fluorescence changes reveal kinetic steps of muscarinic receptor-mediated modulation of phosphoinositides and Kv7.2/7.3 K+ channels. *J Gen Physiol*, 133, 347-359.
- Kahsai, A.W., Wisler, J.W., Lee, J., Ahn, S., Cahill Iii, T.J., Dennison, S.M., Staus, D.P., Thomsen, A.R., Anastasi, K.M., Pani, B., Wingler, L.M., Desai, H., Bompiani, K.M., Strachan, R.T., Qin, X., Alam, S.M., Sullenger, B.A., Lefkowitz, R.J. (2016). Conformationally selective RNA aptamers allosterically modulate the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol*, 12, 709-716.
- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., Yang, R., Fan, F., Chen, X., Pei, G., Ma, L. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, 123, 833-847.
- Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., Xu, Q., De Waal, P.W., Ke, J., Tan, M.H., Zhang, C., Moeller, A., West,

- G.M., Pascal, B.D., Van Eps, N., Caro, L.N., Vishnivetskiy, S.A., Lee, R.J., Suino-Powell, K.M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatsepin, N.A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy-Chowdhury, S., Conrad, C.E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C.S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, H.N., Spence, J.C., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O.P., Katritch, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Hubbell, W.L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Melcher, K., Xu, H.E. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, 523, 561-567.
- Kara, E., Crépieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., Reiter, E. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol*, 20, 3014-3026.
- Kenakin, T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 346-354.
- Khoury, E., Nikolajev, L., Simaan, M., Namkung, Y., Laporte, S.A. (2014). Differential regulation of endosomal GPCR/beta-arrestin complexes and trafficking by MAPK. *J Biol Chem*, 289, 23302-23317.
- Kim, Y.M., Barak, L.S., Caron, M.G., Benovic, J.L. (2002). Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem*, 277, 16837-16846.
- Kim, J., Ahn, S., Ren, X.R., Whalen, E.J., Reiter, E., Wei, H., Lefkowitz, R.J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 1442-1447.
- Kobilka, B.K. (2011). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 32, 213-218.
- Kook, S., Zhan, X., Kaoud, T.S., Dalby, K.N., Gurevich, V.V., Gurevich, E.V. (2013). Arrestin-3 binds c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and JNK2 and facilitates the activation of these ubiquitous JNK isoforms in cells via scaffolding. *J Biol Chem*, 288, 37332-37342.
- Landomiel, F., Gallay, N., Jegot, G., Tranchant, T., Durand, G., Bourquard, T., Crépieux, P., Poupon, A., Reiter, E. (2014). Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Mol Cell Endocrinol*, 382, 452-459.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., Barak, L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 3712-3717.
- Latorraca, N.R., Wang, J.K., Bauer, B., Townshend, R.J.L., Hollingsworth, S.A., Olivieri, J.E., Xu, H.E., Sommer, M.E., Dror, R.O. (2018). Molecular mechanism of GPCR-mediated arrestin activation. *Nature*, 557, 452-456.
- Lee, M.H., Appleton, K.M., Strungs, E.G., Kwon, J.Y., Morinelli, T.A., Peterson, Y.K., Laporte, S.A., Luttrell, L.M. (2016). The conformational signature of beta-arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature*, 531, 665-668.
- Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-517.
- Lima-Fernandes, E., Enslin, H., Camand, E., Kotelevets, L., Boullaran, C., Achour, L., Benmerah, A., Gibson, L.C., Baillie, G.S., Pitcher, J.A., Chastre, E., Etienne-Manneville, S., Marullo, S., Scott, M.G. (2011). Distinct functional outputs of PTEN signalling are controlled by dynamic association with beta-arrestins. *EMBO J*, 30, 2557-2568.
- Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Frederick, Z.L., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem*, 272, 31051-31057.
- Lin, F.T., Miller, W.E., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin 1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*, 274, 15971-15974.
- Lin, F.T., Chen, W., Shenoy, S., Cong, M., Exum, S.T., Lefkowitz, R.J. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry*, 41, 10692-10699.
- Lohse, M.J., Calebiro, D. (2013). Cell biology: Receptor signals come in waves. *Nature*, 495, 457-458.
- Lohse, M.J., Hofmann, K.P. (2015). Spatial and temporal aspects of signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 88, 572-578.
- Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., Hein, P., Hoffmann, C., Vilardaga, J.P., Bunemann, M. (2008). Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 159-165.
- Luo, J., Busillo, J.M., Benovic, J.L. (2008). M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*, 74, 338-347.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2449-2454.
- Luttrell, L.M., Wang, J., Plouffe, B., Smith, J.S., Yamani, L., Kaur, S., Jean-Charles, P.Y., Gauthier, C., Lee, M.H., Pani, B., Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, S., Reiter, E., Bouvier, M., Shenoy, S.K., Laporte, S.A., Rockman, H.A., Lefkowitz, R.J. (2018). Multifunctional roles of beta-arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Sci Signal*, 11 (549), eaat7650.
- Martini, L., Hastrup, H., Holst, B., Fraile-Ramos, A., Marsh, M., Schwartz, T.W. (2002). NK1 receptor fused to beta-arrestin displays a single-component, high-affinity molecular phenotype. *Mol Pharmacol*, 62, 30-37.
- McDonald, P.H., Cote, N.L., Lin, F.T., Prémont, R.T., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1999). Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem*, 274, 10677-10680.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., Lefkowitz, R.J. (2000). Beta-arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, 290, 1574-1577.
- Mujic-Delic, A., De Wit, R.H., Verkaar, F., Smit, M.J. (2014). GPCR-targeting nanobodies: attractive research tools, diagnostics, and therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 247-255.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol*, 5, 428-434.
- Nelson, C.D., Perry, S.J., Regier, D.S., Prescott, S.M., Topham, M.K., Lefkowitz, R.J. (2007). Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science*, 315, 663-666.
- Nobles, K.N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T.G., Lefkowitz, R.J. (2007). The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem*, 282, 21370-21381.

- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., Shenoy, S.K., Gygi, S.P., Lefkowitz, R.J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal*, 4, ra51.
- Noma, T., Lemaire, A., Naga Prasad, S.V., Barki-Harrington, L., Tilley, D.G., Chen, J., Le Corvoisier, P., Violin, J.D., Wei, H., Lefkowitz, R.J., Rockman, H.A. (2007). Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest*, 117, 2445-2458.
- Nuber, S., Zabel, U., Lorenz, K., Nuber, A., Milligan, G., Tobin, A.B., Lohse, M.J., Hoffmann, C. (2016). beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature*, 531, 661-664.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Shaw, D.E., Mueller, L., Prosser, R.S., Kobilka, B.K. (2013). The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell*, 152, 532-542.
- O'Hayre, M., Eichel, K., Avino, S., Zhao, X., Steffen, D.J., Feng, X., Kawakami, K., Aoki, J., Messer, K., Sunahara, R., Inoue, A., Von Zastrow, M., Gutkind, J.S. (2017). Genetic evidence that beta-arrestins are dispensable for the initiation of beta2-adrenergic receptor signaling to ERK. *Sci Signal*, 10(484), eaal 3395.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin 2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, 275, 17201-17210.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276, 19452-19460.
- Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., Stamler, J.S. (2008). S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell*, 31, 395-405.
- Perroy, J., Pontier, S., Charest, P.G., Aubry, M., Bouvier, M. (2004). Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods*, 1, 203-208.
- 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. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science*, 298, 834-836.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K. Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K. (2011). Crystal structure of the beta 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477, 549-555.
- Reiter, E., Lefkowitz, R.J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 17, 159-165.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 179-197.
- Ren, X.R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 1448-1453.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, 294, 1307-1313.
- Shenoy, S.K., Drake, M.T., Nelson, C.D., Houtz, D.A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Prémont, R.T., Lichtarge, O., Lefkowitz, R.J. (2006). β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281, 1261-1273.
- Shenoy, S.K., Barak, L.S., Xiao, K., Ahn, S., Berthouze, M., Shukla, A.K., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2007). Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem*, 282, 29549-29562.
- Shukla, A.K., Violin, J.D., Whalen, E.J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 9988-9993.
- Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., Dosey, A.M., Su, M., Liang, C.R., Gu, L.L., Shan, J.M., Chen, X., Hanna, R., Choi, M., Yao, X.J., Klink, B.U., Kahsai, A. W., Sidhu, S.S., Koide, S., Penczek, P.A., Kossiakoff, A.A., Woods, V.L., Jr., Kobilka, B.K., Skiniotis, G., Lefkowitz, R.J. (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 512, 218-222.
- Staus, D.P., Wingler, L.M., Strachan, R.T., Rasmussen, S.G., Pardon, E., Ahn, S., Steyaert, J., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R. J. (2014). Regulation of beta2-adrenergic receptor function by conformationally selective single-domain intrabodies. *Mol Pharmacol*, 85, 472-481
- Staus, D.P., Strachan, R.T., Manglik, A., Pani, B., Kahsai, A. W., Kim, T.H., Wingler, L.M., Ahn, S., Chatterjee, A., Masoudi, A., Kruse, A.C., Pardon, E., Steyaert, J., Weis, W. I., Prosser, R.S., Kobilka, B.K., Costa, T., Lefkowitz, R.J. (2016). Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature*, 535, 448-452.
- Strachan, R.T., Sun, J.P., Rominger, D.H., Violin, J.D., Ahn, S., Rojas Bie Thomsen, A., Zhu, X., Kleist, A., Costa, T., Lefkowitz, R.J. (2014). Divergent transducer-specific molecular efficacies generate biased agonism at a G protein-coupled receptor (GPCR). *J Biol Chem*, 289, 14211-14224.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., Pei, G. (2002). Beta-arrestin 2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem*, 277, 49212-49219.
- Thomsen, A.R., Plouffe, B., Cahill, T.J. 3rd, Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F.M., Sunahara, R.K., Skiniotis, G., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J. (2016). GPCR-G protein-beta-arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling. *Cell*, 166, 907-919.
- Tobin, A.B., Butcher, A.J., Kong, K.C. (2008). Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 413-420.
- Tsvetanova, N.G., Irannejad, R., von Zastrow, M. (2015). G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J Biol Chem*, 290, 6689-6696.
- Vilardaga, J.P., Jean-Alphonse, F.G., Gardella, T.J. (2014). Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol*, 10, 700-706.
- Violin, J.D., Lefkowitz, R.J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 416-422.

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F.Y., Liu, W., Xu, H.E., Cherezov, V., Roth, B.L., Stevens, R.C. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 340, 615-619.
- Walters, R.W., Shukla, A.K., Kovacs, J.J., Violin, J.D., DeWire, S.M., Lam, C.M., Chen, J.R., Muehlbauer, M.J., Whalen, E. J., Lefkowitz, R.J. (2009). beta-Arrestin 1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest*, 119, 1312-1321.
- Watson, C., Chen, G., Irving, P., Way, J., Chen, W.J., Kenakin, T. (2000). The use of stimulus-biased assay systems to detect agonist-specific receptor active states: implications for the trafficking of receptor stimulus by agonists. *Mol Pharmacol*, 58, 1230-1238.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10782-10787.
- Whalen, E.J., Foster, M.W., Matsumoto, A., Ozawa, K., Violin, J.D., Que, L.G., Nelson, C.D., Benhar, M., Keys, J.R., Rockman, H.A., Koch, W.J., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., Stamler, J.S. (2007). Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell*, 129, 511-522.
- Whalen, E.J., Rajagopal, S., Lefkowitz, R.J. (2011). Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*, 17, 126-139.
- Wyatt, D., Malik, R., Vesecy, A.C., Marchese, A. (2011). Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J Biol Chem*, 286, 3884-3893.
- Xiao, K., Shenoy, S.K., Nobles, K., Lefkowitz, R.J. (2004). Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J Biol Chem*, 279, 55744-55753.
- Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R. 3rd, Lefkowitz, R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 12011-12016.
- Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J.J., Shukla, A.K., Hara, M.R., Hernandez, M., Lachmann, A., Zhao, S., Lin, Y., Cheng, Y., Mizuno, K., Ma'ayan, A., Gygi, S.P., Lefkowitz, R.J. (2010). Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 15299-15304.
- Yan, D., Stocco, R., Sawyer, N., Nesheim, M.E., Abramovitz, M., Funk, C.D. (2011). Differential signaling of cysteinyl leukotrienes and a novel cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT(2)) agonist, N-methyl-leukotriene C(4), in calcium reporter and beta arrestin assays. *Mol Pharmacol*, 79, 270-278.
- Zidar, D.A., Violin, J.D., Whalen, E.J., Lefkowitz, R.J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 9649-9654.

Citation de l'article : Reiter, E. (2021). Mécanismes d'action et rôles multiples des β -arrestines dans la biologie des récepteurs couplés aux protéines G. *Biologie Aujourd'hui*, **215**, 107-118