

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Visualisace receptorů spřažených s G proteiny pomocí bílkovin  
s přirozenou fluorescencí**

**Jana Brejchová**

**Bakalářská práce**

**2007**

Vedoucí bakalářské práce

Doc.RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Oddělení membránových receptorů

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Doc. RNDr. Petru Svobodovi DrSc., za odborné vedení, cenné rady a podporu. Dále bych chtěla poděkovat všem spolupracovníkům z laboratoře a to především Mgr. Daně Durchánkové za odborné vedení v průběhu praktické části práce, Mgr. Pavlu Ostašovi a RNDr. Vladimíru Rudajevovi za možnost konzultace v průběhu psaní samotné bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, jen s využitím uvedené literatury a pod vedením vedoucího bakalářské práce.

V Praze dne .....

.....

Jana Brejchová

## **Abstrakt**

Práce charakterizuje současný pohled na využití GFP a jemu podobných fluoreskujících proteinů při studiu receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs).

Short review about importance of GFP and other proteins endowed with spontaneous/natural fluorescence in studies of G-protein coupled receptors.

Klíčová slova:

- receptory, zeleně fluoreskující protein, využití, funkční studie

## Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>8</b>
2.1. Receptory spřažené s G proteiny.....	8
2.2. Heterotrimerní G proteiny.....	9
2.3. Bílkoviny s přirozenou fluorescencí.....	12
2.3.1. Zeleně fluoreskující protein.....	12
2.3.2. Červeně fluoreskující protein.....	15
2.3.3. Přehled metod - možnosti použití fluoreskujících proteinů za účelem visualisace receptorů.....	16
<b>3. PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>20</b>
<b>4. ZÁVĚR.....</b>	<b>24</b>
<b>5. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....</b>	<b>26</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>AC</b>	Adenylylcykláza
<b>BFP</b>	Blue fluorescent protein
<b>CFP</b>	Cyan fluorescent protein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>FP (FPs)</b>	Fluoreskující protein (proteiny)
<b>FRAP</b>	Fluorescent recovery after photobleaching
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance energy transfer
<b>GABA</b>	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
<b>GDP</b>	Guanosindifosfát
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GnRH</b>	Gonadotropin releasing hormone
<b>GPCRs</b>	G protein coupled receptors
<b>GRKs</b>	G protein-linked receptor kinases
<b>GTP</b>	Guanosintrifosfát
<b>HEK</b>	Human embryonic kidney cells
<b>PBS</b>	Fosfátový pufr
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipáza C $\beta$
<b>PKA</b>	Protein kináza A
<b>PKC</b>	Protein kináza C
<b>RFP (=DsRed)</b>	Red fluorescent protein
<b>TAS1, TAS2</b>	Taste receptors
<b>TRH</b>	Thyrotropin-releasing hormone (thyreoliberin)
<b>TRHR</b>	Thyrotropin-releasing hormone receptor
<b>VSV</b>	Vesicular stomatitis virus
<b>YFP</b>	Yellow fluorescent protein

## 1. Úvod

Plazmatická membrána každé buňky obsahuje různé receptory, které jsou nezbytné pro příjem signálů z okolního prostředí. Receptory spřažené s G proteiny tvoří mezi buněčnými receptory nejrozsáhlejší skupinu. Do této skupiny patří řada receptorů, jejichž chybné fungování nebo dokonce absence na buněčném povrchu může být spojena s řadou pro organismus patologických stavů. Proto jsou tyto receptory velmi intenzivně zkoumány.

Metody fluorescenčního značení poskytly dobrý nástroj pro sledování životního cyklu receptorů. Visualisace takového receptoru může být provedena pomocí fluorescenčně značených ligandů nebo fluorescenčně značených protilátek. Tyto metody značení receptorů mají však několik nevýhod, mezi které patří například disociace značeného ligandu nebo nespecifické navázání protilátek v rámci pozorovaného objektu. Objev bílkovin s přirozenou fluorescencí, jako jsou zeleně a červeně fluoreskující protein, otevřel nové možnosti v rámci visualisace receptorů. Pojednání o těchto fluoreskujících proteinech a jejich využití při pozorování receptorů spřažených s G proteiny je hlavní náplní mé bakalářské práce.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Receptory spřažené s G proteiny

Superrodina receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs) zaujímá v genomu savců největší rodinu proteinů. Ligandy GPCRs tvoří velmi rozmanitou skupinu. Patří mezi ně tzv. biogenní aminy, peptidy, proteiny, lipidy, nukleotidy, odoranty, ionty, fotony aj. Z různorodosti ligandů vyplývá, že i samotné GPCRs se mezi sebou musí odlišovat, protože každý z výše uvedených ligandů má jiné požadavky na vazebné místo na receptoru. I přes skutečnost, že se GPCRs mezi sebou odlišují, musí splňovat dvě základní podmínky, aby vůbec mohly být do této skupiny receptorů zařazeny. První podmínkou je sedm průniků plazmatickou membránou tvořených  $\alpha$ -helixy, které formují receptor a umožňují přenos signálu z extracelulárního prostoru do buňky. Druhou podmínkou je schopnost receptoru interagovat s G proteiny. V současné době se však ukazuje, že GPCRs jsou zapojeny do celé řady alternativních signálních drah, jejichž součástí G proteiny nejsou. Proto by možná bylo výstižnější používat místo názvu receptory spřažené s G proteiny (GPCRs) označení "receptory sedmkrát procházející membránou" (7TM receptors). V současné době se lze v publikacích setkat s oběma typy označení, ale označení GPCRs je stále používanější, neboť je historicky původnější.

Vědecký tým ze Švédska uveřejnil v roce 2003 (Fredriksson et al., 2003) výsledky fylogenetické analýzy, které byly podrobeny všechny doposud známé GPCRs kódované lidským genomem. Výsledkem této analýzy bylo rozčlenění receptorů do následujících pěti rodin: glutamátová (G), rhodopsinová (R), "adhesion" (A), "frizzled/taste2" (F) a sekretinová (S) rodina. Uvedené rodiny jsou souhrnně označovány zavedeným akronymem GRAFS.

Název sekretinové rodiny je odvozen od receptoru pro sekretin, který byl „klonován“ jako první. Dalšími členy jsou například receptory pro kalcitonin, glukagon, kortikoliberiny nebo somatoliberiny. Ligandy těchto receptorů jsou relativně velké peptidy, které většinou fungují v rámci parakrinního typu sekrece. Pro "adhesion" rodinu receptorů je typická přítomnost "adhesion-like" motivů na jejich N-konci, který je relativně dlouhý (200 – 2800 aminokyselin) a obsahuje řadu míst pro glykosylaci. Do glutamátové rodiny bylo zařazeno osm receptorů pro glutamát, dva receptory pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) a pět chuťových receptorů (TAS1). Glutamátové receptory mají vazebnou doménu pro ligand umístěnou na N-konci, jehož přibližná délka je 280 – 580 aminokyselin. Podobně je tomu i u receptorů pro GABA. Chuťové receptory exprimované na povrchu jazyka mají také dlouhý

N-konec, který ovšem na rozdíl od receptorů pro glutamát a GABA obsahuje sérii cysteinových aminokyselinových zbytků. Do "frizzled/taste2" rodiny patří také chuťové receptory. Tyto se označují jako TAS2 a mají na rozdíl od TAS1 receptorů krátký N-konec. Tato skutečnost podporuje domněnku, že vazebné místo pro ligand se na jejich N-konci s největší pravděpodobností nevyskytuje. TAS2 receptory jsou kromě jazyka exprimovány ještě na epitelu ústního patra. O jejich funkci se toho zatím příliš mnoho neví. Rhodopsinová rodina receptorů je nejobsáhlejší. Její členové se dříve označovaly jako rhodopsinu podobné receptory. Ligandem rhodopsinu jsou jak známo fotony spektra viditelného záření. Společným znakem této rodiny je například NSxxNPxxY motiv v sedmém transmembránovém průniku. Ligandy se vážou do "prohlubně" vytvořené mezi transmembránovými úseky receptoru. Členy této rozsáhlé rodiny jsou například receptory pro katecholaminy (dopamin, serotonin, adrenalin), melatonin, histamin, nebo thyreoliberin (TRH – thyrotropin releasing hormon). (Fredriksson et al., 2003)

I přesto, že byla v nedávné době prokázána schopnost GPCRů zprostředkovat přenos signálu do buňky prostřednictvím drah, které G proteiny nezahrnují, je signalizační dráha, v níž GPCRů interagují s heterotrimerními G proteiny, dráhou nejčastější. Z tohoto důvodu pojednávám v následující odstavci právě o heterotrimerních G proteinech. Heterotrimerní G proteiny fungují jako přenašeče signálu z extracelulárního prostoru buňky na různé intracelulární efekторы, mezi které patří adenylylcyklázy, fosfolipázy nebo iontové kanály.

## 2.2. Heterotrimerní G proteiny

Heterotrimerní G proteiny jsou tvořeny třemi podjednotkami označovanými jako  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ .  $\alpha$  podjednotka je zodpovědná za vazbu GTP a GDP a za hydrolýzu GTP. Podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  jsou asociovány do jednoho komplexu. V dnešní době je známo 16 genů kódujících  $\alpha$  podjednotku, 5 genů kódujících  $\beta$  podjednotku a 12 genů kódujících  $\gamma$  podjednotku G proteinu. (Pierce et al., 2002)

G proteiny jsou klasifikovány podle typu jejich  $\alpha$  podjednotek a rozdělují se do čtyř tříd, které se označují jako:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ , a  $G_{12}$ .  $G_s$  proteiny aktivují adenylylcyklázu (AC).  $G_i$  proteiny inhibují AC a aktivují dovnitř usměrňující draslíkový kanál spřažený s G proteiny.  $G_q$  proteiny aktivují fosfolipázu  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) a  $G_{12}$  proteiny jsou spojeny s regulací MAPkinázových drah. Každá třída G proteinů má několik členů, které regulují různé typy efektorů. Výše uvedené efekторы nejsou jedinými signálními molekulami aktivovanými danou

třídou. Další příklady efektorů jsou současně se zástupci jednotlivých tříd uvedeny v následující tabulce. (Fredriksson et al., 2003); (Milligan a Kostenis, 2006).

Třída	Zástupci	Efektory	Místo exprese
$G_s\alpha$	$G_{s(S)}\alpha$ $G_{s(L)}\alpha$ $G_{s(XL)}\alpha$ $G_{olf}\alpha$	adenylylcyklázy ( $G_{s, s(XL), olf}\alpha$ ) ↑ kanál pro $K^+$ ( $G_s\alpha$ ) ↑ tyrosin kinázy typu Src (c-Src, Hck) ( $G_s\alpha$ ) ↑ GTPáza tubulinu ( $G_s\alpha$ ) ↑	$G_s\alpha$ - všudypřítomný $G_{olf}\alpha$ - olfaktorické neurony
$G_{i/o}\alpha$	$G_{o1}\alpha$ $G_{o2}\alpha$ $G_{i1-i3}\alpha$ $G_{z}\alpha$ $G_{t1/2}\alpha$ $G_{gust}\alpha$	adenylylcyklázy ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) ↓ MAPkinázová aktivace ( $G_i\alpha$ ) ↑ kanály pro $Ca^{2+}$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) ↓ kanály pro $K^+$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) ↑ GTPáza tubulinu ( $G_i\alpha$ ) ↑	$G_{o1-2}\alpha$ - neurony, neuroendokrinní buňky, astrocyty, srdce $G_{i1-i3}\alpha$ - neurony $G_z\alpha$ - krevní destičky, neurony, neurosekreční buňky $G_{t1}\alpha$ - tyčinky oka $G_{t2}\alpha$ - čípky oka $G_{gust}\alpha$ - chuťové pohárky pro sladkou/hořkou chuť, chemoreceptory dýchacích cest
$G_{q/11}\alpha$	$G_q\alpha$ $G_{11}\alpha$ $G_{14}\alpha$ $G_{15}\alpha$ $G_{16}\alpha$	fosfolipáza $C\beta$ ↑ p63-RhoGEF ( $G_{q/11}\alpha$ ) ↑ kanály pro $K^+$ ( $G_q\alpha$ ) ↑	$G_{q/11}\alpha$ - všudypřítomné $G_{15/16}\alpha$ - hematopoetické buňky
$G_{12/13}\alpha$	$G_{12}\alpha$ $G_{13}\alpha$	fosfolipáza D ↑ fosfolipáza $C\epsilon$ ↑	všudypřítomné

Tabulka tříd G proteinů

Způsob interakce G proteinů s GPCRs je následující. V klidovém stavu jsou všechny podjednotky G proteinu spojeny v jeden komplex ukotvený v membráně a  $\alpha$  podjednotka má navázaný GDP. Tento komplex se většinou nachází v blízkosti receptoru. Vazba ligandu na receptor umožňuje interakci aktivovaného receptoru s G proteinem, která je spouštěcím mechanismem výměny GDP na  $\alpha$  podjednotce za GTP, což má za následek nejen odpojení G proteinového komplexu od receptoru, ale i jeho rozpad na  $\alpha$ -GTP a  $\beta\gamma$  podjednotku. Obě podjednotky vzniklé disociací jsou v buňce schopny modulovat členy signální kaskády, které

se nacházejí na dalších úrovních přenosu signálu.  $\alpha$ -GTP podjednotky dané třídy G proteinů moduluje řadu efektorů, které jsou uvedeny v tabulce tříd G proteinů. V případě  $\beta\gamma$  podjednotek bylo zjištěno, že mohou aktivovat PLC $\beta$ , AC II, IV a VII nebo inhibovat AC I. Aktivovaný stav trvá do té doby, než je GTP vnitřní GTPázovou aktivitou  $\alpha$  podjednotky hydrolyzováno na GDP. Hydrolyza je následována reasociací  $\alpha$  a  $\beta\gamma$  podjednotky, které se znovu spojují v jeden komplex a jsou tak schopny reagovat na příchod dalšího stimulu. Mohlo by se zdát, že aktivovatelnost G proteinových komplexů prostřednictvím GPCRs je nekonečná, což by v případě nadměrné přítomnosti stimulů mohlo vyústit v nadměrnou úroveň signalizace. Z fyziologického hlediska by to jistě byl nežádoucí patologický stav. Buňky jsou ale před nadměrnou úrovní signalizace chráněny složitým systémem zpětnovazebných mechanismů nazývaných desensibilizace a "down-regulace". (Svoboda a Novotný, 2001)

Proces útlumu receptorové signalizace v případě dlouhodobé přítomnosti stimulačního ligandu je označován jako desensibilizace. Odehrává se jak na úrovni GPCRs, tak na úrovni G proteinů. Za výrazné snížení funkčnosti GPCR je zodpovědná především jeho fosforylace, která je zprostředkována proteinkinázami A (PKA) a C (PKC) nebo rodinou kináz spřažených s GPCR (GRKs). Regulace kinázami PKA a PKC slouží jako negativní zpětná vazba a spočívá především v rozpojení vazeb mezi receptory a příslušnými G proteiny. Mnohem obecnějším mechanismem je desensibilizace GPCRs prostřednictvím GRKs, do které je začleněn  $\beta$ -arrestin. GRKs rozpoznávají a fosforylují pouze aktivovanou formu receptoru s navázaným ligandem. Následně se k fosforylovanému receptoru s vysokou afinitou váže  $\beta$ -arrestin, který mu zabráňuje v interakci s G proteinem. Defosforylaci receptorů mají na starosti fosfatázy umístěné v intracelulárních váčcích, do kterých je receptor po vazbě  $\beta$ -arrestinu přemístěn.

Desensibilizace je obvykle následována přesunem receptoru z plazmatické membrány do intracelulárního prostoru buňky, který se odehrává endocytózou. Tento děj je znám pod pojmem internalizace. GPCR může být internalizován dvěma různými mechanismy endocytózy. Nejvíce je prozkoumána endocytóza receptoru do klatrinem obalených váčků, kterého se účastí i zmíněný  $\beta$ -arrestin. Dalo by se říct, že  $\beta$ -arrestin je vlastně spojovacím článkem, protože se váže nejen na receptor, ale i na samotný klatrin. Proces endocytózy je ukončen odštěpením váčku dynaminem, což je protein s GTPázovou aktivitou. Receptor může být také endocytován v oblastech plazmatické membrány bohatých na protein kaveolin a na cholesterol. Z těchto okrsků membrány se při endocytóze odškrcují váčky zvané kaveoly.

Přesný mechanismus tohoto typu endocytózy GPCRs však ještě není zcela znám. (Pierce et al., 2002)

## 2.3. Bílkoviny s přirozenou fluorescencí

### 2.3.1. Zeleně fluoreskující protein

Zeleně fluoreskující protein (GFP) byl objeven v roce 1962 doktorem O. Shimomurou (Brooks, 2005) při izolaci aequorinu z medúzy *Aequorea victoria*. Aequorin je protein vykazující chemiluminiscenci. Záření, které emituje spadá svou vlnovou délkou do modré oblasti (460-480 nm) spektra viditelného světla. Záření, které vykazuje medúza má však zelenou barvu. Zelená oblast spektra viditelného světla je vymezena rozsahem vlnových délek 490-530 nm. Záhadu barevné formy medúzou vysílaného záření se doktoru Shimomurovi podařilo objasnit teprve v roce 1974. Zjistil, že mezi aequorinem a GFP se odehrává přenos energie (Brooks, 2005). Excitační spektrum GFP má dvě maxima. Jedno v rozmezí vlnových délek 395 a 397 nm, druhé v rozmezí vlnových délek 470 a 475 nm. Emisní spektrum GFP spadá do rozmezí vlnových délek 503 a 508 nm. Emise aequorinu má své maximum při vlnové délce 470 nm, což se překrývá s druhým excitačním maximem GFP. Z uvedených hodnot vyplývá, že emise aequorinu vyvolá excitaci GFP a tím vlastně i výslednou emisi GFP. Proto má záření medúzy zelenou barvu namísto modré. GFP byl nalezen u celé řady podmořských organismů (žahavců) jako jsou například *Renilla* nebo *Obelia*. Praktického využití se však dočkal hlavně GFP z *Aequorea victoria*. (Brooks, 2005); (Shaner et al., 2005)

GFP je ze strukturní hlediska  $\beta$ -barelem složeným z 11  $\beta$ -listů, ke kterým je připojen  $\alpha$ -helix probíhající podél osy barelu. Chromofor je připojen k  $\alpha$ -helixu a je téměř dokonale ukryt uprostřed zmíněného barelu. V blízkosti chromoforu se nachází až překvapivé množství molekul vody a polárních skupin, pocházejících především z následujících aminokyselinových zbytků: glutamin v pozici 69 (Gln69), arginin v pozici 96 (Arg96), histidin v pozici 148 (His148), threonin v pozici 203 (Thr203), serin v pozici 205 (Ser205) a glutamát v pozici 222 (Glu222), (Tsien, 1998).

Hlavní výhodou GFP je nezávislost exprese a zaujmutí správné konformace, neboli maturace, na enzimech medúzy. Při pokusech s expresí GFP v jiných živočišných druzích se ukázalo, že ani v hostitelském organismu není narušena schopnost fluorescence, a proto se GFP začal používat k visualisaci buněčných dějů. Efektivnímu použití GFP předcházela nejprve studie procesu maturace tohoto proteinu. Důraz byl kladen především na vliv

jednotlivých faktorů prostředí, ve kterém se tento děj odehrává. Nejzávažnější vliv na zaujmutí funkční, fluorescence schopné, konformace GFP má přítomnost nebo naopak nedostupnost atmosférického kyslíku v posledním kroku maturace. Pokusy prokázaly, že protein schopný fluorescence vzniká pouze v aerobních podmínkách. Z uvedené skutečnosti vyplývá, že atmosférický kyslík je pro správnou funkčnost proteinu nezbytný. Jedním z dalších velmi důležitých faktorů ovlivňujících správný průběh maturace GFP je vhodná teplota prostředí. Původní forma proteinu izolovaná z *Aequorea victoria* zaujímá funkční konformaci při laboratorní teplotě. Buněčné linie, na kterých se provádí studie rozličných mechanismů buněčných dějů, jsou však odvozeny převážně od savčích buněk, pro které je přirozená teplota pro růst kolem 37 °C. Tato teplota byla zvolena jako optimální pro pěstování těchto buněčných linií a proto je žádoucí, aby při ní GFP byl schopen zaujmout funkční konformaci. Tuto nekompatibilitu teplotních optim pro buňky a pro GFP se z velké části podařilo vyřešit pomocí mutací původní formy fluoreskujícího proteinu. Mutace byly použity i pro mnoho dalších účelů, jak je uvedeno níže. (Tsien, 1998); (Shaner et al., 2005)

Od původního GFP, který emituje záření spadající do zelené oblasti viditelného světla, jsou již v současnosti odvozeny řady variant pokrývajících svou emisí téměř celé spektrum barev viditelného světla. Mezi dnes už tradiční formy GFP, které byly odvozeny, patří proteiny, jejichž emisní spektrum zasahuje do žluté (YFP), modrozelené (CFP) nebo modré (BFP) části spektra. Kupříkladu kombinace CFP (donor) s YFP (akceptor) je v dnešní době běžně používána pro metodické účely využití FRET. O uvedených variantách GFP (YFP, CFP, BFP) se podrobněji zmiňuji níže. V naší laboratoři máme z uvedených forem k dispozici pouze YFP a CFP. Různé barevné formy GFP jsou výsledkem mutací zaměřených na posun excitačních a emisních spekter. Původní "wild type" GFP má dvě excitační maxima a emituje zelené záření. Jedním z problémů jeho použití byla relativně nízká intenzita záření. První vylepšenou verzí se stal EGFP (enhanced) nesoucí mutace nahrazující serin (S) v pozici 65 threoninem (T) a fenylalanin (F) v pozici 64 leucinem (L). Uvedené mutace přispěly k rychlejšímu formování proteinu. EGFP také emituje zelené záření, ale díky potlačení excitačního maxima při nižší vlnové délce (395-397 nm) má větší intenzitu. YFP (yellow) forma GFP nese mutaci nahrazující glutamin (Q) v pozici 96 lysinem (K). Hlavním důvodem posměněné barvy emitovaného záření je přítomnost aromatické aminokyseliny (histidin, tryptofan, fenylalanin nebo tyrosin) v pozici 203, která je zodpovědná za posun vlnové délky jak excitačního, tak emisního spektra. CFP (cyan) nese mutaci nahrazující tyrosin (Y) v pozici 66 tryptofanem (W), která působí posun vlnových délek excitačního a emisního spektra k

hodnotám 436 a 476 nm. Důsledkem tohoto posunu je modrozelená barva emitovaného záření. Poslední nejznámější barevnou úpravou GFP je BFP (blue). BFP nese mutaci, která nahrazuje tyrosin (Y) v pozici 66 histidinem (H) a je podstatou emise záření modré barvy. Excitační a emisní spektra uvedených proteinů jsou spolu s mutacemi uvedeny v následující tabulce. (Tsien, 1998); (Shaner et al., 2005)

<b>Forma GFP</b>	<b>mutace</b>	<b>vlnová délka excitace (nm)</b>	<b>vlnová délka emise (nm)</b>	<b>barva záření</b>
BFP	Y66H	380 - 384	440 - 448	modrá
CFP	Y66W	434 - 452	476 - 505	modrozelená
EGFP	S65T, F64L	488	507 - 509	zelená
YFP	Q96K	508 - 516	518 - 529	žlutá
GFP (wild - type)		395 - 397 470 - 475	503 - 508	zelená

Tabulka barevných variant GFP. Mutace jsou v tabulce pro přehlednost uvedeny pouze formou jednopísmenných zkratk jednotlivých aminokyselin. Celé názvy aminokyselin jsou uvedeny v textu.

Rámec využití GFP při sledování buněčných dějů byl rozšířen prostřednictvím dalších cílených i náhodných mutací, které změnilly jeho citlivost k některým faktorům okolního prostředí. Například pH sensitivita vylepšených forem tohoto proteinu nachází uplatnění při měření pH buněčných organel. Prvotní zamýšlenou aplikací GFP však byla detekce genové exprese in vivo. Pro expresi GFP na detekovatelné úrovni jsou v savčích buňkách třeba silné promotory, protože na jednu molekulu GFP připadá pouze jeden fluorofor. (Zhang et al., 2002)

### 2.3.2. Červeně fluoreskující protein

Ačkoli se GFP a jeho varianty (GFPs) v průběhu svého používání ke značení buněčných proteinů velmi dobře osvědčily, hledání nových fluoreskujících proteinů s vyšší intenzitou emitovaného záření a s emisními spektry posunutými směrem k červené oblasti spektra viditelného záření neustále pokračuje. Takovým fluoreskujícím proteinem je například červeně fluoreskující protein (RFP) z „mořského korálu“ rodu *Discosoma*. Některé vlastnosti RFP, jako je například vysoká fotostabilita, emisní spektrum posunuté směrem k červené oblasti spektra viditelného záření nebo stabilita při změnách pH, ho předurčují pro účely fluorescenčního značení v metodách buněčné biologie. Použití RFP má však také určitá omezení.

RFP je komerčně dostupný pod označením DsRed odvozeným od názvu organismů, ze kterých byl tento protein izolován. DsRed je protein o molekulové hmotnosti 28 k Da, který je složen z 225 aminokyselinových zbytků. Krystalografická analýza jeho molekuly prokázala existenci tetramerní formy tohoto proteinu. Tetramerní struktura je klíčová pro funkci, kterou DsRed zastává v přírodě. Každý monomer DsRed je složen z 11  $\beta$ -listů, které jsou uskupeny do podoby  $\beta$ -barelu. Monomery mezi sebou interagují prostřednictvím hydrofobních a hydrofilních interakcí, které jsou nezbytné pro tvorbu tetrameru. Terciální struktura DsRed se velmi podobá terciální struktuře GFP. Excitační spektrum DsRed dosahuje svého maxima při vlnové délce 558 nm, emitované fluorescenční záření dosahuje vlnové délky 583 nm. „Wild-type“ DsRed během své maturace přechází ze zelené barvy na červenou. Doba maturace nutná k dosažení polovičního množství červené fluorescence se pohybuje okolo 10 hodin.

Tetramerní struktura DsRed je pro maturaci funkčního proteinu nepostradatelná, ale bohužel je jedním z omezení využití DsRed, neboť je příčinou vzniku agregátů při značících metodách a rychlost její formace je v porovnání s GFP podstatně nižší. Tyto nedostatky však mohou být vyřešeny zavedením patřičných mutací v rámci původního proteinu. Snažení mnoha vědeckých týmů se ubírá především k tvorbě monomerního DsRed, jehož maturace by byla mnohem rychlejší. K tvorbě monomeru je nutné přerušit všechny vazby, jejichž přítomnost vede ke vzniku tetrameru. K vytvoření monomerního DsRed nazvaného jako mRFP1 bylo zapotřebí zavedení 33 mutací v rámci jeho aminokyselinové sekvence. Tento protein sice vykazoval mnohem větší rychlost procesu maturace, ale intenzita jeho záření dosahovala sotva poloviční hodnoty tetramerního proteinu. (Shrestha a Deo, 2006)

### 2.3.3. Přehled metod - možnosti použití fluoreskujících proteinů za účelem visualisace receptorů

Využití fluoreskujících proteinů (FPs) pro účely visualisace zahrnuje v první řadě tvorbu fuzních proteinů, která je řazena mezi nejčastější a nejúspěšnější použití FPs a spočívá v připojení sekvence kódující FP k sekvenci sledovaného proteinu. Proteiny upravené tímto způsobem jsou označovány také jako chimérické nebo rekombinantní a používají se k transfekci pozorovaného objektu. Tímto objektem mohou být například celé organismy nebo jen buňky vybrané buněčné linie. U fluorescenčně označených proteinů se dá sledovat nejen jejich umístění v rámci buňky, ale také jejich vzájemná vzdálenost. V případě GPCRs poskytla visualisace pomocí FPs možnost studia pohyblivosti receptorů v membráně nebo studia vlivu vazby ligandu na rozmístění receptorů v rámci plazmatické membrány, která je pravděpodobně esenciální pro shlukování receptorů a začátek průběhu signální dráhy. Pohyblivost receptorů se sleduje metodou *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Pomocí rekombinantních receptorů byly zkoumány také procesy desenzitizace a internalizace receptorů, které patří mezi mechanismy regulace receptorové signalizace. Dalším využitím rekombinantních proteinů může být například sledování intermolekulárních vzdáleností, k čemuž se využívá metody zvané *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). V případě GPCRs se takto dá sledovat dimerizace nebo obecně oligomerizace receptorů, která je ve většině případů považována za nezbytnou pro začátek průběhu signální kaskády. Oligomerizace receptoru by se tedy dala označit za spouštěcí mechanismus přenosu informace z extracelulárního do intracelulárního prostoru buňky.

Jak již bylo řečeno, fuzní protein vzniká připojením sekvence kódující FP k sekvenci sledovaného proteinu. Při přípravě takového proteinu je důležité, aby se jeho aktivita a funkce v porovnání s původní (nezměněnou) formou sledovaného proteinu nijak nelišila. Možností připojení FP je několik. FP je možno připojit jak na C-konec, tak na N-konec zkoumaného proteinu, a to buď přímo nebo pomocí spojovací sekvence označované jako "linker". Studie prokázaly, že se sekvence pro FP, není-li jiná možnost, dá vložit i doprostřed sekvence proteinu, který má být visualisován. Hlavním důvodem tohoto typu připojení FP je skutečnost, že pro některé proteiny jsou obě koncové části, jak N- tak C- konec, nezbytné pro jejich správnou funkci. Jejich modifikace by tedy měla za následek porušení správné funkčnosti daného proteinu. Obecně je však připojení FP na jednu z koncových částí proteinu

nejpoužívanějším způsobem. Mezi FPs, které se používají k tvorbě fúzních proteinů nejčastěji, patří právě GFP a jeho varianty. (Tsien, 1998); (Daly a McGrath, 2003)

Pro účely visualisace GPCRs se GFP vždy připojuje k C-konci, který je umístěn v intracelulárním prostoru buňky. N-konec není vhodný především kvůli tomu, že se nachází v extracelulárním prostoru. GFP je totiž, je-li exprimován samostatně, solubilním a relativně velkým proteinem zaujímajícím globulární konformaci. Je tedy hydrofilní a nebylo by snadné ho přetransportovat přes hydrofobní plazmatickou membránu. Dalším problémem by v tomto případě bylo zajištění správného připojení k N-koncové doméně GPCR. (Milligan, 1999) Do dnešní doby byla připojením GFP nebo některé z jeho variant visualisována celá řada GPCRs. Prvním z nich byl lidský  $\beta_2$ -adrenoreceptor. Dalším z fluorescenčně označených GPCRs byl mimo jiné i receptor pro thyreoliberin (TRH), na kterém bych chtěla tvorbu rekombinantního receptoru demonstrovat podrobněji. (Daly a McGrath, 2003)

Receptor pro TRH (TRHR) jsem si vybrala především proto, že jsem v rámci praktické části mé bakalářské práce pracovala s buňkami, ve kterých je stabilně exprimována rekombinantní verze dlouhé isoformy krysího TRHR. Jednalo se o buněčnou linii HEK293. K tvorbě fúzních proteinů se obecně velmi často používají virové epitopy. K vytvoření rekombinantního TRHR byl použit epitop viru vesikulární stomatitidy (VSV). První krokem samotné přípravy byla modifikace a amplifikace receptoru s epitopem VSV metodou *polymerase chain reaction* (PCR). Funkce vzniklého fragmentu VSV-TRHR byla ověřena pomocí vazebných studií a také prostřednictvím agonistou aktivované produkce inositol fosfátu. TRHR je totiž spřažen s G proteiny, které aktivují PLC $\beta$ , která je zodpovědná právě za produkci inositol fosfátu. Druhým krokem byla PCR amplifikace pozměněné formy GFP. Pro visualisaci TRHR byl použit EGFP. Nakonec byl VSV-TRHR fragment spojen s produktem amplifikace EGFP, čímž vznikl rekombinantní receptor VSV-TRHR-EGFP. Podle něj se buňky, které ho exprimují označují jako VTGP. (Drmota et al., 1998)

Studium pohyblivosti receptorů v membráně pomocí metody FRAP má následující scénář. Fluorescenčně označené receptory jsou v určitém okrsku plazmatické membrány vyběleny pomocí laseru. Fluorescence se však ve vyběleném místě po relativně krátkém časovém úseku obnoví, což vypovídá o značné pohyblivosti receptorů v rámci plazmatické membrány. Rychlost pohybu receptorů v membráně se odvozuje od doby nutné k obnově fluorescence ve sledovaném membránovém okrsku. Platí tedy pravidlo, že čím je doba

obnovy kratší, tím je rychlost pohybu receptorů v plazmatické membráně větší. (Alberts et al, 2002)

FRET je nezářivou formou přenosu energie mezi dvěma fluoreskujícími molekulami, z nichž jedna je donorem energie a druhá jejím akceptorem. Aby se FRET mezi dvěma FPs mohl uskutečnit, musí být splněny určité podmínky. Jako donor a akceptor je třeba zvolit takové FPs, aby se excitační spektrum akceptoru překrývalo s emisním spektrem donoru. Molekuly FPs musí mít patřičnou vzájemnou orientaci a jejich vzdálenost nesmí být větší než 10 nm. FRET může být použit ke studiu dimerizace receptorů právě díky poslední podmínce. Aby receptory mohly vytvořit dimer, musí se k sobě přiblížit na velmi nepatrnou vzdálenost. Jejich interakce se pak projeví uskutečněním FRET mezi dvěma různými FPs, které jsou k receptorům připojeny. Pro účely metody FRET se používají kombinace variant GFP, především dvojice CFP/YFP. (Shaner et al., 2005) Jednou z nevýhod je, že při vysoké úrovni exprese spolu tyto proteiny interagují, což samozřejmě výrazně zkresluje naměřené hodnoty. Nadějí na odstranění tohoto problému se v současnosti stal DsRed, je-li použit jako akceptor. Jeho emisní spektrum, které dosahuje maxima v červené oblasti spektra viditelného záření, je dostatečně vzdáleno od emisního spektra GFP.

Jedním z GPCRs, u kterého byla dimerizace studována byl například receptor pro gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Pro účely metody FRET byla v tomto případě použita právě kombinace GFP a DsRed. Prvním krokem byla samozřejmě tvorba rekombinantních forem receptoru, kterými byly následně transfekovány buňky použité buněčné linie. Sekvence kódující FPs byly k C-konci receptoru připojeny pomocí "linkeru", jehož přítomnost se ukázala nezbytnou jak pro správnou funkci FP, tak pro správnou funkci receptoru. Délka časového úseku mezi transfekcí buněk a provedením experimentu byla nastavena s ohledem na rychlost maturace použitých fluoreskujících proteinů. Před provedením experimentu byly buňky zafixovány, aby došlo k inhibici syntézy nových receptorů. V případě receptoru pro GnRH se předpokládá, že je v nepřítomnosti ligandu v plazmatické membráně zastoupen v podobě náhodně rozmístěných monomerů, které po přidání ligandu interagují a vytváří tak na plazmatické membráně malé agregáty. Přidání ligandu se projevilo přítomností červené fluorescence, která byla výsledkem FRET mezi GFP a DsRed. Tímto byl předpoklad interakce receptorů pro GnRH po přidání příslušného ligandu potvrzen. (Cornea a Conn, 2002)

Receptory mohou být obecně visualisovány metodami, mezi které se řadí: visualisace s pomocí fluorescenčně značených ligandů, fluorescenčně značených protilátek nebo tvorba rekombinantních proteinů s fluoreskujícími proteiny. První dvě metody mají určitá omezení. Jsou jimi především disociace ligandu od receptoru nebo nespecifické navázání protilátky v rámci pozorovaného objektu. Především v případě protilátek je pro pozorování označených buněk nezbytně nutná jejich fixace. Barvení protilátkami je navíc relativně pracné. Tyto potíže se podařilo vyřešit právě využitím fuzních proteinů s FPs. Ale i tvorba fuzních proteinů má určité nevýhody. Hlavní nevýhodou je především velikost připojovaného FP, která tak určuje rámeček buněčných proteinů, ke kterým může být připojen. (Pucadyil et al., 2005)

### 3. Praktická část

V rámci mé bakalářské práce jsem řešila následující praktické úkoly, jejichž popis uvádím níže.

- 1) Kultivace buněk
- 2) Fixace buněk – příprava preparátů pro fluorescenční konfokální mikroskopii
- 3) Pozorování zhotovených preparátů v konfokálním mikroskopu

#### 1) Kultivace buněk

Během svého působení v laboratoři jsem pracovala s buňkami, které se označují jako VTGP a jsou odvozeny od linie lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293. Buňky HEK293 byly transfekovány plasmidem kódujícím dlouhou isoformu krysího receptoru pro TRH modifikovanou připojením GFP, který zároveň nese rezistenci proti antibiotiku Geneticin. VTGP buňky byly kultivovány v inkubátoru pro tkáňové kultury při teplotě 37 °C a v atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub>.

Pro účely kultivace buněk byly použity kultivační láhve od firmy NUNC (Cat. No. 147589) s plochou dna 80 cm<sup>2</sup>. Pro přichycení buněk k podkladu byla jejich dna pokryta 2 % roztokem gelatiny (SIGMA, FW 180,2). Buňky byly kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM) od společnosti SIGMA (Cat. No. D5796) obsahujícím 5% (v/v) newborn calf serum (NCS) od společnosti GIBCO (Cat. No. 16010-159). Pro udržení stabilní transfekce buněk bylo do média pravidelně přidáváno antibiotikum Geneticin, a to tak, aby jeho výsledná koncentrace v mediu byla 0,8 mg/ml.

Medium bylo buňkám pravidelně vyměňováno. Postup výměny byl následující. Všechny potřebné roztoky byly před použitím nejprve vytemperovány na teplotu 37 °C. Prvním krokem samotné výměny media bylo odsátí starého media. Následovalo promytí buněk roztokem 1 x koncentrovaného PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, pH = 7,4). Posledním krokem byla aplikace patřičného množství čerstvého media.

Když buňky pokryly dno kultivační láhve na 80-90 %, byly rozděleny, neboli přepasážovány, do nových kultivačních láhví. Buňky byly pasážovány v poměru 1:4. Postup pasážování buněk se do kroku promytí s 1 x koncentrovaným PBS shodoval s postupem při výměně media. Po odsátí 1 x koncentrovaného PBS byl na buňky aplikován 1 ml 1 x koncentrovaného roztoku trypsinu (1 ml 10 x koncentrovaného Trypsin-EDTA, Cat. No. T4174, do 9 ml 1 x

koncentrovaného PBS), který slouží k uvolnění buněk od podkladu. Když se buňky začaly pouštět, trypsin byl inaktivován přidáním media. Buňky byly následně resuspendovány, aby netvořily shluky a bylo tak zajištěno jejich rovnoměrné rozdělení do nových kultivačních láhví. Na závěr bylo k buňkám přidáno patřičné množství antibiotika Geneticinu, aby bylo dosaženo jeho výše uvedené koncentrace v mediu.

## 2) Fixace buněk

Buňky určené na pozorování pod mikroskopem byly kultivovány na krycích sklíčkách ve sterilních plastových Petriho miskách od společnosti NUNC (Cat.No. 150350). Krycí sklíčka byla před použitím odmaštěna v ethylalkoholu pro UV spektroskopii, vysterilizována a potažena roztokem poly-L-lysinu ve vodě (deionizované) o koncentraci 0,1 mg/ml (poly-L-lysin, Sigma, Cat. No. P-6282). Další kroky byly provedeny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Do každé Petriho misky bylo umístěno 5 krycích sklíček. Do připravených Petriho misek bylo nejprve aplikováno čerstvé medium (10ml na misku). Práce s buňkami se shodovala s postupem při pasážování. Na každé krycí sklíčko byly nanесeny 3-4 kapky resuspendovaného roztoku s buňkami. Buňky byly kultivovány 3 dny, aby dostatečně pokryly povrch krycích sklíček. Den před provedením fixace bylo buňkám vyměněno medium.

Fixace buněk byla již provedena nesterilně. Z Petriho misek bylo nejdříve odsáto medium. Druhým krokem bylo promytí 1x koncentrovaným PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , pH = 7,2), 2 x 5 minut, 37 °C . Po promytí byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem, 10 minut, při laboratorní teplotě. Fixace byla ukončena odsátím roztoku paraformaldehydu a promytím buněk roztokem 1 x koncentrovaného PBS s 10 mM glycinem, 3 x 10 minut. Na závěr byly buňky promyty vodou (deionizovanou). Každé krycí sklíčko bylo nakonec osušeno, přiklopeno do kapky 90% glycerolu na podložním sklíčku a zafixováno bezbarvým lakem na nehty. Takto připravené preparáty byly uchovávány v temnu při 4 °C. V chladničce je preparáty možno uchovávat maximálně 36 hodin před pozorováním. Pro dlouhodobější uschování je třeba přemístit buňky do teploty -20°C.

#### Příprava 4 % paraformaldehydu

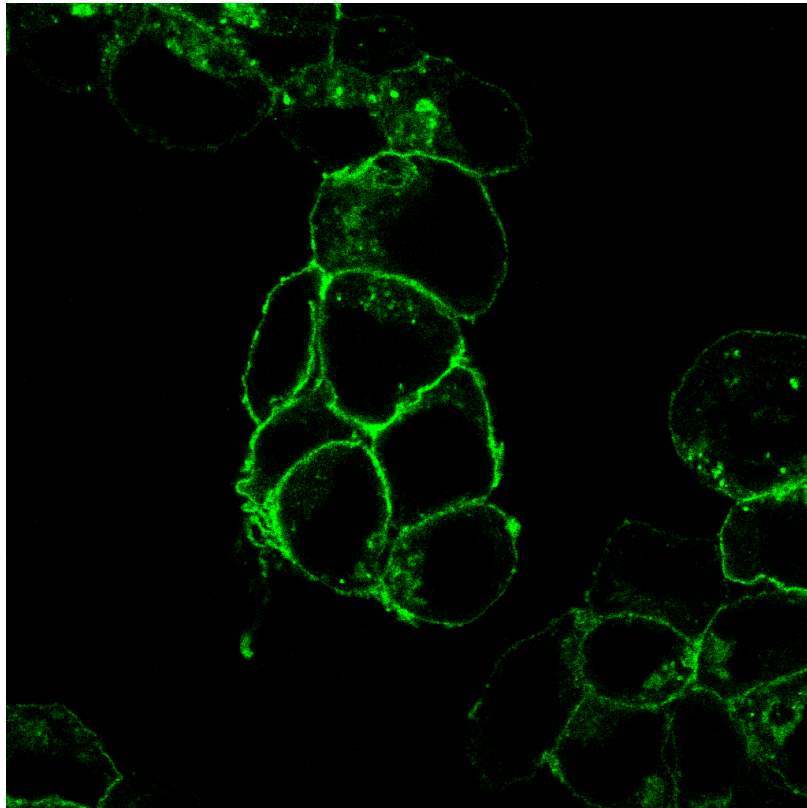
Pro tento účel bylo v digestoři zahřáto 90 ml vody na teplotu 55-60 °C, do které byly po dosažení uvedené teploty přidány 4 g práškového paraformaldehydu (SIGMA, Cat.No. P-6148). Roztok byl ponechán 30 minut za stálého míchání a pro úplné rozpuštění paraformaldehydu do něj bylo přidáno nepatrné množství 1 M roztoku NaOH. Poté byl doplněn 10 ml 10 x koncentrovaného PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, pH = 7,2), přefiltrován přes Whatmanovy filtry a ponechán, dokud se neochladil na laboratorní teplotu. Nakonec bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,2.

#### Příprava 1 x PBS s 10 mM glycinem:

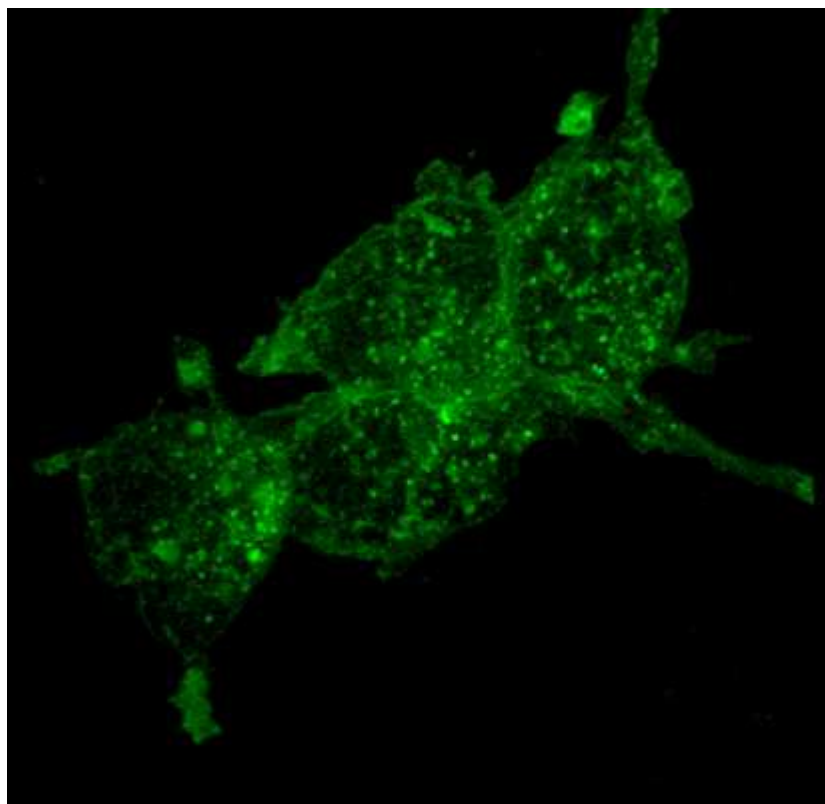
Pro přípravu tohoto roztoku byl použit 1 litr 1 x koncentrovaného PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, pH = 7,2) a 0,751 g glycinu (SERVA, M = 75,07). Glycin byl rozpuštěn za stálého míchání. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C (v lednici).

#### 3) Pozorování zhotovených preparátů v konfokálním mikroskopu

Preparáty byly pozorovány na skenovacím konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2, na Přírodovědecké fakultě UK. Pro pozorování byl použit objektiv pro olejovou imerzi s numerickou aperturou 1,4 a 63-násobným zvětšením. Každá série snímání obsahovala 15-20 optických řezů. U každé série bylo na optickém řezu odpovídajícím prostřednímu průřezu buňkami hodnoceno rozmístění fluorescence, které zhruba odpovídá rozmístění TRHR na membráně. Rozmístění TRHR bylo homogenní. Pro ilustraci uvádím obrázek hodnoceného řezu. Protože optické řezy každé série zhotovené skenovacím mikroskopem procházejí postupně celým objemem buněk, lze z nich pomocí patřičného počítačového programu vytvořit „3D-rekonstrukci“ buněk. Pro tyto účely byl použit program ImageJ. Pro ilustraci uvádím výsledný obrázek takovéto rekonstrukce, který je samozřejmě pouze ve 2D rozměru. 3D rozměr lze pozorovat jen v programu ImageJ.



VTGP, optický řez, 070130



VTGP, 3D rekonstrukce, 070130

## 4 Závěr

Visualisace sledovaných buněčných proteinů pomocí metod využívajících fluorescence je v dnešní době běžně používaným způsobem studia mechanismů celé řady buněčných jevů. Použitím bílkovin s přirozenou fluorescencí byly možnosti visualisace významně rozšířeny. Tyto bílkoviny totiž umožňují přímé označení zkoumaných proteinů fúzováním jejich kódující sekvence s kódující sekvencí zkoumaných proteinů. Fuzní proteiny poskytují v rámci metod fluorescenčního značení několik výhod. Při jejich použití odpadá především pracné barvení, protože jsou syntetizovány přímo v buňce. Další výhodou je možnost pozorování živých nefixovaných buněk. V naší laboratoři se zatím buňky pro pozorování pod mikroskopem fixují. Vyzkoušení pozorování živých buněk se ale v brzké době plánuje.

V případě receptorů spřažených s G proteiny jsou pro účel jejich visualisace fuzní proteiny nejpoužívanější variantou. Rekombinantní receptory jsou velmi dobrým prostředkem pro sledování životního cyklu receptorů v průběhu signálních kaskád, do kterých jsou tyto receptory zahrnuty. Největší důraz je kladen především na výzkum procesů desensibilizace a internalizace receptorů, které patří mezi důležité regulační mechanismy signalizace. V kombinaci s dalšími metodami založenými na využití fluorescence, jakými jsou například FRAP nebo FRET, je rozsah studovaných dějů dále rozšířen. Pomocí metody FRAP se sleduje pohyblivost receptorů v plazmatické membráně. Metoda FRET se zase využívá ke studiu oligomerizace receptorů vyvolaných vazbou příslušných ligandů, která je považována za krok zahajující průběh signalizační kaskády.

GFP je pro tvorbu rekombinantních receptorů používán nejčastěji. Je to především proto, že byl objeven jako první a že jeho použití již bylo do značné míry vylepšeno. I přesto má v dnešní době ještě několik omezení. Jedním z nich je například vzájemná interakce jeho barevných forem při vysoké úrovni exprese zkreslující výsledky metody FRET. Toto omezení se v dnešní době řeší nahrazením akceptoru červeně fluoreskujícím proteinem DsRed. Ten byl objeven relativně nedávno. V jeho případě je proto ještě mnohem větší možnost zavedení patřičných vylepšení, která mohou do budoucna přispět ke zkvalitnění a zpřesnění visualizačních metod.

Cílem mé další práce bude:

- 1) Isolace buněčných membrán VTGP buněk na perkolovém gradientu.
- 2) Použití frakce plazmatických membrán pro stanovení rotačně relaxačního času, který je převrácenou hodnotou rychlosti, VSV-TRHR-GFP proteinu.

3) Pokus o stanovení závislosti rychlosti tohoto proteinu na teplotě, případně na hormonální stimulaci.

4) Budu se účastnit programu, jehož cílem bude připravit mutované formy GPCR, jejichž formu existence v plazmatické membráně bude možno vyšetřovat s pomocí nízkomolekulárních fluorescenčních sond.

## 5 Seznam citované literatury

- Alberts et al (2002) *Molecular biology of the cell* (fourth edition), Garland Science
- Brooks, S. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217:1-2
- Cornea, A., Conn, P.M. (2002) Measurement of changes in fluorescence resonance energy transfer between gonadotropin-releasing hormone receptors in response to agonists. *Methods* 27: 333-339
- Daly, C.J., McGrath, J.C. (2003) Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol Ther* 100: 101-118
- Drmotá, T., Gould, G.W., Milligan, G. (1998) Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 273: 24000-24008
- 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, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272
- Milligan, G. (1999) Exploring the dynamics of regulation of G protein-coupled receptors using green fluorescent protein. *Br J Pharmacol* 128: 501-150
- Milligan, G., Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147: S46-S55
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-650
- Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A. (2005) Membrane organization and dynamics of the G-protein-coupled serotonin<sub>1A</sub> receptor monitored using fluorescence-based approaches. *J Fluoresc* 15: 785-796
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909
- Shrestha, S., Deo, S.K. (2006) Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. *Anal Bioanal Chem* 386: 515-524
- Svoboda, P., Novotný, J. (2002) Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell Mol Life Sci* 59: 501-512
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509-544
- Zhang, J. Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 906-918