

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory, bakalářské
Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Ladislav Merta

Využití GFP a jeho analogů pro studium receptorů spřažených s G proteiny
GFP and its analogs in studies of G protein-coupled receptors

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:
doc. RNDr. Petr Svoboda DrSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.5.2012

Podpis

Ladislav Merta

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Petru Svobodovi DrSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotnou pomoc během mého působení na Oddělení biochemie membránových receptorů Fyziologického ústavu AV ČR, kde byla tato bakalářská práce vypracována. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Pavlu Ostašovi, PhD, RNDr. Lence Roubalové, PhD a Bc. Kateřině Kašparovské za poskytnutí cenných rad a metodických zkušeností jakož i vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také svým rodičům za morální i materiální podporu během celého bakalářského studia.

Abstrakt

Bakalářská práce poskytuje několik základních informací o receptorech spřažených s trimerními G proteiny (GPCR) a zeleném fluorescenčním proteinu (GFP). Hlavní důraz je kladen na využití GFP a jeho variant v metodách fluorescenční spektroskopie, které jsou v současné době aplikovány na výzkum struktury a funkce GPCR jakožto klíčových signalizačních molekul v živých buňkách.

Klíčová slova: metody fluorescenční spektroskopie, GPCR, GFP, FRAP, FRET, BiFC

Abstract

This work provides some basic information about G protein-coupled receptors (GPCR) and green fluorescent protein (GFP). Main focus is oriented to fluorescence spectroscopy methods and usage of GFP and its variants in an up-to-date analysis of structure and function of GPCR, the key signaling molecules of living cells.

Key words: fluorescence spectroscopy methods, GPCR, GFP, FRAP, FRET, BiFC

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
2. Zelený fluorescenční protein (GFP)	9
2.1. Objev.....	9
2.2. Struktura.....	9
2.3. Spektrální vlastnosti.....	10
2.4. Maturace, vliv prostředí.....	11
2.5. Varianty a analogy GFP.....	12
3. Receptory spřažené s G proteiny	16
3.1. Úvod.....	16
3.2. Struktura.....	16
3.3. Klasifikace	17
3.4. Ligandy	18
3.5. Klasická cesta signalizace pomocí heterotrimerních G proteinů.....	19
3.6. Desenzitizace a internalizace receptorů	20
3.7. Kvartérní struktura receptorů spřažených s G proteiny	21
4. Metody využívající GFP pro výzkum GPCR	22
4.1. Fluorescence	22
4.2. Vizualizace proteinů	23
4.3. FRAP (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>).....	24
4.4. FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>).....	26
4.5. FLIM (<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>)	28
4.6. BiFC (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>)	29
4.7. Souhrnný přehled zmíněných metod a příklady jejich použití ve studiu GPCR	31
5. Závěr	32
6. Seznam použité literatury	33
7. Elektronické zdroje	39

Seznam použitých zkratek

7TM	Seven-TransMembrane (sedmkrát procházející membránou)
Å	Ångström (jednotka délky; 10^{-10} metru)
Arg	Arginin
BFP	Blue Fluorescent Protein (modrý fluorescenční protein)
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
cAMP	Cyklický 3',5'-adenozin monofosfát
CFP	Cyan Fluorescent Protein (modro-zelený fluorescenční protein)
DPH	Difenylhexatrien
DsRed	Červený fluorescenční protein rodu <i>Discosoma</i>
ECL	Extracellular Loop (extracelulární smyčka)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein („vylepšený“ zelený fluorescenční protein)
EL	Extracellular Loop (extracelulární smyčka)
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence (Förster) Resonance Energy Transfer
G protein	Proteiny vázající guaninový nukleotid
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GABA_BR	Receptor typu B pro kyselinu γ -aminomáselnou
GDP	Guanozin difosfát
GFP	Green Fluorescent Protein (zelený fluorescenční protein)
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
Gly	Glycin
GPCR	G Protein-coupled Receptor (receptor spřažený s G proteiny)
GRK	G protein-coupled Receptor Kinase (kináza receptorů spřažených s G proteiny)
GTP	Guanozin trifosfát
HEK	Human Embryonic Kidney cells
His	Histidin
ICL	Intracellular Loop (intracelulární smyčka)
IL	Intracellular Loop (intracelulární smyčka)

Phe	Fenylalanin
PKA	Proteinkináza A (závislá na cAMP)
PKC	Proteinkináza C (závislá na Ca ²⁺)
RGS	Regulator of G protein Signaling (regulátor signalizace pomocí G proteinu)
Ser	Serin
Thr	Threonin
TM	Transmembránový
TMA-DPH	Trimetylamonium-difenylhexatrien
TRH	Thyreoliberin
TRH-R	Receptor pro thyreoliberin (TRH)
Tyr	Tyrosin
YFP	Yellow Fluorescent Protein (žlutý fluorescenční protein)
β-AR	β-adrenergní receptor

1. Úvod

Doktor Osamu Shimomura si v 60. letech 20. století jistě nedokázal ani představit, jakou revoluci v přírodních vědách přinese vedlejší produkt izolace aequorinu z medúzy *Aequorea victoria*. Zelený fluorescenční protein (GFP) se stal mocným nástrojem výzkumu organismů, orgánů, tkání, buněk i jednotlivých molekul. Jeho hlavní předností je zaujetí správného prostorového uspořádání (konformace), které vykazuje zelenou fluorescenci, bez jakýchkoli jiných proteinů či kofaktorů (s výjimkou molekulárního kyslíku). Obrovský přínos pro vědu spočívá v tom, že zelený fluorescenční protein může být využíván při studiu živých systémů. Preparáty nemusejí být nadále fixovány a mohou být pořizovány záběry chování zkoumaných molekul v reálném čase.

GFP je možné pomocí genetických manipulací „přivést“ ke zkoumanému proteinu, a tak ho fluorescenčně vizualizovat. Pomocí pokročilých fluorescenčních metod je možné takto označený protein dále analyzovat. Toho se hojně využívá i při studiu membránových receptorů.

Největší skupinou membránových receptorů jsou receptory spřažené s G proteiny (GPCR). Vazba hormonu nebo nervového přenašeče na receptor navozuje v molekule receptoru konformační změnu, která se přenáší na příslušný G protein. Charakterizace těchto receptorů začala výzkumem beta-adrenergních receptorů (receptory pro katecholaminy adrenalin a noradrenalin; β -AR) s využitím radioaktivních vazebných studií za pomoci radioaktivně značených přirozených ligandů či jejich derivátů. Tyto studie byly nejprve prováděny s celými buňkami, později s různými preparáty buněčných membrán připravenými po homogenizaci (rozbití) buněk. Podrobné biochemické studie ukázaly, že receptory spřažené s G proteiny jsou lokalizovány v plazmatické membráně buňky.

Další fází výzkumu byla snaha o pozorování receptorů v buňkách s nepoškozenou plazmatickou membránou. Pro tyto účely byla zvolena imunofluorescenční metoda, která využívá fluorescenčně značené protilátky proti receptorům. Tento přístup specificky fluorescenčně vizualizoval zkoumané receptory, stále však bylo nutné buňky fixovat (a tudíž zabíjet). Později se díky objevu a intenzivnímu výzkumu GFP objevily konstrukty zkoumaných receptorů s tímto fluorescenčním proteinem, což umožnilo cennou a citlivou analýzu receptorů v živých buňkách.

Tato bakalářská práce si klade za cíl charakterizovat základní vlastnosti zeleného fluorescenčního proteinu a receptorů spřažených s G proteiny. Hlavní částí je pak základní charakterizace a vytvoření přehledu metod, které GFP využívají ke studiu těchto receptorů. Vytvořený přehled by měl demonstrovat dynamický rozvoj metod fluorescenční spektroskopie a jejich nezastupitelné místo v současném vědeckém výzkumu.

2. Zelený fluorescenční protein (GFP)

2.1. Objev

Zelený fluorescenční protein byl objeven v roce 1961 jako vedlejší produkt izolace aequorinu z medúzy *Aequorea victoria*. Aequorin, jehož fluorescence je podmíněna přítomností vápenatých iontů, emituje záření v modré části spektra. Toto záření je následně absorbováno molekulou GFP, která emituje záření v zelené části spektra, což je také barva, kterou vyzařuje medúza ve svém přirozeném prostředí (Shimomura, 2005; Tsien, 1998). Jméno „zelený fluorescenční protein“ dostal podle označení ve článku z roku 1969 (Hastings a Morin, 1969).

Zelený fluorescenční protein byl později objeven i u mnoha dalších láčkovců (např. *Obelia*, *Phialidium*, *Renilla*). Nejintenzivněji bylo zkoumáno GFP z organismu *Aequorea victoria*, druhým v pořadí je *Renilla reniformis* (Tsien, 1998). V této práci bude pod pojmem GFP označován zelený fluorescenční protein rodu *Aequorea*, nebude-li uvedeno jinak.

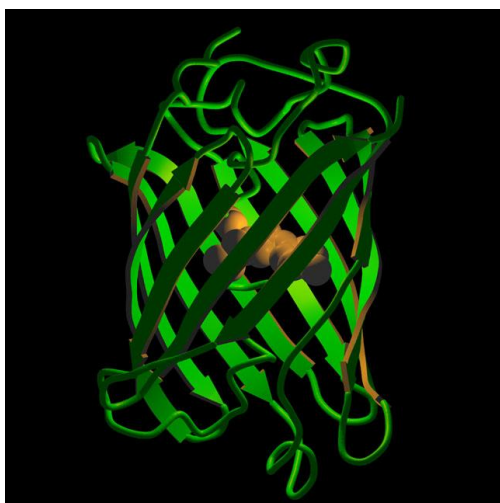
2.2. Struktura

V roce 1992 byla poprvé odhalena nukleotidová sekvence a primární struktura GFP čítající 238 aminokyselin, jejichž celková relativní molekulová hmotnost je 26 888 (Prasher a kol., 1992).

Hlavním strukturním znakem GFP je jeho tvar. Jedná se o β -barel složený z 11 antiparalelních β -listů (viz obr. 1 a obr. 2). Uvnitř barelu se nachází rovnoběžná α -šroubovice (α -helix), která nese fluorofor. Barel vytváří téměř dokonalý válec, který má 42 Å na výšku a 24 Å v průměru. Krátké šroubovice a smyčky mezi β -listy barelu vytváří jakási víka po obou stranách, a uzavírají tak fluorofor bezpečně uvnitř. Bohaté propojení peptidového řetězce vodíkovými vazbami zřejmě uděluje GFP neobvyklou odolnost vůči denaturaci a proteolýze. Jedinou nápadnou nepravidelností na barelu GFP je asi 135 Å³ velká dutina umístěná na jedné straně fluoroforu. Uvnitř této dutiny se nacházejí 4 molekuly vody, které pomocí vodíkových vazeb propojují aminokyselinové zbytky barelu (Ormö a kol., 1996).

Je nesmírnou výhodou, že tento protein zaujímá svou výslednou nativní konformaci (včetně zformování fluoroforu, viz dále) nezávisle na dalších proteinech. Tato vlastnost je však podmíněna přítomností téměř celé jeho aminokyselinové sekvence. Byly provedeny deleční studie, které zjišťovaly nejkratší aminokyselinovou sekvenci GFP, která je potřebná pro zachování jeho fluorescenčních vlastností. Prvním výsledkem bylo rozmezení

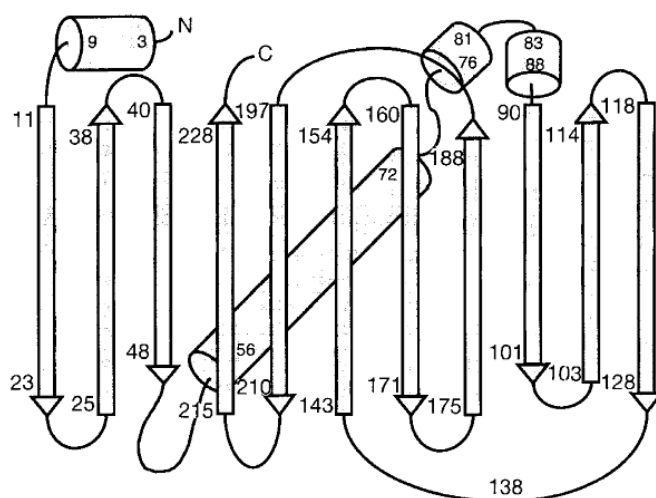
aminokyselin 2-232 (Dopf a Horiagon, 1996). Pozdějším preciznějším způsobem byla určena minimální sekvence na aminokyseliny 7-229 (Li a kol., 1997).



Obr. 1 | Terciární struktura GFP

Podle

<http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>



Obr. 2 | Schematické znázornění sekundárních struktur GFP

Upraveno podle Ormö a kol., 1996

2.3. Spektrální vlastnosti

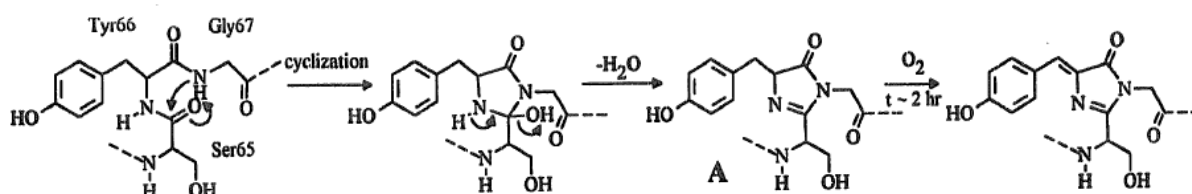
Zelený fluorescenční protein absorbuje v modré části barevného spektra. Vykazuje 2 absorpční maxima – první při 396 nm a druhé, které má menší amplitudu, při 476 nm. Emisní maxima jsou 508 nm (pro excitaci 396 nm) a 503 nm (pro excitaci 476 nm), což je zelená část spektra (Heim a kol., 1994).

Fluorofor (část molekuly zodpovědná za fluorescenci) se formuje autokatalyticky – nezávisle na dalších proteinech *Aequorea victoria*, což bylo dokázáno expresí GFP v *Escherichia coli* či *Caenorhabditis elegans* za pomoci metod genového inženýrství. I v těchto organismech vykazoval zelený fluorescenční protein stejné spektrální vlastnosti jako v původním organismu (Chalfie a kol., 1994).

Jediným kofaktorem potřebným pro zformování fluoroforu je molekulární kyslík (Heim a kol., 1994).

Fluorofor GFP je vytvářen post-translační cyklizací a oxidací jeho vlastních aminokyselinových zbytků. Jmenovitě je to tripeptid Ser-Tyr-Gly v pozici 65-67. Prvním krokem je rychlá cyklizace, která nastává mezi Ser65 a Gly67. Následuje pomalá (v řádech hodin) oxidace postranního řetězce Tyr66 molekulárním kyslíkem (Cubitt a kol., 1995; Phillips, 1997). Schéma těchto reakcí je uvedeno na obr. 3.

V okolí fluoroforu se nachází překvapivě množství molekul vody a polárních skupin aminokyselinových zbytků molekuly GFP. Nejdůležitějšími jsou Gln69, Arg96, His148, Thr203, Ser205 a Glu222 (Tsien, 1998).



Obr. 3 | Schéma vzniku fluoroforu GFP

V první fázi dochází k nukleofilnímu útoku karbonylové skupiny Ser65 aminoskupinou Gly67, což vede k cyklizaci mezi Ser65 a Gly67. Bezprostředně poté následuje dehydratace. Dalším krokem je oxidace postranního řetězce Tyr66 molekulárním kyslíkem. Jako „A“ je označen stav fluoroforu, který se vyskytuje u anaerobně kultivovaných organismů. Tato forma nevykazuje fluorescence.

Upraveno podle Cubitt a kol., 1995

2.4. Maturace, vliv prostředí

Primární struktura GFP obsahuje všechny potřebné informace pro správnou maturaci fluoroforu. Důkazem je pokus, při kterém byla aminokyselinová sekvence zeleného fluorescenčního proteinu připravena synteticky. Výsledný protein vykazoval stejné spektrální vlastnosti jako „divoký“ (*wild-type*) zelený fluorescenční protein (Nishiuchi a kol., 1998).

Při denaturaci GFP se ztrácí jeho fluorescence. Je jí však možné obnovit renaturací proteinu. Renaturovaný protein je spektrálně nerozlišitelný od nativního GFP. Zelený fluorescenční protein lze tedy reverzibilně denaturovat (Bokman a Ward, 1981).

Pro zformování fluoroforu je třeba prostorové přiblížení všech zúčastněných aminokyselinových skupin. Proto je jedním z kritických kroků správné vytvoření β -barelu (Zimmer, 2002).

Byla zkoumána i kinetika maturace zeleného fluorescenčního proteinu. Tento proces byl rozdělen na 3 samostatné fáze, jejichž jednotlivé dokončení podmiňuje začátek další fáze. Prvním krokem je relativně pomalé zaujetí správné konformace proteinu (asi 10 minut). Ve druhé fázi dochází k rychlé cyklizaci fluoroforu (asi 180 s). Ve třetí, nejpomalejší, fázi je fluorofor oxidován molekulárním kyslíkem, což trvá asi 76 minut (Reid a Flynn, 1997).

Maturace GFP je poměrně silně teplotně závislá. Pro zaujetí správné konformace je nejvhodnější pokojová teplota, případně teplota ještě o něco nižší. Kvůli této vlastnosti byly vyvinuty mutanty zeleného fluorescenčního proteinu, které jsou schopny zaujímat správnou konformaci i při 37 °C (viz dále), což je obvyklá teplota uvnitř savčích buněk a také optimální teplota pro kultivaci například *E. coli*. Je velice zajímavé, že tato termosensitivita se projevuje pouze během foldingu proteinu. Po zaujetí nativní konformace je již GFP poměrně termostabilní (a stále fluorescenční) i při teplotách kolem 65 °C (Tsien, 1998).

Fluorescence GFP je ovlivňována také změnami pH. Bylo dokázáno, že je stabilní v rozmezí hodnot 6-9. Při poklesu hodnoty pH pod 6 dochází ke zhasnutí fluorescence (Patterson a kol., 1997).

Občas poněkud přehlíženým tématem je dimerizace GFP. V některých pracích byl prosazován názor, že GFP by mohl být dimer vzhledem k jistým vhodným párovacím sekvencím na povrchu proteinu (Yang a kol., 1996). Nakonec se ukázalo, že tato schopnost dimerizace bude spíše záviset na podmínkách krystalizace GFP pro krystalografické strukturní studie, než že by to byla jeho charakteristická vlastnost. Naproti tomu GFP rodu *Renilla* je obligátním dimerem (Tsien, 1998).

2.5. Varianty a analogy GFP

Pro účely optimalizace a tvorby nových barevných variant GFP byly provedeny četné mutační studie.

Prvním druhem mutací jsou změny v maturačních vlastnostech. Příkladem tohoto druhu mutací je *cycle3* GFP, ve kterém jsou provedeny 3 aminokyselinové substituce. Jedná se o záměnu fenylalaninu v pozici 99 za serin, methioninu v pozici 154 za threonin a valinu v pozici 164 za alanin. Tato trojitá mutace vylepšila schopnost foldingu (vytvoření optimální konformace) při 37 °C, „pohyblivost“ proteinu uvnitř buněk a snížila agregaci GFP v inkluzních tělískách (a tím pádem jeho neaktivitu) (Cramer a kol., 1996; Tsien, 1998).

Druhou skupinou mutací jsou mutace ovlivňující spektrální vlastnosti zeleného fluorescenčního proteinu. Tyto mutace umožňují jak zvýšení intenzity fluorescence, tak i změny v excitačních a emisních spektrech.

Jedním z hlavních nedostatků „divokého“ GFP, který bylo třeba odstranit, byla přítomnost 2 excitačních maxim. To se podařilo díky mutaci serinu v pozici 65 za threonin (S65T). S65T mutace vykazovala pouze jedno excitační (490 nm) a emisní (510 nm) maximum. Navíc tato mutace zesílila fluorescenci asi šestkrát a zvýšila rychlost tvorby fluoroforu asi čtyřikrát (Heim a kol., 1995). Pokud byla zavedena ještě druhá mutace,

konkrétně záměna fenylalaninu v pozici 64 za leucin (F64L), bylo dosaženo dokonce třicetkrát silnější fluorescence oproti *wild-type* GFP (Cormack a kol., 1996). Tato varianta je označována jako „vylepšený“ zelený fluorescenční protein (EGFP; *enhanced*).

Již v roce 1994 byly při výzkumu formování fluoroforu GFP objeveny první barevné mutanty tohoto proteinu. V prvním případě se jednalo o náhradu tyrosinu v pozici 66 za histidin, což posunulo emisní spektrum do modré oblasti viditelného světla. Tato varianta se proto nazývá modrý fluorescenční protein (BFP; *blue*). Ve druhém případě byl tyrosin v pozici 66 nahrazen tryptofanem. Tato varianta byla později nazvána „cyan“ (modro-zelený) fluorescenční protein (CFP) (Heim a kol., 1994).

Další významnou variantou GFP je tzv. žlutý fluorescenční protein (YFP; *yellow*). Tato skupina má nejvýrazněji posunutá spektra směrem k červené části. Za tento posun je zodpovědná záměna threoninu v pozici 203 za aromatickou aminokyselinu, která je díky prostorovému uspořádání vnitřku proteinu velmi blízko fluoroforu, a může tak ovlivňovat hustoty π elektronů. Největší vliv na posun maxim fluorescenčních spekter měla záměna threoninu v pozici 203 za tyrosin (T203Y) (Wachter a kol., 1998).

Hlavní spektrální údaje o těchto skupinách jsou shrnuty v tabulce 1. Je však třeba zdůraznit, že jsou zde uvedeny pouze mutace zodpovědné za určitý charakteristický rys dané skupiny. Tyto proteiny jsou dále vylepšovány a optimalizovány pro nejrůznější účely.

Protein	Klíčová mutace	Excitační maximum (nm)	Emisní maximum (nm)	Emitovaná barva
BFP	Y66H	384	448	modrá
CFP	Y66W	436	485	modro-zelená
GFP	-	395-397 470-475	504	zelená
EGFP	S65T, F64L	488	507-509	zelená
YFP	T203Y	512	522	žlutá

Tabulka 1 | Stručný přehled skupin barevných variant zeleného fluorescenčního proteinu včetně jejich základních spektrálních charakteristik

Mutace jsou pro přehlednost uváděny jednopísmenovými zkratkami pro aminokyseliny.

Podle Tsien, 1998

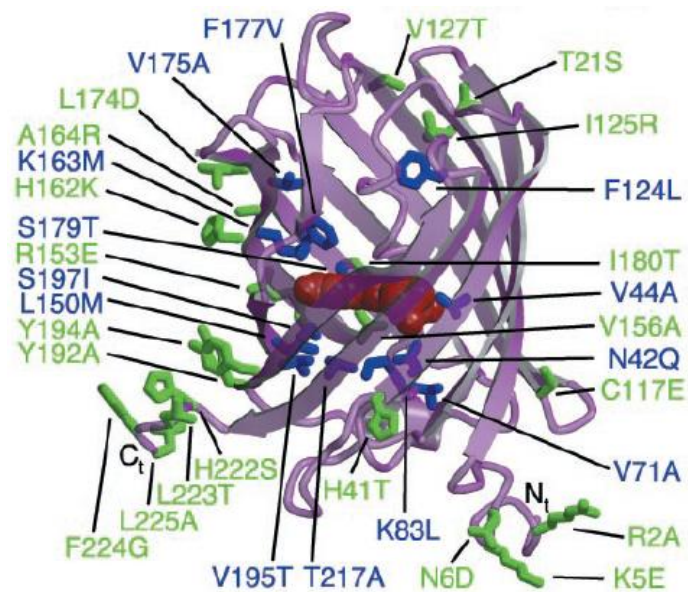
I přes četné experimenty mající za cíl posunout emisní spektrum zeleného fluorescenčního proteinu co nejvíce do červené části se nepodařilo dosáhnout většího posunu než do žluté oblasti. Naštěstí se některé výzkumné skupiny neupnuly pouze k GFP rodu

Aequorea, ale snažily se najít další podobné proteiny i v jiných organismech. Díky tomu byl v roce 1999 publikován článek, který přinesl první zmínky o červeném fluorescenčním proteinu izolovaném z mořských korálů rodu *Discosoma*, který má absorpční maximum 558 nm a emisní maximum 583 nm (Matz a kol., 1999). Tento protein, nyní označovaný DsRed, otevřel mnoho možností a stal se předmětem intenzivního studia.

DsRed vykazuje 22% sekvenční shodu s GFP rodu *Aequorea*. Tato relativně nepříliš vysoká shoda však zahrnuje zásadní prvky, které vytvářejí topologii, která je téměř totožná se strukturou GFP (viz obr. 4). Červený fluorescenční protein je také β -barelem tvořeným 11 β -listy, kterým uprostřed prochází α -šroubovice nesoucí intramolekulární fluorofor. Rovněž jsou konzervovány aminokyseliny tyrosin a glycin zodpovědné za tvorbu fluoroforu (v tomto proteinu v pozicích 67 a 68). Serin GFP v pozici 65 je zde nahrazen glutaminem v pozici 66. Fluorofor je tedy primárně tvořen ze sekvence Gln66-Tyr67-Gly68. Mechanismus zformování této struktury je v mnoha ohledech opět podobný GFP. Celý proces začíná cyklizací mezi Gln66 a Gly68 a rovněž následuje dehydrogenace (oxidace molekulárním kyslíkem) postranního řetězce Tyr67. U této reakce však formování fluoroforu DsRed nekončí. Dále je ještě provedena druhá oxidace, tentokrát postranní skupiny Gln66, což prodlouží konjugovaný systém π elektronů. Navíc je zřejmě ještě do tohoto procesu zapojena izomerace peptidové vazby mezi Gln66 a Phe65 z *trans* na *cis* uspořádání, které je v proteinových strukturách velmi vzácné (Wall a kol., 2000). Tato „prodloužená“ maturace je však velmi pomalá a trvá řádově dny. Při pokojové teplotě se nejprve objevuje zelená fluorescence (asi po 7 hodinách), která do dvou dní mizí a postupně ji stíhá finální červená fluorescence.

Charakteristickými vlastnostmi „divokého“ (*wild-type*) DsRed jsou vysoká odolnost vůči výkyvům pH a vysoký stupeň oligomerizace. Bylo dokázáno, že červený fluorescenční protein se přirozeně vyskytuje výhradně ve formě tetrameru (Baird a kol., 2000).

Během vývoje optimalizovaných forem červeného fluorescenčního proteinu bylo třeba se vypořádat se 2 hlavními nedostatky – velice pomalou maturací fluoroforu a tetramerizací proteinu. První překážka byla překonána v roce 2002, kdy se objevil článek o rychle maturujících variantách (nejrychlejší asi 45 minut) DsRed (Bevis a Glick, 2002). Ještě ten samý rok byl publikován článek řešící i druhý problém. Díky mutačním studiím byl připraven monomerní červený fluorescenční protein mRFP1, jehož maturační doba je kratší než 1 hodina. K dosažení tohoto výsledku bylo zapotřebí 33 mutací (Campbell a kol., 2002).



Obr. 4 | Struktura monomerního červeného fluorescenčního proteinu mRFP1

Na obrázku jsou pomocí jednopísmenových zkratk aminokyselin znázorněny všechny provedené mutace oproti původnímu DsRed.

Podle Campbell a kol., 2002

3. Receptory spřažené s G proteiny

3.1. Úvod

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR = G Protein-Coupled Receptor) tvoří ohromnou rodinu receptorů, která je kódována více než 800 geny. Tato rodina zahrnuje receptory pro nejrůznější ligandy (hormony, neuropřenašeče, chemokiny, vápenaté ionty, chuťové a čichové ligandy, fotony apod.). Regulují tedy velké množství fyziologických funkcí, a jsou tudíž potenciálním cílem mnoha léků. V literatuře se setkáváme nejen s označením GPCR, ale také „7TM receptory“ (receptory sedmkrát procházející membránou), což odráží jejich typickou strukturu (viz dále). Označení „7TM receptory“ možná vystihuje lépe celou skupinu, jelikož byly dokázány i signalizační dráhy těchto receptorů, které nezahrnují G proteiny. Označení GPCR je však již dost vžitě (Pierce a kol., 2002).

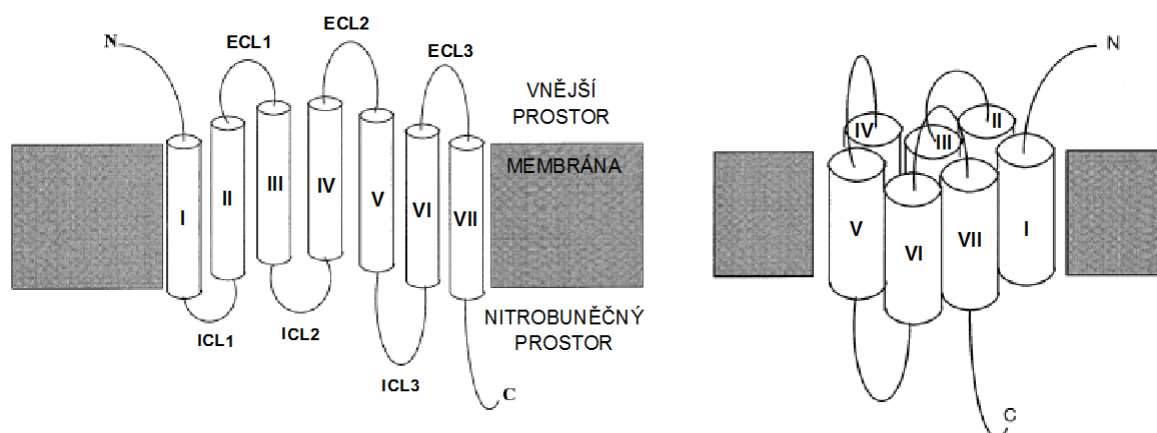
3.2. Struktura

Počátky výzkumu struktury receptorů spřažených s G proteiny jsou neodmyslitelně spjaty s intenzivním výzkumem světelného receptoru rhodopsinu, který dlouhou dobu sloužil jako modelový receptor spřažený s G proteiny. Prvním krokem k odhalení struktury bylo zjištění primární aminokyselinové sekvence receptoru a uspořádání polypeptidového řetězce v membráně. Již v 80. letech 20. století byl odhalen základní strukturní rys GPCR – 7 α -šroubovicových struktur procházejících membránou, které jsou spojeny třemi smyčkami na extracelulární a 3 smyčkami na intracelulární straně. N-konec proteinu je orientován vně buňky (extracelulárně) a C-konec je orientován dovnitř buňky (intracelulárně) (Ovchinnikov, 1982). Díky této struktuře se také někdy v literatuře setkáváme s označením „serpentinové“ („hadí“) receptory.

V současné době jsou jednotlivé strukturní části popisovány relativně zažitými zkratkami. Transmembránové α -šroubovice (α -helixy) jsou označovány zkratkou „TM“ a římským číslem I-VII (ve směru od N-konce k C-konci proteinu). Extracelulární smyčky jsou označovány zkratkou „EL“ či „ECL“ (*extracellular loop*) a příslušnou arabskou číslicí 1-3. Analogicky jsou intracelulární smyčky označovány zkratkou „IL“ či „ICL“ (*intracellular loop*) a číslicí 1-3 (Hanson a Stevens, 2009). Schéma struktury GPCR je uvedeno na obr. 5.

Vazebné místo pro ligand je obecně formováno z extracelulárních smyček, N-koncové části receptoru a extracelulárních konců TM šroubovic. Vazebné místo

pro příslušný G protein je obecně vytvářeno z intracelulárních smyček, C-koncové části receptoru a intracelulárních konců TM šroubovic (Nygaard a kol., 2009).



Obr. 5 | Zjednodušené schéma struktury obecného receptoru spřaženého s G proteiny
 Membrána je zobrazena šedě. V levé části obrázku je zobrazena struktura „nesbaleného“ proteinu, která odráží jeho topologii v membráně. V pravé části je schematicky znázorněn „sbalený“ stav receptoru. TM oblasti jsou pro přehlednost označovány pouze římskou číslicí. Upraveno podle Flower, 1999

3.3. Klasifikace

Nejčastějším systémem třídění receptorů spřažených s G proteiny je dělení na šest rodin (A až F). Rodina A je zdaleka největší skupinou zahrnující až 80% lidských GPCR. V savčím těle jsou nacházeny receptory rodin A, B, C a F, zatímco receptory rodiny D byly nalezeny pouze v těle hub a receptory rodiny E pouze v organismu *Dictyostelium* (Davies a kol., 2008). V tabulce 2 jsou uvedeny příklady členů jednotlivých rodin.

Rodina	Příklady receptorů dané rodiny
A	rhodopsin, adrenergní receptory, TRH-R, opioidní receptory
B	receptory pro kalcitonin, glukagon, sekretin
C	metabotropní glutamátové receptory, GABA _B receptory
D	receptory pro feromony
E	receptory cAMP
F	receptory „Frizzled/Smoothed“

Tabulka 2 | Příklady zástupců jednotlivých rodin receptorů spřažených s G proteiny dle klasifikačního systému A-F

Podle Davies a kol., 2008; databáze GPCRTree

Alternativní systém třídění receptorů spřažených s G proteiny se objevil v roce 2003, kdy byl publikován článek, který klasifikuje pouze lidské GPCR dle fylogenetické příbuznosti. Tento systém dostal jméno GRAFS podle jednopísmenných značek pro 5 hlavních rodin. GRAFS rodiny jsou: glutamátová (G), rhodopsinová (R), „adhesion“ (A), „frizzled/taste2“ (F) a sekretinová (S).

Oba klasifikační systémy se do značné míry shodují. Rhodopsinová rodina GRAFS odpovídá A rodině A-F systému, podobně sekretinová odpovídá B a glutamátová C rodině v A-F klasifikaci. Nově jsou vyčleněny rodiny „adhesion“ a „frizzled/taste2“. Systém GRAFS s důrazem na zaměření na výzkum lidských receptorů spřažených s G proteiny nezahrnuje receptory spřažené s G proteiny jiných živočišných druhů (Fredriksson a kol., 2003).

3.4. Ligandy

Pojmem ligand se rozumí molekula, která je schopná vazby na daný receptor. Vazba ligandu na vnější straně membrány vyvolává změny ve struktuře receptoru vedoucí k signalizaci dovnitř buňky. Zpočátku byly receptory spřažené s G proteiny přirovnávány k jednoduchému spínači, který má právě dvě krajní polohy – „vypnutý“ a „zapnutý“. Tento model zřejmě platí pro hojně zkoumaný receptor rhodopsin, ale u většiny GPCR to vypadá, že situace je o něco složitější. Existuje již mnoho studií, jejichž výsledky by tyto receptory připodobnily spíše k reostatu, který je schopen procházet různými mezistavy v rozpětí „zapnutý“ a „vypnutý“. Tuto představu podporuje i účinek různých ligandů na stejný receptor. Z tohoto pohledu rozeznáváme tzv. agonisty, částečné agonisty, inverzní agonisty a antagonisty. Při popisu účinku jednotlivých skupin je třeba také zmínit, že většina GPCR vykazuje jistou základní (bazální) aktivitu, která se projevuje možností aktivovat příslušný G protein bez vazby ligandu. Tato aktivita je zřejmě dána velikostí energetických bariér, které je nutné překonat při přechodu z jednoho stavu do druhého.

Pod pojmem agonista rozumíme takový ligand, který plně aktivuje daný receptor. Částečný agonista je látka, která i přes saturaci (tj. plné obsazení) receptorů dokáže aktivovat receptor jen zčásti. Inverzní agonista snižuje bazální aktivitu, tudíž receptor „vypíná“. Antagonista nemá žádný vliv na aktivitu receptoru, ale soutěží o vazbu k němu s ostatními látkami (Kobilka a Deupi, 2007).

3.5. Klasická cesta signalizace pomocí heterotrimerních G proteinů

Přestože jsou již prokázány i jiné mechanismy, jakými mohou GPCR signalizovat směrem do buňky, signalizace prostřednictvím heterotrimerních G proteinů zůstává stále hlavním způsobem.

Heterotrimerní G proteiny jsou tvořeny 3 podjednotkami – α , β a γ . Alfa podjednotka je zodpovědná za vazbu guaninového nukleotidu (GDP či GTP). Obě zbylé podjednotky společně vytvářejí pevný β/γ komplex. V lidském genomu existuje 35 různých genů pro podjednotky G proteinů (16 pro α podjednotky, 5 pro β podjednotky a 14 pro γ podjednotky) (Milligan a Kostenis, 2006).

G proteiny jsou klasifikovány dle svých α podjednotek (např. G_s heterotrimerní protein tedy obsahuje $G\alpha_s$ podjednotku). Rozeznáváme celkem 4 třídy G proteinů. G_s proteiny jsou spojeny se stimulací adenyl cyclázy (enzymu vytvářejícího cAMP), G_i proteiny naopak adenyl cyclázu inhibují, G_q proteiny jsou spjaty s aktivací fosfolipázy C β a G_{12} proteiny regulují MAPKinázovou dráhu. Množství efektorů jednotlivých tříd G proteinů je samozřejmě mnohonásobně vyšší. Jsou uvedeny pouze ty nejcharakterističtější.

Samotná signalizace probíhá následujícím způsobem. Vazba ligandu (agonisty) na receptor vyvolá změnu uspořádání jeho struktury (nejvýraznější je změna pozice TMVI), což umožní interakci s příslušným G proteinem. Tento protein připojený na membránu se nachází v neaktivní heterotrimerní konformaci s navázaným GDP na α podjednotce. Aktivovaný receptor dokáže α podjednotce (se kterou je nyní v kontaktu) zprostředkovat výměnu GDP za GTP, čímž je způsobena změna v uspořádání heterotrimeru, a ten tak disociuje na volnou α podjednotku a β/γ dimer. Jelikož jsou α a γ podjednotky ukotveny do membrány pomocí lipidických kotev, probíhá pohyb obou signalizačních jednotek (α podjednotka a β/γ dimer) v rovině plazmatické membrány (ve 2 rozměrech). Obě tyto jednotky „vyhledávají“ své efekторы (enzymy), které jsou typické tvorbou tzv. druhých posílů, které mají své úlohy v buněčné signalizaci. Ukončení signalizace prostřednictvím G proteinů je způsobeno rozštěpením GTP na α podjednotce (samotná tato podjednotka vykazuje GTPázovou aktivitu) na GDP a volný fosfát. V takovéto formě α podjednotka získá opět afinitu k β/γ dimeru, se kterým vytváří původní neaktivní heterotrimerní uspořádání. Rychlost znovuvytváření trimeru je ovlivňována nejenom vlastní GTPázovou aktivitou α podjednotky, ale také tzv. RGS (*Regulator of G protein Signaling*) proteiny, které urychlují štěpení GTP na GDP (Pierce a kol., 2002).

3.6. Desenzitizace a internalizace receptorů

Jelikož je buněčná signalizace velmi rychlou a současně složitou sítí interakcí mezi různými bílkovinami – receptory, G proteiny a efektory (adenylylcyklázy, fosfolipázy C, fosfolipázy A2, fosfodiesterázy, proteinkinázy, různé typy iontových kanálů atd.), je třeba danou signální kaskádu efektivně regulovat. Na tomto místě je třeba zdůraznit, jak silná je signalizace pomocí GPCR. Tento proces je totiž víceúrovňový a každá z těchto úrovní přináší jistý zesilovací efekt. Řekněme, že agonista aktivuje jednu molekulu receptoru spáženého s G proteiny. Tato jediná proteinová molekula však zvládne aktivovat více G proteinů, které před „vypnutím“ stihnou aktivovat ještě více molekul efektorů, které v aktivním stavu vytvářejí druhé posly. Buňka tudíž musí být schopná tento proces přiměřeně tlumit a upravovat, aby se jednalo opravdu o signalizaci a ne o permanentní řetězovou reakci na vazbu ligandu.

První úrovní tohoto „útlumu“ odpovědi na daný ligand je tzv. desenzitizace probíhající v řádu sekund či minut (Ostašov a kol., 2007; 2008). Jedná se o mechanismy, které fyzicky brání kontaktu aktivovaného receptoru s příslušným G proteinem (i přes trvající vazbu ligandu). První možností je fosforylace receptoru proteinkinázami A či C (PKA, PKC), což je příklad klasické zpětnovazebné regulace, jelikož tyto proteinkinázy jsou aktivovány právě pomocí GPCR. Tímto způsobem může být desenzitizován jak signalizující receptor, tak i receptor jiný, který je PKA či PKC rozeznáván. Druhým, více obecným, principem desenzitizace je fosforylace pomocí kináz GRK (*G protein-coupled Receptor Kinases*), které rozpoznávají specificky jen aktivovanou formu receptoru s navázaným ligandem. Tato fosforylace vytváří vazebné místo pro protein β -arrestin, který je fyzickou bariérou pro vazbu G proteinu na receptor.

Při dlouhodobějším působení ligandu nastává proces tzv. internalizace receptorů. Jedná se o „stažení“ receptorů z membrány do buňky. Receptory se pak nacházejí na povrchu nitrobuněčných membránových váčků. Jejich další osud může být dvojitý. Buď jsou defosforylovány proteinfosfatázami přítomnými ve váčcích a „vráceny“ na membránu, nebo jsou degradovány v lysozomech (Ransnäs a kol., 1989; Svoboda a kol., 1992; Svoboda a Milligan, 1994; Milligan a kol., 1994; Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998a; 1998b; 1999; Svoboda a Novotný, 2002; Svoboda a kol., 2004).

V neposlední řadě je možné odpověď na daný ligand tlumit snížením genové exprese daných receptorů. Bude-li na povrchu buňky méně receptorů, bude příslušná odpověď o to slabší. (Pierce a kol., 2002)

3.7. Kvartérní struktura receptorů spřažených s G proteiny

V současné době je velmi diskutovaným tématem kvartérní struktura receptorů spřažených s G proteiny. Objevují se totiž stále další a další studie, které uvádějí, že nejrůznější receptory spřažené s G proteiny mohou existovat ve formě dimerů (heterodimerů nebo homodimerů) či oligomerů. Tento fakt staví další pomyslné „patro“ do již tak velmi spletité sítě regulací a efektů GPCR.

Vliv dimerizace na funkci receptorů je dobře popsán např. v případě tyrosin kinázových receptorů. U tohoto typu bílkovin vyvolává vazba ligandu dimerizaci receptorů, čímž se aktivuje jejich nitrobenčková kinázová doména a dojde ke křížové fosforylaci („partner fosforyluje partnera“) obou protomerů na jejich tyrosinových zbytcích. Na tyto charakteristické fosforylace se následně váží další členové signalizační kaskády (Ferguson, 2008).

Receptory spřažené s G proteiny byly dlouho popisovány jako funkční monomery. Na základě tohoto faktu byl vytvořen i klasický model signalizace prostřednictvím GPCR (viz oddíl 3.5). S objevem možnosti dimerizace těchto receptorů je třeba zvážit vliv kvartérní struktury na řadu aspektů jejich signalizace. Jaký ligand váží heterodimerické receptory? Může toto uspořádání mít vliv na „výběr“ příslušného G proteinu? Má dimerizace vliv na pohyblivost receptorů? Zatím se zdá, že odpovědi na tyto a další otázky nebudou zobecnitelné na všechny GPCR a možná bude záviset i na konkrétním složení daného komplexu. Navíc jsou tyto problémy řešeny v experimentálních systémech, ve kterých je exprese zkoumaného receptoru (či zkoumaných receptorů) většinou zesílena. Otázkou pak zůstává, zda je zjištěná potencionální interakce fyziologická. Proto je třeba vše následně prověřovat za fyziologických podmínek (Lohse, 2010).

Jako příklad receptoru, který pro svou správnou funkci dimerizaci přímo vyžaduje, je $GABA_B$ receptor ($GABA_{BR}$). Tento receptor je heterodimerem sestávajícím ze dvou podtypů $GABA_{BR}$ – $GABA_{BR1}$ a $GABA_{BR2}$. Zatímco $GABA_{BR1}$ váže ligand (γ -aminomáselnou kyselinu), $GABA_{BR2}$ interaguje s příslušným G proteinem. Navíc interakce obou těchto podjednotek je potřebná pro lokalizaci dimerního receptoru $GABA_B$ na plazmatickou membránu (Kaupmann a kol., 1998).

Vzhledem k uvedeným faktům je tedy třeba při výzkumu GPCR počítat s možnými kvartérními strukturami těchto receptorů. Je tedy třeba ptát se, zda je dimerizace či oligomerizace receptorů spřažených s G proteiny nutná pro samotnou signalizaci. Tyto poznatky by mohly být v budoucnu užitečné obzvláště při hledání nových farmak.

4. Metody využívající GFP pro výzkum GPCR

Zelený fluorescenční protein se díky svým vlastnostem stal mocným nástrojem výzkumu proteinů v podmínkách *in vivo*. Zpočátku byl využíván hlavně ke značení proteinů a určení jejich lokalizace v buňkách, tkáních či celých organismech, později se však začal stále více uplatňovat i v dalších metodikách.

Příprava mnoha barevných variant zeleného fluorescenčního proteinu umožňuje detekci několika proteinů najednou. Díky tomu je možné sledovat kolokalizaci některých bílkovin či detekovat výskyt zkoumaného proteinu v určité části buňky.

K vizualizaci fluorescence či měření jejích vlastností vypovídajících o okolí fluoroforu jsou využívány nejrůznější zobrazovací techniky. Při některých aplikacích postačí klasický fluorescenční mikroskop, jindy je lepší použít mikroskop konfokální a v některých případech je nutné použít nákladné a vysoce sofistikované varianty těchto optických zařízení.

Uvedené metody jsou v předkládané bakalářské práci charakterizovány většinou ve své základní podobě. Samozřejmě existují i jejich různé obměny a přizpůsobení pro danou specifickou problematiku. Jednotlivé metody lze s výhodou také nejrůznějším způsobem kombinovat pro dosažení co nejprůkaznějších výsledků experimentu.

4.1. Fluorescence

Vzhledem k tomu, že všechny dále zmíněné metody jsou založeny na fluorescenci, je užitečné zmínit alespoň několik základních informací o tomto jevu jako takovém.

Fluorescence je v zásadě třífázový proces zahrnující excitaci, dobu, po kterou excitace trvá (*lifetime*) a fluorescenční emisi fotonu. Fluorofor je z nízkoenergetického základního stavu excitován (vybuzen) světlem (absorpcí fotonu) o dané vlnové délce do stavu energeticky bohatšího. V tomto stavu nějaký čas přetrvává a poté následuje návrat do původního základního energetického stavu provázený vyzářením (emisí) fotonu. Fluorofor však obvykle není excitován fotonem o jediné vlnové délce, ale fotony o určitém rozmezí vlnových délek (to platí i o jeho emisi fotonů). Díky tomu hovoříme o tzv. absorpčních a emisních spektrech, ve kterých rozeznáváme absorpční a emisní maxima (takové hodnoty vlnových délek, při kterých maximum fluoroforů přítomných ve vzorku absorbuje či emituje foton). Vyzářené fotony tvoří samotný fluorescenční signál.

Charakteristickým rysem fluorescence je tzv. Stokesův posun. Tento jev se projevuje tak, že fluorofor emituje záření o nižší energii (delší vlnové délce), než jakým byl excitován.

Proto je barva emitovaného záření GFP zelené barvy, i když je excitován v modré části spektra. Dalším charakteristickým rysem fluoroforu je doba trvání celého procesu (doba života, *lifetime*), tedy časový interval od excitace do vyššího energetického stavu až po návrat do základního energetického stavu za současného vyzáření fotonu. Pokud hovoříme o fluorescenci, pohybují se hodnoty doby života v řádech jednotek nanosekund.

V neposlední řadě je třeba uvést ještě tzv. „fotovybělení“ (*photobleaching*). Tento fenomén nastane při excitaci fluoroforu velmi silným zdrojem záření. V takovém případě může dojít k modifikaci či poškození fluoroforu a následnému poklesu intenzity fluorescence ve vzorku. Některé aplikace se „fotovybělení“ snaží vyhnout, jiné ho naopak s výhodou využívají pro výzkum (viz dále) (Daly a McGrath, 2003; Lakowicz, 1999).

4.2. Vizualizace proteinů

Ke značení proteinů pomocí GFP se využívají metody genového inženýrství. Ke známému genu zkoumaného proteinu je vnesena nukleotidová sekvence kódující zelený fluorescenční protein (či jeho variantu) tak, aby se oba proteiny nacházely ve stejném čtecím rámci. Tímto způsobem jsou vytvářeny tzv. fúzní proteiny. Při značení bílkovin je však třeba dbát i na jiné okolnosti, než je správný čtecí rámec. Fúzní protein se musí připravit tak, aby přítomnost fluorescenční značky nijak neinterferovala s funkcí „nemanipulovaného“ proteinu, a byla tudíž opravdu pouze značkou (Daly a McGrath, 2003). Často se proto mezi cílový protein a GFP vkládá nukleotidová sekvence, tzv. linker (asi 10 aminokyselin), který odděluje oba „partnery“ a umožňuje zaujetí jejich funkční konformace (vzájemně si prostorově nebrání ve správném foldingu). Délka tohoto úseku může mít také vliv na stabilitu fúzního proteinu (Prescott a kol., 1999).

Proteiny lze obecně značit zeleným fluorescenčním proteinem na jejich C- i N-konci. GFP lze dokonce při precizní práci vložit i dovnitř proteinu, aniž by interferoval s jeho funkcí (Siegel a Isacoff, 1997).

Pro značení receptorů spřažených s G proteiny se využívá převážně fúze s GFP na jejich C-konci. Vazba na N-konec by mohla výrazně interferovat s vazbou ligandů (hlavně v případě vysokomolekulárních) (Milligan, 1999). V literatuře se však již můžeme setkat i s mnoha úspěšnými fúzemi na N-konci receptoru. Toto uspořádání ale může být v některých případech problematictější také vzhledem k rozrušení signální sekvence adresující receptor na plazmatickou membránu (tento problém se však nevyskytuje plošně). Vnesením nepřírodní silné adresovací sekvence je možno tento případný problém překonat (Sarramegna a kol., 2002; McDonald a kol., 2007).

Vizualizace pomocí GFP se v kontextu GPCR obecně využívá ke sledování pohybu receptorů v buňce (organizace v membráně či internalizace do cytoplasmy). Také je možno prostřednictvím GFP označit a zkoumat G proteiny, β -arrestin a další molekuly (Milligan, 1999).

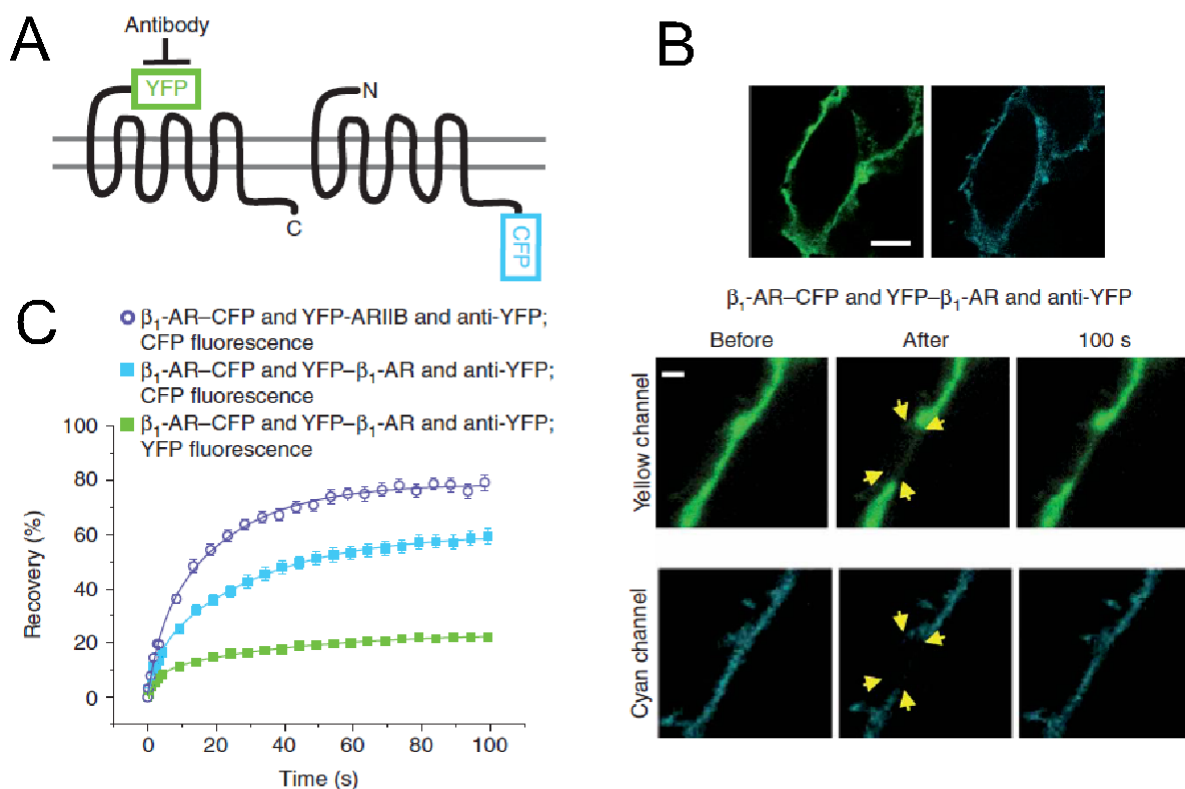
4.3. FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)

Význam anglické zkratky FRAP bychom do češtiny mohli přeložit jako „obnova fluorescence po fotovybělení“. Jedná se o metodu, která zkoumá především kinetiku fluorescenčně značených proteinů.

Metoda je založena na ozáření malé definované oblasti buňky obsahující fluorescenčně značené proteiny pomocí silného laserového paprsku, který způsobí nevratné „fotovybělení“ (poškození fluoroforu vede ke ztrátě schopnosti fluoreskovat). Následně je sledována difúze fluorescenčně značených proteinů z okolí do „vyběleného“ místa, což zde způsobí obnovení fluorescence v případě, že pohyb daných proteinů není ničím omezován. Pouze částečné nebo vůbec žádné obnovení fluorescence indikuje sníženou nebo nulovou pohyblivost proteinů v daném místě. Příčinou mohou být interakce s velkými komplexy, lokalizace v membránových mikrodoménách („raftech“), ukotvení proteinu k cytoskeletu či extracelulární matrix apod. Ukázka aplikace této metody společně s typickými křivkami je uvedena na obrázku 6.

Z analýzy pomocí metody FRAP lze získat dva kinetické parametry pro daný protein – mobilní frakci (M_f) a difúzní konstantu (D). Veličina M_f podává informaci o množství značených proteinů (z celkového počtu), které mohou difundovat do „vyběleného“ místa. Je-li tato hodnota menší než 100%, část proteinů je nějakým způsobem znehybněna či vázána. Veličina D popisuje schopnost určitého proteinu pohybovat se v daném prostředí. Tato hodnota v sobě zahrnuje mj. i velikost (poloměr) zkoumaného proteinu v prostředí o dané hustotě a za charakteristických podmínek (teplota atd.) (Lippincott-Schwartz a kol., 2001).

Při výzkumu receptorů spřažených s G proteiny se metoda FRAP využívá nejen ke stanovení kinetiky receptorů, ale také je možné ji využít k výzkumu dimerizace a oligomerizace receptorů. V tomto případě se jedná o modifikovanou verzi (tzv. „dvojbarevný FRAP“), kdy jsou receptory značeny fluorescenčními sondami o různých barvách. Díky tomuto přístupu byla odhalena velmi slabá tendence β_1 -adrenergních receptorů vytvářet kvartérní struktury. Naproti tomu β_2 -adrenergní receptory vytvářejí dle autorů článku relativně velké stabilní oligomery (Dorsch a kol., 2009).



Obr. 6 | Ukázka průběhu pokusu využívajícího metodu FRAP

Pokus využívá β_1 -adrenergní receptory značené fluorescenčně pomocí CFP na C-konci receptoru nebo pomocí YFP na N-konci receptoru, které jsou exprimovány v buňkách HEK293T. Proti žlutému fluorescenčnímu proteinu (YFP) se dá použít protilátka, která specificky znehybňuje celý konstrukt (A). V části B jsou nahoře pomocí konfokálního mikroskopu zobrazeny celé buňky ve žlutém i modro-zeleném detekčním kanálu. Ve spodní části je již samotný FRAP. Vlevo se nachází membrána před (*before*) ozářením laserem, uprostřed je snímek těsně po ozáření (*after*) a vpravo po 100 sekundách od „vybělovacího“ pulzu. Na první pohled je patrné, že zatímco rychlost difúze receptorů značených CFP je relativně vysoká, stejné receptory značené pomocí YFP jsou díky přítomnosti protilátky proti YFP značně znehybněny. V části C je grafické znázornění celého procesu. Postupně narůstající křivka obnovení (*recovery*) fluorescence ve vyběleném místě odráží rychlost difúze značených molekul v čase a také jejich mobilní frakci. Kontrolní (fialová) křivka vykazuje asi 80% obnovu. Dle očekávání je naměřený FRAP nejnižší u molekul imobilizovaných pomocí protilátky (YFP- β_1 -AR).

Upraveno podle Dorsch a kol., 2009

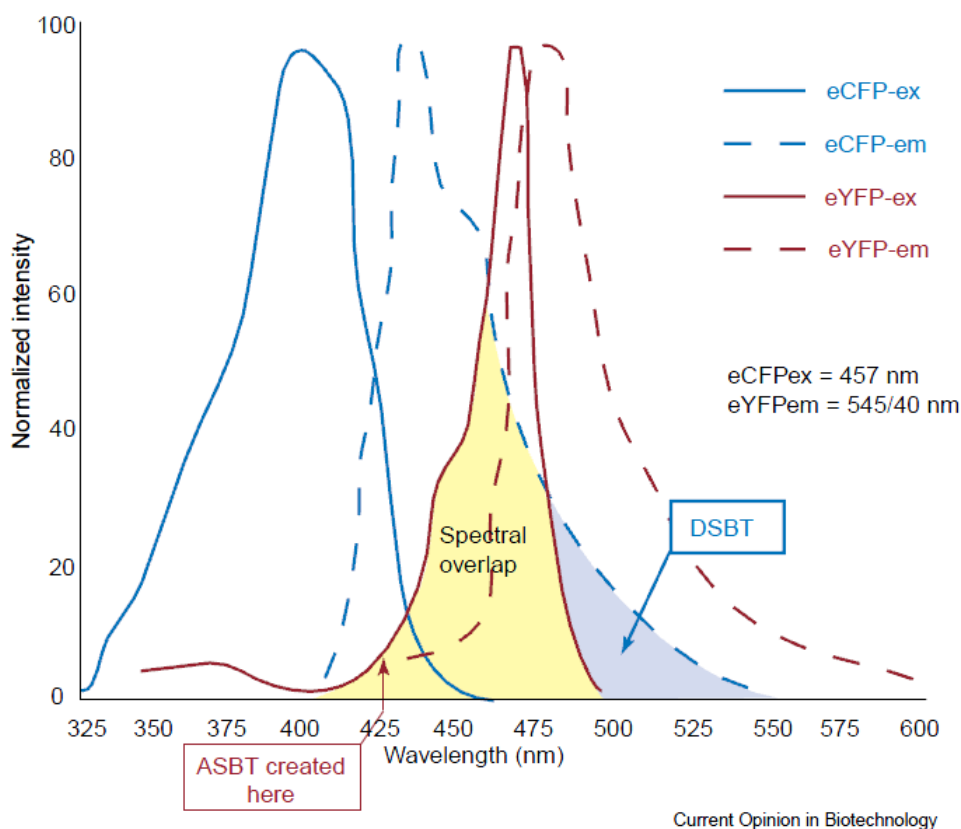
4.4. FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

Anglická zkratka FRET přibližně česky znamená „fluorescenční rezonanční energetický přesun“. V literatuře se můžeme setkat také s plným anglickým názvem „*Förster Resonance Energy Transfer*“, který odkazuje na objevitele principu tohoto jevu.

Metoda FRET ve své nezákladnější podobě podává informace o blízkosti zkoumaných proteinů v řádech nanometrů (FRET nastává při vzdálenosti nejvíce 10 nm). Fluorescenční rezonanční energetický přesun probíhá mezi 2 fluorofory (donorem a akceptorem), které splňují jistá kritéria. Zaprvé, excitační spektra obou fluoroforů musí být dostatečně oddělena (nepřekrývat se). Zadruhé, emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru. Zatřetí, emisní spektra obou fluoroforů by se neměla překrývat. Z těchto podmínek již lze vyvodit základní princip techniky FRET. Donor je selektivně excitován paprskem o jisté vlnové délce, která však (v ideálním případě) neexcituje akceptor. Dojde-li k dostatečnému přiblížení (1-10 nm) ve vhodné orientaci obou partnerů, donor neemituje detekovatelné záření, ale předá nezářivě tuto energii (díky již zmíněnému překryvu spekter) akceptoru, který je tak excitován. Ve finále tedy pozorujeme emisi záření o vlnové délce charakteristické pro akceptor. Pokud k transferu energie mezi fluorescenčními partnery nedojde, pozorujeme pouze emisi charakteristickou pro donor. V praxi se však neseťkáváme s dokonalým přenosem energie mezi donorem a akceptorem. Nastane-li FRET, pozorujeme spíše snížení emise záření donoru a zvýšení emise záření akceptoru.

Veličina, která je z naměřených dat stanovována, se nazývá „účinnost energetického transferu“ (*energy transfer efficiency*; E%). Z této hodnoty je pak možné dopočítat vzdálenost interagujících proteinů. Účinnost energetického transferu je nepřímo úměrná šesté mocnině této vzdálenosti, což vysvětluje, proč FRET nastává pouze při těsné blízkosti zkoumaných molekul (maximální možná vzdálenost je 10 nm).

Zkoumané proteiny je pro analýzu třeba označit vhodně zvoleným párem fluoroforů. Právě výběr fluoroforů je kritickým krokem této metody. Všechny 3 požadavky uvedené výše však nelze obvykle splnit dokonale. Je třeba zvolit nejlepší kompromis a samozřejmě provést jisté korekce výsledků. Většinou je hlavním problémem tzv. „*bleed-through*“ („prosakování“). Tento fenomén nastává, pokud se nějakou částí překrývají excitační nebo emisní spektra obou fluoroforů. Excitace donoru tak může vyvolat i neselektivní excitaci akceptoru (aniž by FRET opravdu nastal) a analogicky emise donoru může zkreslovat proběhnuvší (či simulovat neproběhnuvší) FRET. Grafické znázornění všech zmíněných efektů je na obr. 7 (Wallrabe a Periasamy, 2005).



Obr. 7 | Znázornění fluorescenčních spekter eCFP a eYFP využívaných metodou FRET

Na obrázku jsou znázorněna excitační (ex; souvislé čáry) a emisní (em; přerušované čáry) spektra fluorescenčního páru využívaného metodou FRET. Jako donor zde vystupuje eCFP a jako akceptor eYFP. Žlutě zvýrazněný spektrální překryv umožňuje FRET. Oblasti DSBT („donor spectral bleed-through“) a ASBT („acceptor spectral bleed-through“) jsou zodpovědné za zkreslení analýzy. Těmto nežádoucím jevům se většinou nedá úplně vyhnout, a je tedy třeba provést určité korekce výsledků.

Podle Wallrabe a Periasamy, 2005

Metoda FRET v živých buňkách využívá často páry založené na GFP a jeho variantách. Nejčastěji používanou dvojicí je v tomto případě modro-zelený (*cyan*) fluorescenční protein (CFP) jako donor a žlutý (*yellow*) fluorescenční protein (YFP) jako akceptor. Fluorescence těchto bílkovin je obvykle ještě zesílena pomocí dalších mutací, takže hovoříme o „vylepšených“ (*enhanced*) formách (eCFP, eYFP). Vzhledem k nutnosti excitace v UV části spektra a poměrně velkému překryvu emisních spekter těchto partnerů (viz obr. 7) jsou neustále vyvíjeny snahy o použití vhodnějších dvojic. Poměrně slibným kandidátem v této oblasti je dvojice GFP/DsRed či CFP/DsRed (Liu a kol., 2011).

Pomocí měření metodou FRET lze zkoumat např. i konformační změny receptoru způsobené vazbou agonisty. Německý tým takto demonstroval relativní změnu pozice TMIII ku TMVI, která se zdá být pro přechod receptoru do aktivované formy zásadní. Pro výzkum využili zástupce receptorů spřažených s G proteiny rodin A (α_{2A} -adrenergní receptor) a B (receptor pro parathyroidní hormon) Jelikož se pohyb TMVI přenáší na třetí intracelulární smyčku receptoru, označili tuto oblast pomocí CFP. Zároveň však také označili C-konec receptoru pomocí YFP. Pomocí několika kontrol prokázali, že FRET pozorovaný v nepřítomnosti agonisty nastává opravdu v rámci jedné molekuly. Při inkubaci s příslušnými ligandy došlo k významnému poklesu emise YFP (akceptor) za současného zvýšení emise CFP (donor). Tímto způsobem tedy mohli registrovat intramolekulární změny konformace příslušných GPCR (Vilardaga a kol., 2003).

Dále se tímto způsobem dá zkoumat interakce GPCR s β -arrestinem po aktivaci receptoru (Vilardaga a kol., 2003), aktivace (disociace) heterotrimerních G proteinů (Janetopoulos a kol., 2001) či dimerizace / oligomerizace receptorů spřažených s G proteiny (Herrick-Davis a kol., 2004).

Modifikovanou formou této metody je tzv. BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), která jako donor využívá enzym, který (většinou v přítomnosti kyslíku) přeměňuje svůj daný substrát na produkt a během této reakce je vyzářeno světlo o charakteristické vlnové délce (= bioluminescence). Fluorescenčním akceptorem pak může být např. GFP či jeho varianta s vyhovujícími spektrálními vlastnostmi. Výhodou tohoto uspořádání je, že zkoumané buňky není třeba ozařovat externím excitačním zdrojem (většinou laserem), protože emise donoru probíhá na základě enzymatické reakce (Herrick-Davis a kol., 2004).

4.5. FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*)

Fluorofor je mj. charakterizován i tzv. „fluorescenční dobou života“ (*fluorescence lifetime*, τ). Tato veličina je definována jako průměrný čas, po který molekula setrvává v excitovaném stavu, než se vrátí na základní energetickou hladinu. V praxi je fluorescenční doba života definována jako čas uběhlý od excitace fluoroforu, ve kterém intenzita fluorescence poklesne na 37% původní hodnoty. Tento postupný úpadek emise je vlastností jednotlivých fluoroforů, a tudíž je tato veličina nezávislá na koncentraci fluorescenční sondy či intenzitě excitace. Naopak odráží změny v okolí sondy (např. změny pH či koncentrace iontů). Významný vliv na fluorescenční dobu života má také FRET. Mikroskopická technika FLIM je schopna měřit fluorescenční doby života fluoroforů, které se pohybují obvykle

v řádech nanosekund. Její obrovský význam spočívá v kombinaci s technikou FRET (tzv. FRET-FLIM metoda).

Metoda FRET-FLIM poskytuje vysoké prostorové (nanometry) a časové (nanosekundy) rozlišení. Využívá vlivu fenoménu FRET na *lifetime* fluoroforů. Pokud přenos energie mezi donorem a akceptorem proběhne, je snížena fluorescenční doba života donoru, která je metodou FRET-FLIM měřena. Tímto přístupem je také elegantně vyřešen překryv spekter fluoroforů, který je častým problémem při měření FRET (založeném na intenzitě fluorescence), a odstraňuje tak potřebu korekcí na tento fenomén. Další nespornou výhodou je možnost rozlišit mezi donory, které se průběhu FRET účastní a těmi, které se neúčastní. Zatímco při „běžném“ měření FRET jsou do výpočtu účinnosti energetického transferu (E%) započítávány všechny donory, metoda FRET-FLIM zvládne rozlišit pouze donory účastnící se energetického přenosu (objeví se 2 populace donorů s různými fluorescenčními dobami života). Z přesnější hodnoty E% je pak možno vypočítat i přesnější vzdálenost obou interagujících partnerů.

Poměrně významnou nevýhodou metody FLIM je však potřeba velmi drahých sofistikovaných přístrojů, které se nevyskytují zdaleka na všech pracovištích. FRET založený na měření intenzity fluorescence se dá naopak provádět pomocí konfokálního i fluorescenčního mikroskopu, který je na většině pracovišť již standardem (Wallrabe a Periasamy, 2005; Elangovan a kol., 2002).

4.6. BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)

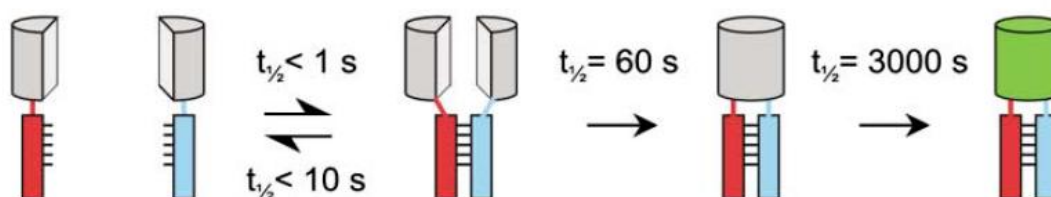
Metoda BiFC patří do širšího okruhu technik, které se nazývají „proteinové komplementační metody“. Principem všech těchto přístupů je rozdělení reporterového proteinu (enzym, fluorescenční protein apod.) na dvě vhodné části, které jsou samy o sobě nefunkční. Tyto části jsou pak pomocí genetického inženýrství fúzně připojeny na zkoumané proteiny. Pokud dojde k interakci či velmi blízkému přiblížení těchto bílkovin, obnoví se funkce reporterového proteinu (Vidi a kol., 2011).

Metoda BiFC využívá nejčastěji GFP a jeho analogy (nejčastěji žlutý fluorescenční protein, YFP). Bylo dokázáno, že je možné tuto bílkovinu rozdělit na dvě části, které, když se dostanou do těsného kontaktu, jsou schopné obnovit vlastnosti celistvého fluorescenčního proteinu.

Celý proces probíhá ve 2 hlavních fázích. V první fázi dochází k interakci proteinů značených pomocí nefluorescenčních fragmentů. Tyto interakce jsou vratné ovšem jen do chvíle, kdy nastane druhá fáze. Ve druhé fázi spolu asociují připojené fragmenty,

a stabilizují tak vzniklý komplex. Následuje zformování funkčního fluoroforu, po kterém je možno pozorovat fluorescenci, která vychází z míst interakce označených proteinů. Tyto děje jsou společně se svými poločasy schematicky znázorněny na obr. 8.

Většina signálních proteinů v buňce může interagovat s více partnery. Metoda BiFC umožňuje sledovat pouze frakci zkoumaných molekul, vzhledem k tomu, že až do komplementace fluorescenčního proteinu, jsou tyto molekuly pod mikroskopem neviditelné. Ze stejného důvodu není potřeba korigovat výsledky na nespecifické fluorescence jako např. v případě metody FRET. Nezvratná komplementace fluorescence (a tudíž „připoutání“ značených interagujících molekul) v sobě ukrývá jak výhody, tak nevýhody techniky BiFC. Pozitivem je možnost zkoumat slabé a přechodné interakce jejich „fixací“ v živých buňkách či rychle vyhledávat zatím neznámé partnery. Významnou nevýhodou je nemožnost zkoumat dynamické změny ve vzájemných interakcích molekul. Na závěr je třeba ještě poznamenat, že tato metoda není náročná na mikroskopické vybavení (stačí „obyčejný“ fluorescenční mikroskop) (Hu a kol., 2002).



Obr. 8 | Schematické znázornění tvorby bimolekulárního fluorescenčního komplexu včetně naměřených poločasů jednotlivých dějů

Podle Hu a kol., 2002

Tato metoda je hojně využívána ke studiu dimerizace / oligomerizace receptorů sprážených s G proteiny (Vidi a kol., 2008). Dalším velmi výhodným použitím je výzkum β a γ podjednotek G proteinů. Jelikož tyto podjednotky vytvářejí *in vivo* dimer, je možné pomocí metody BiFC označit jen jejich určité typy a sledovat, zda a za jakých podmínek spolu interagují, případně je v buňce vizualizovat. Tento přístup je vhodnější než značení každé podjednotky zvlášť „celistvým“ fluorescenčním proteinem. Ukázalo se totiž, že při tomto provedení nejsou podjednotky schopné signalizace (Hynes a kol., 2004). Velmi zajímavým uplatněním metody BiFC je plošný výzkum účinku různých léčiv (ligandů) na buněčné děje, což je umožněno přípravou mnoha různých BiFC reakcí. Tímto přístupem je možné odhalit i nepředvídatelné vedlejší účinky zkoumaných medikamentů (MacDonald a kol., 2006).

4.7. Souhrnný přehled zmíněných metod a příklady jejich použití ve studiu GPCR

Metoda	Oblast výzkumu receptorů spřažených s G proteiny	Příklad publikace
Vizualizace proteinů	vizualizace receptorů	McDonald a kol., 2007
	distribuce a internalizace receptorů	Drmotá a kol., 1998
	vizualizace G proteinů	Galbiati a kol., 1999
	vizualizace β -arrestinu	Groarke a kol., 1999
FRAP	kinetika receptorů	Young a kol., 2001
	dimerizace / oligomerizace receptorů	Dorsch a kol., 2009
FRET	vazba ligandu na receptor	Castro a kol., 2005
	změna konformace receptoru způsobená vazbou ligandu	Villardaga a kol., 2003
	interakce receptoru s G proteiny	Hein a kol., 2005
	aktivace heterotrimerních G proteinů	Janetopoulos a kol., 2001
	interakce receptoru s β -arrestinem následující po aktivaci receptoru	Villardaga a kol., 2003
	dimerizace / oligomerizace receptorů	Herrick-Davis a kol., 2004
BiFC	dimerizace / oligomerizace receptorů	Vidi a kol., 2008
	asociace a lokalizace specifických podjednotek G proteinů	Hynes a kol., 2004
	plošný výzkum účinku různých ligandů na buněčné děje	MacDonald a kol., 2006

Tabulka 3 | Souhrnný přehled metod fluorescenční spektroskopie využívajících GFP s příklady konkrétních oblastí výzkumu GPCR včetně odkazů na příslušnou literaturu
 Tabulka si neklade nárok na úplnost. Jde spíše o demonstraci širokého využití zmíněných metod při výzkumu receptorů spřažených s G proteiny.

5. Závěr

Metody fluorescenční spektroskopie založené na využití hybridních molekul mezi GPCR a bílkovinami s přirozenou fluorescencí (GFP a jeho analogy) mají v současnosti zásadní význam při studiu receptorů spřažených s G proteiny a signálních kaskád, které na ně navazují. Hlavní význam těchto metod spočívá v možnosti provádět neinvazivní stanovení distribuce a funkčního stavu GPCR v živých buňkách. Výsledky získané při studiu živých buněk mohou být následně ověřeny analýzou izolovaných buněčných membrán. Díky vývoji nových a vylepšování stávajících technik jsou získávány stále podrobnější informace o struktuře a funkci zkoumaných receptorů. Právě takové informace přinášejí moderní metody FLIM, FRAP, FRET a BiFC, jejichž podstata byla v této bakalářské práci podrobně vysvětlena.

Předmětem navazujícího studia v rámci mé diplomové práce bude analýza strukturní a funkční organizace GPCR v plazmatické membráně buňky a studium membránových domén, specifických částí (okrsků) buněčné membrány, které koncentrují signální molekuly a obsahují vysoké množství cholesterolu. Pro tento účel budou použity jednak výše uvedené hybridní molekuly (fúzní bílkoviny) mezi GPCR a GFP respektive jeho analogy, dále pak membránové fluorescenční sondy jako je difenylhexatrien (DPH), trimetylamonium-difenylhexatrien (TMA-DPH), Laurdan nebo Perylen (Brejchová a kol., 2011). Tyto látky charakterizují hydrofobní zónu buněčné membrány nebo polární interfázi membrána-voda. Stanovení fluorescence bude prováděno jak ve standardním spektrofluorometru, tak s pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie.

6. Seznam použité literatury

- Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:11984-11989
- Bevis, B. J., Glick, B. S. (2002) Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology*. 20:83-87
- Bokman, S. H., Ward, W. W. (1981) Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 101:1372-1380
- Brejchová, J., Sýkora, J., Dlouhá, K., Roubalová, L., Ostašov, P., Vošahlíková, M., Hof, M., Svoboda, P. (2011) Fluorescence spectroscopy studies of HEK293 cells expressing DOR-G_i1 α fusion protein; the effect of cholesterol depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1808:2819-2829
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:7877-7882
- Castro, M., Nikolaev, V. O., Palm, D., Lohse, M. J., Vilardaga, J.-P. (2005) Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:16084-16089
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173:33-38
- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., Stemmer, W. P. C. (1996) Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling. *Nature Biotechnology*. 14:315-319
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., Tsien, R. Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 20:448-455
- Daly, C. J., McGrath, J. C. (2003) Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 100:101-118
- Davies, M. N., Secker, A., Halling-Brown, M., Moss, D. S., Freitas, A. A., Timmis, J., Clark, E., Flower, D. R. (2008) GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Research Notes*. 1:67
- Dopf, J., Horiagon, T. M. (1996) Deletion mapping of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*. 173:39-44
- Dorsch, S., Klotz, K.-N., Engelhardt, S., Lohse, M. J., Bünemann, M. (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nature Methods*. 6:225-230

- Drmota, T., Gould, G. W., Milligan, G. (1998a) Real Time Visualization of Agonist-mediated Redistribution and Internalization of a Green Fluorescent Protein-tagged Form of the Thyrotropin-releasing Hormone Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:24000-24008
- Drmota, T., Novotný, J., Kim, G.-D., Eidne, K. A., Milligan, G., Svoboda, P. (1998b) Agonist-induced Internalization of the G Protein $G_{11\alpha}$ and Thyrotropin-releasing Hormone Receptors Proceed on Different Time Scales. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:21699-21707
- Drmota, T., Novotný, J., Gould, G. W., Svoboda, P., Milligan, G. (1999) Visualization of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone receptor-1 and $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ induced by agonist stimulation. *The Biochemical Journal*. 340:529-538
- Elangovan, M., Day, R. N., Periasamy, A. (2002) Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *Journal of Microscopy*. 205:3-14
- Ferguson, K. M. (2008) A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annual Review of Biophysics*. 37:353-373
- Flower, D. R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. 1422:207-234
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., Schiöth, H. B. (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*. 63:1256-1272
- Galbiati, F., Volonté, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D. M., Lisanti, M. P., Parenti, M. (1999) The Dually Acylated NH_2 -terminal Domain of $G_{11\alpha}$ Is Sufficient to Target a Green Fluorescent Protein Reporter to Caveolin-enriched Plasma Membrane Domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:5843-5850
- Groarke, D. A., Wilson, S., Krasel, C., Milligan, G. (1999) Visualization of Agonist-induced Association and Trafficking of Green Fluorescent Protein-tagged Forms of Both β -Arrestin-1 and the Thyrotropin-releasing Hormone Receptor-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:23263-23269
- Hanson, M. A., Stevens, R. C. (2009) Discovery of New GPCR biology – One Receptor Structure at a Time. *Structure*. 17:8-14
- Hastings, J. W., Morin, J. G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the Ctenophore, Mnemiopsis and the coelenterates Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla. *The Biological Bulletin*. 137:402
- Heim, R., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*. 373:663-664

- Heim, R., Prasher, D. C., Tsien, R. Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12501-12504
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M. J., Bünemann, M. (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *The EMBO Journal*. 24:4106-4114
- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Mazurkiewicz, J. E. (2004) Biochemical and Biophysical Characterization of Serotonin 5-HT_{2C} Receptor Homodimers on the Plasma Membrane of Living Cells. *Biochemistry*. 43:13963-13971
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., Kerppola, T. K. (2002) Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell*. 9: 789-798
- Hynes, T. R., Tang, L., Mervine, S. M., Sabo, J. L., Yost, E. A., Devreotes, P. N., Berlot, C. H. (2004) Visualization of G Protein $\beta\gamma$ Dimers Using Bimolecular Fluorescence Complementation Demonstrates Roles for Both β and γ in Subcellular Targeting. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:30279-30286
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994) Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*. 263:802-805
- Janetopoulos, C., Jin, T., Devreotes, P. (2001) Receptor-Mediated Activation of Heterotrimeric G-Proteins in Living Cells. *Science*. 291:2408-2411
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., Bettler, B. (1998) GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 396:683-687
- Kobilka, B. K., Deupi, X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 28:397-406
- Lakowicz J. R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second edition. Kluwer Academic / Plenum Publisher.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R., Huang, C.-C. (1997) Deletions of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein Define the Minimal Domain Required for Fluorescence. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:28545-28549
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., Kenworthy, A. (2001) Studying Protein Dynamics in Living Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2:444-456
- Liu, R., Ren, D., Liu, Y., Deng, Y., Sun, B., Zhang, Q., Guo, X. (2011) Biosensors of DsRed as FRET Partner with CFP or GFP for Quantitatively Imaging Induced Activation of Rac, Cdc42 in Living Cells. *Molecular Imaging and Biology*. 13:424-431
- Lohse, M. J. (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Current Opinion in Pharmacology*. 10:53-58

- MacDonald, M. L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B. H., Bilter, G. K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T., Michnick, S. W., Westwick, J. K. (2006) Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nature Chemical Biology*. 2:329-337
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., Lukyanov, S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*. 17:969-973
- McDonald, N. A., Henstridge, C. M., Connolly, C. N., Irving, A. J. (2007) Generation and functional characterization of fluorescent, N-terminally tagged CB₁ receptor chimeras for live-cell imaging. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 35:237-248
- Milligan, G. (1999) Exploring the dynamics of regulation of G protein-coupled receptors using green fluorescent protein. *British Journal of Pharmacology*. 128:501-510
- Milligan, G., Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*. 146:46-55
- Milligan, G., Svoboda, P., Brown, C. M. (1994) Why are there so many adrenoceptor subtypes? *Biochemical Pharmacology*. 48:1059-1071
- Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I., Sakakibara, S. (1998) Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea* green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:13549-13554
- Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W. (2009) Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30:249-259
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J. (1996) Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science*. 273:1392-1395
- Ostašov, P., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotný, J., Svoboda, P. (2007) Disruption of the Plasma Membrane Integrity by Cholesterol Depletion Impairs Effectiveness of TRH Receptor-Mediated Signal Transduction via Gq/G₁₁α Proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 27:335-352
- Ostašov, P., Krůšek, J., Durchánková, D., Svoboda, P., Novotný, J. (2008) Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G₁₁α protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochemistry and Function*. 26:264-274
- Ovchinnikov, Y. A. (1982) Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure – function relationships. *FEBS Letters*. 148:179-191

- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., Piston, D. W. (1997) Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*. 73:2782-2790
- Phillips, G. N., Jr. (1997) Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology*. 7:821-827
- Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3:639-650
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-233
- Prescott, M., Nowakowski, S., Nagley, P., Devenish, R. J. (1999) The Length of Polypeptide Linker Affects the Stability of Green Fluorescent Protein Fusion Proteins. *Analytical Biochemistry*. 273:305-307
- Ransnäs, L. A., Svoboda, P., Jasper, J. R., Insel, P. A. (1989) Stimulation of β -adrenergic receptors of S49 lymphoma cells redistributes the α subunit of the stimulatory G protein between cytosol and membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:7900-7903
- Reid, B. G., Flynn, G. C. (1997) Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry*. 36:6786-6791
- Sarramegna, V., Talmont, F., de Roch, M. S., Milon, A., Demange, P. (2002) Green fluorescent protein as a reporter of human μ -opioid receptor overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 99:23-39
- Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*. 217:3-15
- Siegel, M. S., Isacoff, E. Y. (1997) A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Neuron*. 19:735-741
- Svoboda, P., Kvapil, P., Insel, P. A., Ransnäs, L. A. (1992) Plasma-membrane-independent pool of the α subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein in a low-density-membrane fraction of S49 lymphoma cells. *European Journal of Biochemistry*. 208:693-698
- Svoboda, P., Milligan, G. (1994) Agonist-induced transfer of the α subunits of the guanine-nucleotide-binding regulatory proteins G_q and G_{11} and of muscarinic m1 acetylcholine receptors from plasma membranes to a light-vesicular membrane fraction. *European Journal of Biochemistry*. 224:455-462

- Svoboda, P., Kim, G.-D., Grassie, M. A., Eidne, K. A., Milligan, G. (1996) Thyrotropin-Releasing Hormone-Induced Subcellular Redistribution and Down-regulation of G_{11α}: Analysis of Agonist Regulation of Coexpressed G_{11α} Species Variants. *Molecular Pharmacology*. 49:646-655
- Svoboda, P., Novotný, J. (2002) Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *CMLS (Cellular and Molecular Life Sciences)*. 59:501-512
- Svoboda, P., Teisinger, J., Novotný, J., Bouřová, L., Drmota, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., Stöhr, J., Vokurková, A., Švandová, I., Dürchánková, D. (2004) Biochemistry of Transmembrane Signaling Mediated by Trimeric G Proteins. *Physiological research*. 53(Suppl.1):141-152
- Tsien, R. Y. (1998) The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*. 67:509-544
- Vidi, P.-A., Ejendal, K. F. K., Przybyla, J. A., Watts, V. J. (2011) Fluorescent protein complementation assays: new tools to study G protein-coupled receptor oligomerization and GPCR-mediated signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 331:185-193
- Vidi, P.-A., Chemel, B. R., Hu, C.-D., Watts, V. J. (2008) Ligand-Dependent Oligomerization of Dopamine D₂ and Adenosine A_{2A} Receptors in Living Neuronal Cells. *Molecular Pharmacology*. 74:544-551
- Villardaga, J.-P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M., Lohse, M. J. (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature Biotechnology*. 21:807-812
- Wachter, R. M., Elsliger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G. T., Remington, S. J. (1998) Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*. 6:1267-1277
- Wall, M. A., Socolich, M., Ranganathan, R. (2000) The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Structural Biology*. 7:1133-1138
- Wallrabe, H., Periasamy, A. (2005) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*. 16:19-27
- Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 14:1246-1251
- Young, S. H., Walsh, J. H., Rozengurt, E., Slice, L. W. (2001) Agonist-Dependent Immobilization of Chimeric Bombesin/GRP Receptors: Dependence on c-Src Activity and Dissociation from Internalization. *Experimental Cell Research*. 267:37-44
- Zimmer, M. (2002) Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews*. 102:759-781

7. Elektronické zdroje

<http://www.tsienlab.ucsd.edu/HTML/Images/IMAGE%20-%20Rendered%20GFP%20-%201024.jpg>

databáze GPCRTree; <http://igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/gpcrtree/>