

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Radka Trubačová

Studium buněčné signalizace iniciované TRH receptorem
Studies of cell signaling triggered by the TRH receptor

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně na základě konzultací se svým školitelem doc. RNDr. Jiřím Novotným, DSc., vedoucím Skupiny membránových receptorů a buněčné signalizace na Katedře fyziologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Mgr. Radka Trubačová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení a vstřícný přístup v průběhu celého mého studia. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry, velmi cenné rady, motivaci experimentovat za každých okolností a společně strávený čas i mimo laboratorní prostředí. V neposlední řadě bych chtěla velice poděkovat RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za pomoc s měřením a analýzou vápníkových odpovědí a RNDr. Zdeňce Drastichové, Ph.D. za velkou pomoc při zpracování fosfoproteomických dat. Velké poděkování patří mé rodině, která mně byla oporou a podporovala mě po celou dobu studia. A nakonec bych chtěla poděkovat svému muži Martinovi za všechnu lásku, trpělivost a důvěru, kterou mi poskytoval nejen při zpracování této práce a za podporu ve všem, co dělám.

Chtěla bych také poděkovat za finanční podporu poskytnutou Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 402214).

Abstrakt

Signalizace spojená s aktivací receptoru pro tyreoliberin (TRH-R) má svou nezastupitelnou úlohu v řadě buněčných procesů. Tyreoliberin (TRH) má důležitou roli v regulaci sekrece ostatních hormonů a existují také zmnky o jeho možných antiapoptotických a neuroprotektivních účincích. Na druhou stranu je TRH velice rychle degradován a také jeho další vlastnosti, jako jsou srdeční a endokrinní vedlejší účinky a nízká lipofilita, znevýhodňují terapeutické aplikace tohoto hormonu oproti jeho různým analogům. Díky svým účinkům na centrální nervový systém představují TRH i jeho analogy potenciální možnost pro terapii různých neurologických onemocnění, neurodegenerativní choroby nevyjímaje. Molekulární mechanismy zodpovědné za prospěšné působení TRH a jeho analogů zatím nejsou zcela objasněny. Dosud se také jen málo ví o zapojení TRH, popřípadě jeho analogů, v regulaci energetického metabolismu a vlivu na buněčný fosfoproteom.

V první části práce jsme se zaměřili na výzkum vlivu TRH a interakčních partnerů TRH-R na laterální pohyblivost tohoto receptoru v membráně buněčné linie TRY-1 stabilně exprimující TRH-R na C-konci značený žlutým fluorescenčním proteinem (YFP). Z výsledků těchto experimentů je patrné, že nejen stimulace ligandem, ale také přítomnost vazebných partnerů přispívá k modulaci parametrů laterální pohyblivosti receptoru.

Ve druhé části práce jsme se věnovali rozsáhlé analýze funkčního stavu TRH-R. Byl sledován zejména vliv jednotlivých signalizačních molekul na hladiny intracelulárních druhých poslů, jako jsou vápenaté ionty, inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), po aktivaci TRH-R. Ukázalo se, že tento receptor pravděpodobně kromě svého působení přes G_{q/11}α protein se může za určitých podmínek spráňovat také s G_sα, popřípadě i G_iα proteiny, a regulovat tak rozmanité buněčné procesy. Prokázán byl také vliv TRH i jeho analogu taltirelinu (TAL) na fosforylaci kináz ERK1/2 a Akt.

V další části práce jsme sledovali vliv aktivace TRH-R na hladiny volných radikálů, na procesy buněčné bioenergetiky, na funkci mitochondriálního dýchacího řetězce. Aplikace TRH i TAL odhalila jisté antioxidační vlastnosti těchto látek a mírný protektivní účinek proti oxidačnímu stresu indukovanému *tert*-butyl hydroperoxidem (*t*-BHP). Ani jeden z ligandů neprokázal žádný vliv na procesy oxidativní fosforylace, ani na spotřebu kyslíku u buněčné linie GH1.

V poslední části této práce jsme zkoumali vliv β-arrestinu2 na fosfoproteom u GH1 buněčné linie po stimulaci TRH-R. Aktivace TRH-R pomocí TRH nebo TAL a také snížení exprese β-arrestinu2 odhalily rozsáhlé změny ve fosforylaci proteinů souvisejících se signalizací malých GTPáz, mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK), serin/threoninových a tyrozinových proteinkináz, Wnt/β-kateninu a proteinů z dalších signalizačních drah. TRH a TAL navíc vykazovaly mnohé odlišnosti ve fosforylaci velkého počtu proteinů, což by mohlo poukazovat na schopnost těchto dvou ligandů působit jako usměrňovací agonisté na TRH-R.

Abstract

Activation of thyrotropin-releasing hormone receptor (TRH-R) signaling has an irreplaceable role in a number of cellular processes. Thyroliberin (TRH) plays an important role in the regulation of secretion of other hormones and there are also mentions of its possible antiapoptotic and neuroprotective effects. On the other hand, TRH is quickly degraded and also its other properties, such as cardiac and endocrine side effects and low lipophilicity, disadvantage the therapeutic applications of this hormone compared to its various analogues. Due to their effects on the central nervous system, TRH and its analogues represent a potential possibility for the treatment of various neurological diseases, including neurodegenerative disorders. The molecular mechanisms responsible for the beneficial effects of TRH and its analogues have not yet been fully elucidated. So far, little is known about the involvement of TRH, or its analogues, in the regulation of energy metabolism or impact on the cellular phosphoproteome.

In the first part of the thesis, we focused on the study of the effect of TRH and interacting partners of TRH-R on the lateral mobility of this receptor in the membrane of the TRY-1 cell line stably expressing TRH-R labeled with yellow fluorescent protein (YFP) at the C-terminus. The results of these experiments show that not only ligand stimulation but also the presence of binding partners contribute to the modulation of the lateral mobility parameters of the receptor.

The second part of the thesis was devoted to an extensive analysis of the functional state of TRH-R. In particular, the effect of individual signaling molecules on the levels of intracellular second messengers, such as calcium ions, inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP), after TRH-R activation, was studied. It has been shown that, in addition to its action via the G_{q/11}α protein, this receptor can, under certain conditions, also be coupled to G_sα or G_iα proteins, thus regulating various cellular processes. The effect of TRH and its analogue taltirelin (TAL) on the phosphorylation of ERK1/2 and Akt kinases has also been demonstrated.

In the next part of the thesis we monitored the effect of TRH-R activation on levels of free radicals, on the processes of cellular bioenergetics, on the function of the mitochondrial respiratory chain. The application of both TRH and TAL revealed certain antioxidant properties of these substances and a mild protective effect against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). None of the ligands showed any effect on oxidative phosphorylation processes or on oxygen consumption in the GH1 cell line.

In the last part of this thesis, we investigated the effect of β-arrestin2 on the phosphoproteome in the GH1 cell line after TRH-R stimulation. Activation of TRH-R by TRH or TAL, as well as decreased expression of β-arrestin2, revealed extensive changes in phosphorylation of proteins related to the signaling pathways of small GTPases, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), serine/threonine and tyrosine protein kinases, Wnt/βcatenin and proteins from other signaling pathways. In addition, TRH and TAL showed many differences in the phosphorylation of

a large number of proteins, which could indicate the ability of these two ligands to act as biased agonists at TRH-R.

Klíčová slova: β -arrestin, laterální mobilita, receptor pro tyreoliberin, signalizace, siRNA inhibice, taltirelin, tyreoliberin

Keywords: β -arrestin, lateral mobility, thyrotropin-releasing hormone receptor, signaling, siRNA inhibition, taltirelin, tyreoliberin

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam zkratk..... | 1 |
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED..... | 9 |
| 2.1 Receptory spřažené s G proteiny..... | 9 |
| 2.1.1 Klasifikace GPCRs..... | 9 |
| 2.2 G proteiny..... | 10 |
| 2.2.1 Monomerní G proteiny neboli malé G proteiny..... | 10 |
| 2.2.2 Heterotrimerní G proteiny..... | 11 |
| 2.2.3 Mechanismus aktivace a deaktivace G proteinů..... | 12 |
| 2.3 Regulace signálních drah GPCRs..... | 12 |
| 2.3.1 Regulátory asociované s G proteiny..... | 12 |
| 2.3.2 Aktivátory asociované s G proteiny..... | 14 |
| 2.4 Receptor pro tyreoliberin (TRH-R)..... | 15 |
| 2.4.1 Signální dráha TRH-R..... | 15 |
| 2.4.2 Typy TRH-R..... | 16 |
| 2.4.3 Struktura TRH-R..... | 17 |
| 2.4.4 Vazebné místo TRH-R..... | 19 |
| 2.4.5 Komplexy TRH-R..... | 20 |
| 2.5 Regulace na úrovni receptorů..... | 21 |
| 2.5.1 Kinázy receptorů spřažených s G proteiny..... | 21 |
| 2.5.2 β -Arrestin..... | 22 |
| 2.5.3 Desenzitizace TRH-R..... | 23 |
| 2.6 Efektory spojené se signalizací prostřednictvím TRH-R..... | 24 |
| 2.6.1 Adenylylcykláza..... | 24 |
| 2.6.2 Fosfolipáza C..... | 26 |
| 2.6.3 Ca^{2+} /kaldmodulin-dependentní proteinkináza..... | 27 |
| 2.6.4 Proteinkináza C..... | 28 |
| 2.6.5 Iontové kanály..... | 29 |
| 2.6.6 Mitogenem aktivované proteinkinázy..... | 29 |
| 2.7 Usměrňovací agonismus..... | 30 |
| 2.8 Ligandy TRH-R a důležitost jejich účinků pro farmakologii..... | 32 |
| 2.8.1 TRH..... | 32 |
| 2.8.2 Analogy TRH..... | 34 |
| 2.8.3 Antagonisté TRH-R..... | 34 |
| 2.8.4 Cytoprotektivní a neuroprotektivní účinky TRH a jeho analogů..... | 34 |
| 3. CÍLE PRÁCE..... | 37 |
| Cíl 1: Vliv vybraných signálních molekul na chování TRH receptoru v plazmatické membráně..... | 37 |
| Cíl 2: Vliv vybraných signálních molekul na funkční stav signalizace TRH receptoru..... | 37 |
| Cíl 3: Vliv aktivace TRH receptoru na redoxní rovnováhu, stav mitochondrií, cytoprotekci..... | 37 |
| Cíl 4: Role β -arrestinu v signalizaci řízené TRH receptorem | 37 |
| 4. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Seznam publikací souvisejících s disertační prací..... | 38 |
| 4.2 Další publikace..... | 38 |
| 4.3 Podíl na publikacích použitých pro sepsání disertační práce..... | 39 |
| 5. METODICKÁ ČÁST PRÁCE..... | 40 |
| 5.1 Materiál..... | 40 |
| 5.2 Tvorba buněčné linie TRY-1..... | 40 |
| 5.2.1 Konstrukce plazmidu..... | 40 |
| 5.2.2 Polymerázová řetězová reakce | 40 |
| 5.2.3 Transformace a sekvenování..... | 41 |
| 5.2.4 Transfekce a sorting..... | 41 |
| 5.3 Real-time PCR..... | 42 |
| 5.3.1 Izolace RNA..... | 42 |
| 5.3.2 Reverzní transkripce..... | 42 |
| 5.3.3 Real-time PCR..... | 42 |
| 5.4 Ligandy..... | 43 |
| 5.5 siRNA inhibice..... | 43 |
| 5.6 Příprava vzorků pro elektroforetické metody..... | 44 |
| 5.7 SDS-PAGE elektroforéza a imunobloting..... | 44 |
| 5.8 FRAP experimenty..... | 45 |
| 5.9 Kultivace buněčných kultur..... | 46 |
| 5.10 Měření vápníkových odpovědí..... | 46 |
| 5.11 Detekce IP ₃ metodou HTRF..... | 47 |
| 5.12 Detekce cAMP metodou HTRF..... | 48 |
| 5.13 Oxygrafické stanovení spotřeby kyslíku..... | 48 |
| 5.14 MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay..... | 49 |
| 5.15 FACS..... | 49 |
| 5.16 Stanovení MTT | 49 |
| 5.17 Stanovení LDH | 50 |
| 5.18 Měření celkové antioxidační kapacity..... | 50 |
| 5.19 Fosfoproteomická analýza..... | 50 |
| 5.20 Analýza dat..... | 51 |
| 6. VÝSLEDKY..... | 52 |
| 6.1 Cíl 1: Vliv vybraných signálních molekul na chování TRH receptoru v plazmatické membráně...52 | |
| 6.1.1 Charakterizace TRY-1 buněčné linie..... | 52 |
| 6.1.1.1 Porovnání exprese TRH-R pomocí real-time PCR..... | 52 |
| 6.1.1.2 Porovnání exprese TRH-R pomocí imunoblotingu..... | 53 |
| 6.1.1.3 Mikroskopická analýza..... | 53 |
| 6.1.1.4 Cytoplazmatická koncentrace vápenatých iontů..... | 54 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.1.2 | Vliv TRH na laterální mobilitu TRH-R..... | 55 |
| 6.1.3 | Vliv vybraných signálních molekul na laterální mobilitu TRH-R..... | 57 |
| 6.1.3.1 | Ověření siRNA inhibice..... | 57 |
| 6.1.3.2 | Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na laterální mobilitu TRH-R v plazmatické membráně..... | 57 |
| 6.2 | Cíl 2: Vliv vybraných signálních molekul na funkční stav signalizace TRH receptoru..... | 60 |
| 6.2.1 | Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii TRY-1..... | 60 |
| 6.2.2 | Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii E2..... | 68 |
| 6.2.3 | Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci IP ₁ | 71 |
| 6.2.3.1 | Analýza hladin G _q α a G ₁₁ α proteinů u E2 buněčné linie..... | 76 |
| 6.2.4 | Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a ligandů TRH-R na intracelulární koncentraci cAMP..... | 77 |
| 6.2.5 | Vliv ligandů TRH-R na expresi ERK1/2 a Akt..... | 81 |
| 6.3 | Cíl 3: Vliv aktivace TRH receptoru na redoxní rovnováhu, stav mitochondrií, cytoprotekci..... | 83 |
| 6.3.1 | Celková antioxidační kapacita..... | 83 |
| 6.3.2 | Vliv TRH a TAL na energetický metabolismus..... | 86 |
| 6.4 | Cíl 4: Role β-arrestinu2 v TRH receptorem řízené signalizaci: Vliv inhibice β-arrestinu2 na signalizaci malých GTPáz a MAP kináz..... | 92 |
| 6.4.1 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ras..... | 92 |
| 6.4.2 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rho..... | 99 |
| 6.4.3 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rac..... | 102 |
| 6.4.4 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Cdc42..... | 105 |
| 6.4.5 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Arf..... | 108 |
| 6.4.6 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rab..... | 111 |
| 6.4.7 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ral..... | 115 |
| 6.4.8 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ran..... | 117 |
| 6.4.9 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rap..... | 118 |
| 6.4.10 | Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze β- <i>kateninu</i> | 120 |
| 7. | DISKUZE..... | 123 |
| 8. | ZÁVĚR..... | 133 |
| 9. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 135 |
| 10. | PŘÍLOHY – SEZNAM PUBLIKACÍ <i>IN EXTENSIO</i>..... | 171 |
| 10.1 | Příloha A..... | 172 |
| 10.2 | Příloha B..... | 180 |

Seznam zkratek

| | |
|------------------|--|
| Aak1 | kináza asociovaná s adaptorovým proteinem |
| Abl2 | tyrozinová proteinkináza, <i>Abelson tyrosine-protein kinase 2</i> |
| ABTS | 2,2-azino-di-3-ethylbenzthiazolin sulfonát |
| AC | adenylylcykláza |
| Afdn | afadin |
| Agfgl | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf, <i>ArfGAP with FG repeats 1</i> |
| AGS | aktivátor G proteinové signalizace |
| Akt | proteinkináza B |
| AMPK | 5'-adenosinmonofosfátem-aktivovaná proteinkináza |
| AP-2 | adaptorový protein 2 |
| Arf1 | ADP-ribozilační faktor 1 |
| Arfgap | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf |
| Arfgef | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Arf |
| Arfip1 | s ADP-ribozilačním faktorem interagující protein 1 |
| Arhgap | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rho |
| Arhgef | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rho |
| Arap1 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf, <i>ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1</i> |
| Asap1 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf, <i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1</i> |
| Asap2 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf, <i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2</i> |
| ATP | adenosintrifosfát |
| β-Arr | β-Arrestin |
| Bcr | protein s GAP i GEF aktivitou vůči monomerním G proteinům |
| Bin1 | adaptorový protein, <i>bridging integrator 1</i> |
| Btbd8 | BTB doménu obsahující protein 8, AP-2 interakční protein |
| Ca ²⁺ | vápenaté ionty |
| CaMK | Ca ²⁺ /kalmmodulin dependentní proteinkináza |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát |
| CaN | kalcineurin |
| Cblb | E3 ubiquitin-protein ligáza |
| Cdc42 | monomerní G protein, <i>cell division control protein 42 homolog</i> |

| | |
|-----------|--|
| Cdc42bpa | serin/threoninová proteinkináza, <i>Cdc42 binding protein kinase alpha</i> |
| Cdc42bpb | serin/threoninová proteinkináza, <i>Cdc42 binding protein kinase beta</i> |
| Cdc42ep4 | Cdc42 efektorový protein 4 |
| Cdk4 | cyklin-dependentní kináza 4 |
| cDNA | komplementární DNA |
| cGMP | cyklický guanosinmonofosfát |
| CNKSR1 | protein interagující s kinázovým supresorem Ras 1, <i>connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1</i> |
| CN-PAGE | nativní polyakrilamidová gelová elektroforéza, <i>clear-native PAGE</i> |
| CNS | centrální nervový systém |
| CREB | protein vázající se na cAMP-responzivní element |
| Crk | adaptorový protein |
| Csnk2b | kaseinkináza 2 β |
| <i>D</i> | difúzní koeficient |
| Dab2ip | Ras GTPázu aktivující protein, protein interagující s adaptorovým proteinem Dab2 |
| Dact3 | protein <i>Dishevelled binding antagonist of beta catenin 3</i> |
| DAG | 1,2-diacylglycerol |
| Dclk1 | serin/threoninová proteinkináza, <i>doublecortin-like kinase 1</i> |
| Dennd1a | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rab, <i>DENN domain containing 1a</i> |
| Dennd4c | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rab, <i>DENN domain containing 4c</i> |
| Dennd5a | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rab, <i>DENN domain containing 5a</i> |
| Dennd6a | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rab, <i>DENN domain containing 6a</i> |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's médium |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DN-1417 | gama-butyrolakton-gama-karbonyl-histidyl-prolinamid citrát, analog TRH |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| Dock | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>dedicator of cytokinesis</i> |
| Dvl | <i>Dishevelled</i> , cytoplazmatické fosfoproteiny zapojené ve Wnt signalizaci |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EGFR/ErbB | receptor pro epidermální růstový faktor |
| EL1-3 | extracelulární smyčky receptoru, <i>extracullular loops</i> |
| ERK1/2 | extracelulárním signálem regulovaná kináza, izoforma 1/2 |

| | |
|----------------------|---|
| ERK5 | extracelulárním signálem regulovaná kináza, izoforma 5 |
| FACS | průtoková cytometrie; fluorescence-activated cell sorting |
| Farp | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein</i> |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| FCCP | karbonylkyanid p-trifluoromethoxyfenylhydrazon |
| FRAP | navrácení fluorescence po fotovybělení, <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> |
| FRET | fluorescenční rezonanční přenos energie |
| Gab2 | s Grb2 asociovaný vazebný protein 2 |
| GABA | kyselina γ -aminomáselná |
| Gak | kináza asociovaná s cyklinem G |
| GAP | GTPázu urychlující protein |
| Gapvd1 | GAP a VPS9 domény obsahující protein |
| Gbfl | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1</i> |
| GDI | <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> |
| GDP | guanosindifosfát |
| GEF | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů |
| GH1 | klonální kmen nádorových buněk hypofýzy potkana |
| Git1 | GTPázu urychlující protein, <i>G protein-coupled receptor kinase-interactor 1</i> |
| Git2 | GTPázu urychlující protein, <i>G protein-coupled receptor kinase-interactor 2</i> |
| GPCR | receptor spřažený s G proteinem |
| Grb2 | protein vázaný na receptor růstového faktoru, <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GRK | kinázy receptorů spřažených s G proteiny |
| GSK3 β | kináza glykogensyntázy 3 β |
| GTP | guanosintrifosfát |
| H ₂ DCFDA | 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát |
| HEK293 | buněčná linie kultivovaná z lidských embryonálních ledvinových buněk |
| HPT osa | osa hypotalamus-hypofýza-štítná žláza |
| HTRF | homogenní časově rozlišená fluorescence |
| IL1-3 | intracelulární smyčky receptoru, <i>intracellular loops</i> |
| IP ₁ | D-myo-inositol 1-fosfát |
| IP ₃ | inositol-1,4,5-trifosfát |

| | |
|---------------|---|
| Itsn | intersektin |
| JNK | Jun aminoterminální kináza |
| Kalrn | kalirin RhoGEF kináza |
| KSR1 | kinázový supresor Ras 1 |
| KSR2 | kinázový supresor Ras 2 |
| Lamtor1 | pozdní endozomální/lysozomální adaptér, aktivátor MAPK a MTOR 1 |
| Lats1 | kináza <i>large tumor suppressor kinase 1</i> |
| LB médium | Luria Bertani médium |
| LDH | laktátdehydrogenáza |
| μ-OR | μ-opioidní receptor |
| Madd | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G proteiny z rodiny Rab, <i>Map kinase-activating death domain protein</i> |
| MAPK | mitogenem aktivovaná proteinkináza |
| MAP2K | kináza MAPK |
| MAP3K | kináza kinázy MAPK |
| Marcks | substrát pro proteinkinázu C, <i>myristoylated alanine rich protein kinase C substrate</i> |
| Mcf2l | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>MCF.2 cell line derived transforming sequence like</i> |
| MDL | midazolam |
| MEK1/2 | proteinkináza s duální specificitou, izoforma ½, MAP2K |
| Mf | mobilní frakce |
| MK-771 | L-pyro-2-aminoadipyl-histidyl-thiazolidin-4-karboxamid, analog TRH |
| MPP+ | 1-methyl-4-phenylpyridinium |
| mTORC1 | komplex savčí serin/threoninové kinázy, <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1</i> |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid |
| Mycbp2 | atypická E3 ubiquitin-proteinligáza, <i>myc-binding protein 2</i> |
| Myo9b | myozin 9B |
| Nf1 | neurofibromin 1 |
| NP-647 | L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-ProNH(2), analog TRH |
| NS-3 | N[[[(3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorfolinyl]karbonyl]-L-histidyl-L-prolinamid tetrahydrát, analog TRH |
| one-way ANOVA | jednofaktorová analýza rozptylu |
| OXPHOS | oxidativní fosforylace |
| p38/SAPK | stresem aktivovaná proteinkináza |
| Pak1 | p21/Cdc42/Rac1-aktivovaná kináza 1 |

| | |
|-----------------------|---|
| Pak2 | p21/Cdc42/Rac1-aktivovaná kináza 2 |
| Pak6 | p21/Cdc42/Rac1-aktivovaná kináza 6 |
| PBS | fosfátový pufr |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| Pdzd8 | protein obsahující PDZ doménu, <i>PDZ domain containing 8</i> |
| PI3K | fosfoinositid 3-kináza |
| PI(4,5)P ₂ | fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát |
| PKA | cAMP-dependentní proteinkináza, proteinkináza A |
| Pkn1 | proteinkináza N1 |
| PKC | proteinkináza C |
| PLC | fosfolipáza C |
| PLCδ1 | fosfolipáza C δ1 |
| PNS | postnukleární supernatant |
| PP II | pyroglutamylaminopeptidáza II |
| Prex2 | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac Exchange factor 2</i> |
| Prkaa1 | α1 katalytická podjednotka 5'-adenosinmonofosfátem-aktivované proteinkinázy |
| Prkab1 | β1 podjednotka 5'-adenosinmonofosfátem-aktivované proteinkinázy |
| Prkar1a | α1 regulační podjednotka 5'-adenosinmonofosfátem-aktivované proteinkinázy |
| Prkar2a | α2 regulační podjednotka 5'-adenosinmonofosfátem-aktivované proteinkinázy |
| Prkar2b | β2 regulační podjednotka 5'-adenosinmonofosfátem-aktivované proteinkinázy |
| Prkcd | proteinkináza Cδ |
| Prkce | proteinkináza Cε |
| Prkd1 | proteinkináza D1 |
| Prkd2 | proteinkináza D2 |
| PRL | prolaktin |
| Psen-1 | presenilin-1 |
| Ptk2b | proteintyrozinkináza 2β |
| Rab3ip | s Rab3 proteinem interagující protein |
| Rab11fip1 | s Rab11 proteinem interagující protein 1 |
| Rab11fip5 | s Rab11 proteinem interagující protein 5 |
| Rabep | rabaptin |
| Rabgap1 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |

| | |
|----------------|--|
| Radil | Rap efektor, <i>Rap associating with DIL domain</i> |
| Raf-1/cRaf1 | serin/threoninová proteinkináza |
| Ralbp1 | RalA vázající protein 1 |
| RalGAPa1 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G protein Ral, katalytická podjednotka $\alpha 1$ |
| RalGAPa2 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G protein Ral, katalytická podjednotka $\alpha 2$ |
| RalGAPb | GTPázu urychlující protein pro monomerní G protein Ral, nekatalytická podjednotka β |
| Ralgps2 | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G protein Ral |
| Ranbp | protein vázající Ran |
| RanGAP1 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Ran |
| Rap1gap | GTPázu urychlující protein pro monomerní G protein Rap |
| Rapgef | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů pro monomerní G protein Rap |
| Rassf5 | protein obsahující Ras asociační doménu |
| RGH 2202 | L-pyro-2-aminoadipyl-L-leucil-L-prolinamid, posatirelin, analog TRH |
| RGS | regulátor G proteinové signalizace |
| Ric-8 proteiny | proteiny tzv. rezistence vůči inhibitorům cholinesteráz |
| Riok2 | serin/threoninová proteinkináza RIO2 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| Rock | serin/threoninová proteinkináza, <i>rho-associated coiled-coil-containing proteinkinase</i> |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| Rps6ka3/RSK | ribosomální s6 kináza |
| Rreb1 | Ras responzivní element vazebný protein-1 |
| Scrib | scaffold protein <i>Scribble</i> |
| SDS-PAGE | polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného |
| Sipa1 | mitogenem indukovaný GTPázu urychlující protein, <i>signal-induced proliferation-associated protein 1</i> |
| Sipa111 | <i>signal-induced proliferation-associated 1 like 1</i> |
| Sipa113 | <i>signal-induced proliferation-associated 1 like 3</i> |
| siRNA | malé interferující RNA |
| Smap2 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Arf, <i>stromal membrane-associated GTPase-activating protein 2</i> |
| Snrk | serin/threoninová proteinkináza, <i>sucrose nonfermenting (SNF)-related kinase</i> |

| | |
|---------------|---|
| Sos1 | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>Son of sevenless homolog 1</i> |
| Src | tyrozinová proteinkináza, <i>sarcoma</i> |
| Srpk1 | serin/argininová proteinkináza 1 |
| Srpk2 | serin/argininová proteinkináza 2 |
| Stk3 | serin/threoninová proteinkináza 3 |
| TAL | taltirelin |
| Tbc1d4 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |
| Tbc1d9b | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |
| Tbc1d10a | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |
| Tbc1d10b | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |
| Tbc1d25 | GTPázu urychlující protein pro monomerní G proteiny z rodiny Rab |
| <i>t</i> -BHP | <i>tert</i> -butyl hydroperoxid |
| TEAC | antioxidační kapacita ekvivalentní k troloxu |
| Tiam1 | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů, <i>T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i> |
| TM1-7 | transmembránové domény |
| Tnik | proteinkináza <i>TRAF2 and NCK-interacting protein kinase</i> |
| Tnks1bp1 | tankyrázu 1 vázající protein 1 |
| TRH | tyreoliberin |
| TRH-R | receptor pro tyreoliberin |
| Trio | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů |
| TRY-1 | HEK293 buňky stabilně exprimující dlouhou izoformu potkaního TRH-R1 s navázaným žlutým fluorescenčním proteinem |
| TSH | tyreotropní hormon |
| Ulk1 | kináza <i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i> |
| Vav2 | faktor pro výměnu guaninových nukleotidů |
| Vrk3 | Vrk serin/threoninová kináza 3, <i>Vaccinia related kinase 3</i> |
| Wnk2 | serin/threoninová proteinkináza, <i>WNK lysine deficient protein kinase 2</i> |
| Wnt | glykoprotein, <i>Wingless/Int-1</i> |
| YFP | žlutý fluorescenční protein |
| YM-14673 | N alfa-[[S]-4-oxo-2-azetidiny]karbonyl]-L-histidyl-L-prolinamid dihydrát, azetirelin, analog TRH |

1. Úvod

Receptory spřažené s G proteiny jsou nejpočetnější a zároveň fyziologicky velice významnou rodinou evolučně příbuzných proteinů vyskytujících se v plazmatických membránách buněk většiny eukaryot, jejichž společným znakem je sedm transmembránových α -helixů. Odpovídají na širokou škálu různých signálů z vnější strany membrány a přes asociaci s G proteiny spouští rozličné signalizační dráhy uvnitř buněk. Mezi tyto proteiny se řadí i receptor pro tyreoliberin (TRH-R), který po aktivaci vykazuje své účinky primárně přes spřažení s $G_{q/11\alpha}$ proteinem. Jsou ale i jisté náznaky, že by stimulace TRH-R mohla vést k asociaci s jinými G proteiny a k aktivaci mnohem širšího spektra biologických procesů.

Velmi diskutovaným tématem posledních 20 let je takzvaný usměrňovací agonismus. Tento fenomén je založen na schopnosti ligandů po vazbě na receptor měnit jeho konformaci a řídit signalizaci buď přes G proteiny nebo na G proteinech nezávislou cestou, přes β -arrestin. β -Arrestiny jsou velmi zajímavé molekuly, které byly primárně studovány v souvislosti s regulací funkce receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs), s jejich desenzitizací a internalizací. Dnes se ale už ví, že úloha těchto cytozolárních proteinů je daleko sofistikovanější a že β -arrestiny mohou mít nezastupitelnou roli jako signální molekuly v mnoha signalizačních drahách. Z důvodu, že pro TRH-R je dosud znám pouze jediný přirozený agonista, tyreoliberin (TRH), nebyl pro tento receptor usměrňovací agonismus prozatím objeven.

TRH je hormon důležitý pro správné fungování řady fyziologických procesů. Jednak stimuluje tvorbu tyreotropního hormonu a tím také základních hormonů štítné žlázy, dále také reguluje uvolňování prolaktinu, ovlivňuje široké spektrum metabolických procesů a má významnou roli také v centrálním nervovém systému (CNS). Právě díky svým účinkům na CNS je TRH považován za látku s velkým potenciálem pro terapeutické aplikace v kontextu různých neuropatologií. Nicméně pro své vedlejší účinky a krátký poločas života je snaha o nalezení nového terapeutika, které by splňovalo kladné vlastnosti TRH a vykazovalo minimální nežádoucí vedlejší účinky. V souvislosti s tím je právě kladen velký potenciál do procesu usměrňovacího agonismu.

Dosud je pouze málo dostupných informací o molekulárních mechanismech neuroprotektce spojených se signalizací TRH-R. Buněčná signalizace je vysoce koordinovaný proces, který, aby správně fungoval, musí být náležitě regulovaný. Jakákoliv odchylka v chování receptoru v membráně, v přítomnosti nebo množství signálních molekul v cytoplazmě a další odlišnosti mohou vést k aktivaci zcela odlišných procesů. Hlavním cílem této disertační práce tedy bylo zjistit, zda a jaké klíčové proteiny zapojené v signalizaci TRH-R mohou usměrňovat jeho chování v plazmatické membráně, ale také řízení signálních procesů vzhledem k různým efektorovým proteinům.

2. Literární přehled

2.1 Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s G proteiny jsou jednou z největších a nejvýznamnějších skupin proteinů vyskytujících se v genomu obratlovců. Bylo prokázáno, že více než 800 lidských genů kóduje právě GPCRs (Bjarnadottir *et al.*, 2006). Skupina těchto proteinů je důležitá zejména kvůli svému zapojení v signálních drahách souvisejících s mnoha onemocněními, jako jsou různé kardiovaskulární, metabolické, smyslové, imunologické či duševní poruchy, ale například i rakovina (Cosin-Roger *et al.*, 2020; Gnad *et al.*, 2020; Nemet *et al.*, 2020). I přes to, že jsou všechny tyto receptory velmi různorodé ve struktuře i funkci, stále sdílejí některé společné konstrukční prvky, na základě kterých se dají třídit.

2.1.1 Klasifikace GPCRs

Existují dva základní systémy pro klasifikaci GPCRs. Nejčastěji používaný klasifikační systém třídí GPCRs do šesti skupin značených A-F. Jsou zde zahrnuty všechny GPCRs obratlovců i bezobratlých. Receptory jsou zde řazeny do skupin na základě sekvenční homologie a funkčních vlastností. Skupina A je největší z nich a zahrnuje rhodopsin a jemu podobné receptory, skupinu B tvoří receptor pro sekretin a další velké peptidy, do skupiny C se řadí metabotropní glutamátové receptory, do skupiny D receptory pro feromony hub, skupinu E tvoří receptory pro cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a skupinu F receptory frizzled/smoothened (Davies *et al.*, 2007).

Další klasifikační systém značený GRAFS třídí GPCRs pouze lidského genomu do pěti hlavních skupin: **g**lutamátová, **r**hodopsinová, **a**dhesion, **f**rizzled/taste2 a **s**ekretinová skupina. Receptory jsou tímto systémem tříděny na základě fylogenetické příbuznosti (Fredriksson *et al.*, 2003). Systém třídění podle GRAFS, příklady zástupců a charakteristika jednotlivých skupin GPCRs je znázorněna v tabulce 1.

GPCRs asociují na vnitřní straně buněčné membrány s G proteiny, jejichž prostřednictvím ovlivňují vnitrobuněčnou signalizaci.

Tab. 1: Třídění, nejznámější zástupci a stručná charakteristika jednotlivých skupin GPCRs podle systému GRAFS

| Skupina | Zástupci - příklady | Charakteristika |
|------------------|--|---|
| Glutamátová | metabotropní glutamátové receptory, GABA receptory, chuťový receptor typu 1 (TAS1), receptor citlivý na vápník | dlouhý N-konec obsahuje ligand-rozpoznávající doménu, fylogenetická příbuznost s receptory pro feromony (V2R) |
| Rhodopsinová | opioidní receptory, chemokinové receptory, čichové receptory, purinergní receptory, TRH receptor , receptory biogenních aminů | největší skupina, 13 podskupin, krátký N-konec, velká diverzita ligandů |
| Adhesion | CD97, GPR56, GPR126, GPR133 | 33 zástupců, dlouhý N-konec bohatý na Ser a Thr obsahuje širokou škálu strukturálních domén, strukturálně podobné sekretinové skupině |
| Frizzled/taste 2 | frizzled receptor, chuťový receptor typu 2 (TAS2) | 11 frizzled receptorů, 30 TAS2 receptorů, specifická exprese během embryonálních vývojových stádií živočichů |
| Sekretinová | receptor pro vazoaktivní intestinální peptid (VIPR), PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) receptor | 15 zástupců, dlouhý N-konec bohatý na Cys můstky, váží velké peptidové ligandy |

Vytvořeno podle Schioth a Fredriksson, 2005. CD97, „cluster of differentiation 97“; GABA, kyselina γ -aminomáselná; GPR56, receptor spřažený s G proteiny 56; GPR126, receptor spřažený s G proteiny 126; GPR133, receptor spřažený s G proteiny 133; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; TAS1, chuťový (taste) receptor 1; TAS2, chuťový (taste) receptor 2; VIPR, receptor pro vazoaktivní intestinální peptid.

2.2 G proteiny

G proteiny se dají rozdělit na dvě hlavní skupiny: heterotrimerní G proteiny, tvořené podjednotkami α , β a γ a monomerní G proteiny, které sdílejí sekvenční homologii s α podjednotkou heterotrimerních G proteinů.

2.2.1 Monomerní G proteiny neboli malé G proteiny

Skupina malých GTPáz je konzervovaná napříč eukaryoty. Na základě strukturálních, sekvenčních a funkčních vlastností se jednotliví zástupci dají rozdělit do pěti rodin: Ras, Rho (**R**as **h**omology), Rab (**R**as-like in **b**rain), Arf (**A**DP-**r**ibosylation **f**actor) a Ran (**R**as-like **n**uclear GTPázy). Jedná se o cytozolární proteiny, které fungují jako molekulární přepínače, dokáží vázat

guanosintrifosfát (GTP) a hydrolyzovat ho na guanosindifosfát (GDP). Regulují širokou škálu buněčných procesů, zejména buněčný růst a přežívání, buněčnou migraci, diferenciaci a vezikulární či jaderný transport. Rozdělení jednotlivých skupin malých GTPáz s jejich nejběžnějšími zástupci a biologickou rolí je znázorněno v tabulce 2.

Tab. 2: Rodiny malých GTPáz: seznam nejnámějších zástupců a jejich biologická role

| GTPáza | Zástupci | Biologická funkce | Literatura |
|----------|--|--|--|
| Ras | 36 členů H-Ras, K-Ras, N-Ras, Rap, R-Ras, Ral, Rheb | buněčná signalizace, růst a přežívání buněk, proliferace a diferenciaci buněk | Kinbara <i>et al.</i> , 2003; Wennerberg <i>et al.</i> , 2005 |
| Rho | 20 členů RhoA, Rac1, Cdc42 | regulace aktinového cytoskeletu, buněčná migrace, diferenciaci, mitóza, proliferace, nádorové bujení, apoptóza | Nobes a Hall, 1995; Subauste <i>et al.</i> , 2000; Haga a Ridley, 2016 |
| Rab | 61 členů Rab1-45 (s výjimkou Rab16) | tvorba váčků, jejich transport i splývání váčků s membránou | Hutagalung a Novick, 2011; Pfeffer, 2017 |
| ARF/SARA | 27 členů Arf1-9, Arl1-8, Arp, Sar1 | vezikulární transport, regulace cytoskeletu, sekrece proteinů, migrace nádorových buněk | Chavrier a Goud, 1999; Pasqualato <i>et al.</i> , 2002; Yorimitsu <i>et al.</i> , 2014; Nacke <i>et al.</i> , 2021; Nakano a Muramatsu, 1989; Casalou <i>et al.</i> , 2016; Lu <i>et al.</i> , 2001 |
| Ran | 1 člen Ran | membránový transport přes jadernou membránu, kontrola buněčného cyklu | Boudhraa <i>et al.</i> , 2020; Dasso, 2002 |

Počty členů jednotlivých GTPáz převzaty z Wennerberg *et al.*, 2005.

2.2.2 Heterotrimerní G proteiny

Heterotrimerní G proteiny jsou membránově asociované proteiny, které společně tvoří signalizační komplex. Jak bylo napsáno výše, jedná se o komplex tvořený podjednotkami α , β a γ .

G proteiny se dají třídit podle typu $G\alpha$ podjednotky. Je známo přibližně 20 různých $G\alpha$ podjednotek, které jsou na základě sekvenční homologie klasifikovány do čtyř hlavních rodin: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ a $G_{12/13}$.

Do skupiny G_s se řadí dva proteiny, $G_{s\alpha}$ a $G_{o1f\alpha}$, jejichž aktivace má za následek stimulaci enzymu adenylylcykláza (AC). Druhá rodina je tvořena čtyřmi proteiny, které inhibují AC ($G_{i/o\alpha}$,

$G_{z\alpha}$) a nebo aktivují fosfodiesterázu ($G_{t\alpha}$, $G_{\text{gust}\alpha}$). Další rodinou jsou $G_{q/11}$ proteiny ($G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$, $G_{16\alpha}$), které po své aktivaci řídí signální transdukcí enzymu fosfolipázy C. Poslední skupinu tvoří rodina $G_{12\alpha}$ a $G_{13\alpha}$ proteinů, které aktivují Rho GTPázy (shrnuto v Milligan a Kostenis, 2006).

V lidském genomu je obsaženo 5 genů kódujících $G\beta$ a 14 genů kódujících $G\gamma$ podjednotky (shrnuto v Milligan a Kostenis, 2006). Také $G\beta\gamma$ komplex má svou roli v procesech buněčné signalizace. Signalizace prostřednictvím tohoto komplexu je velmi různorodá, neboť bylo prokázáno, že $G\beta\gamma$ komplex se účastní regulace různých efektorů, ať už iontových kanálů (Ikeda, 1996; Logothetis *et al.*, 1987), regulace AC (Tang a Gilman, 1991), nebo například spouští fosforylaci extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK1/2) (Saroz *et al.*, 2019).

2.2.3 Mechanismus aktivace a deaktivace G proteinů

Vazba ligandu na GPCR indukuje výměnu GDP za GTP na $G\alpha$ podjednotce heterotrimerního G proteinu. $G\alpha$ podjednotka je poté uvolněna od $G\beta\gamma$ dimeru. Jak $G\alpha$, tak $G\beta\gamma$ dimer představují samostatné signální jednotky a aktivují celou řadu signálních drah svou interakcí s různými efektorovými molekulami (například výše zmíněné fosfodiesterázy, proteinkinázy, adenylylcyklázy, fosfolipázy, iontové kanály a další). Délka signálu je regulována vnitřní GTPázovou aktivitou $G\alpha$ podjednotky, která ukončí její aktivitu hydrolyzováním GTP na GDP a volný anorganický fosfát a vede k opětovnému spojení s $G\beta\gamma$ dimerem.

2.3 Regulace signálních drah GPCRs

Signalizace prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny je významná pro velké množství fyziologických procesů, jejichž dysregulace může mít za následek vznik různých závažných chorob/poruch. Proto je potřeba, aby byly jednotlivé proteiny řádně regulovány. Regulace může probíhat jak na úrovni samotného receptoru, G proteinu nebo intracelulárních efektorových proteinů.

V následujících odstavcích/podkapitolách bude krátce shrnuta regulace na úrovni post-receptorové, a to jak na úrovni G proteinů tak na úrovni jednotlivých efektorů.

2.3.1 Regulátory asociované s G proteiny

Existují tři základní regulační mechanismy pro G proteiny. Za prvé, ligandem obsazené GPCRs na buněčné membráně zahajují nástup signálu tím, že působí jako tzv. výměnné faktory guaninových nukleotidů („guanine nucleotide exchange“, GEF), a tedy katalyzují disociaci GDP z G proteinu. Díky tomu dojde k vazbě volného GTP z cytoplasmy na G protein a aktivaci příslušných signálních kaskád. Za druhé, GTPázu urychlující proteiny (GAP) regulují rychlost hydrolyzy GTP a tedy délku signálu a za třetí, $G\beta\gamma$ komplex funguje jako „guanine nucleotide

dissociation“ inhibitor (GDI), protože napomáhá uchycení $G\alpha$ podjednotky k receptoru a brání spontánnímu uvolnění GDP.

GTPázová aktivita $G\alpha$ podjednotky je obecně spíše pomalá, může být však urychlena dalšími proteiny. Mezi nejdůležitější proteiny aktivující GTPázovou aktivitu patří regulátory G proteinové signalizace (RGS). Ty přímo interagují s $G\alpha$ podjednotkami (přednostně třídy G_i , G_q a $G_{12/13}$) a vedou k rychlému ukončení signálu. Je ale také známo, že RGS proteiny mohou přímo či nepřímo působit i na samotné GPCRs (Neitzel a Hepler, 2006). Mohou se svým N-koncem vázat na intracelulární části receptoru (Bernstein *et al.*, 2004; Hague *et al.*, 2005), nebo mohou interagovat s jeho C-koncovou částí (Georgoussi *et al.*, 2006). RGS proteiny mohou dokonce tvořit signalizační komplexy s GPCRs a $G\alpha$ (Ghil *et al.*, 2014) nebo také interakci s různými efekty regulovat například signalizaci mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK) (Miao *et al.*, 2016). Z toho plyne, že RGS proteiny mohou zastávat rozmanité funkce v buněčné signalizaci.

U savců bylo identifikováno asi 20 různých RGS proteinů, které jsou značeny čísly RGS1-21, s vynecháním čísla 15. Všechny tyto proteiny definuje přibližně 120 aminokyselin dlouhá RGS doména, zodpovědná za vazbu na $G\alpha$ podjednotku a urychlení hydrolýzy GTP. Kromě této domény mohou některé RGS proteiny obsahovat i jiné domény, například N- a C-koncové vazebné domény. Ty mohou zvyšovat selektivitu jednotlivých RGS pro určitý G protein (shrnutí v De Vries *et al.*, 2000).

RGS proteiny je možné rozdělit do několika podskupin na základě podobnosti jejich RGS domén. Do podskupiny A/RZ patří tři členové, RGS17, 19 a 20, o relativně malé velikosti (20-30 kDa). Jsou tvořeny RGS doménou a N-koncovou doménou, jejíž cysteinové zbytky mohou být palmitoylovány. Díky dalším motivům mohou vázat například tzv. scaffold proteiny a interagovat s multiproteinovými signalizačními komplexy. Pro dva zástupce, RGS17 a 20, bylo definováno možné propojení s μ -opioidním receptorem (μ -OR) (Garzon *et al.*, 2005a, b).

Další podskupinu B/R4 tvoří proteiny velikostí podobné předchozí skupině, jmenovitě RGS1-5, 8, 13, 16, 18 a 21. Obsahují RGS doménu a krátké N- a C-koncové části. Zástupci této skupiny modulují velkou řadu různých efektorů. Například je znám vliv RGS2, 3, 4 a 13 na $G_s\alpha$ a $G_i\alpha$ podjednotky G proteinů modulující aktivitu AC (Berman a Gilman, 1998). RGS2 pravděpodobně přímo interaguje jak s $G_s\alpha$, tak s AC. Pro inhibiční působení na AC typu V se zdá být zásadních 19 aminokyselin v N-koncové části tohoto regulátoru, které interagují s C1 doménou AC (Salim *et al.*, 2003). Tyto regulátory, RGS2, 5 a 8, jsou zapojeny do inaktivace dovnitř usměrňujícího draselného kanálu (Herlitze *et al.*, 1999), zatímco RGS7, zástupce následující skupiny, se podílí na jeho aktivaci (Saitoh *et al.*, 1999). S regulací $G_q\alpha$ -říděné vápníkové signalizace jsou spojeny RGS1, 2, 4 a 16 (Xu *et al.*, 1999). RGS2, 3 a 4 se účastní regulace aktivity enzymu fosfolipázy $C\beta$ (PLC β). V případě RGS4 byl prokázán možný mechanismus této regulace, kdy tvorbou komplexů spolu s $G_q\alpha$, $G\beta\gamma$ a PLC β může tento regulátor pohotově zastavit počínající signalizaci (Dowal *et al.*, 2001). Ale regulační mechanismus pro PLC β signalizaci je pro jednotlivé

RGS proteiny pravděpodobně odlišný (Anger *et al.*, 2004). Předchozí tři RGS proteiny (RGS2, 3 a 4) také inhibují signalizaci iniciovanou zástupci receptorů spřahujících se s $G_{q/11\alpha}$ proteiny, a to muskarinovým M3 receptorem a receptorem pro gonadoliberin (Karakoula *et al.*, 2008). Co se týče dvou vysoce příbuzných $G_{q/11\alpha}$ proteinů, je všeobecně známo, že některé RGS jsou schopny mezi nimi rozlišovat a účinněji regulovat jen jeden z nich. Kupříkladu RGS5 a 16 snáze inhibují $G_q\alpha$ než $G_{11\alpha}$ protein (Ladds *et al.*, 2007). Známa je i studie, která popisuje regulaci signalizace TRH-R prostřednictvím RGS proteinů. Bylo zjištěno, že v případě obou typů TRH-R (TRH-R1 i TRH-R2) může být signalizace inhibována RGS4, ale nikoli RGS7, 9 nebo 19 (Harder *et al.*, 2001b).

RGS6, 7, 9 a 11, zástupci podskupiny C/R7, obsahují ve své struktuře kromě RGS domény další dvě funkční domény. Jednou z nich je $G\gamma$ -like doména, která je schopna vytvářet stabilní komplex s $G\beta_5$ podjednotkou či interaguje s dalšími proteiny. Druhou doménou je Disheveled/EGL-10/Plextrin homologní (DEP) doména, která váže syntaxinu podobné proteiny, jako jsou vazebný protein R7 a protein asociovaný s RGS9 (Abramow-Newerly *et al.*, 2006).

Podskupinu D/R12 tvoří celkem tři zástupci. Dva z nich, RGS12 a 14 jsou relativně velké proteiny skládající se z více domén. Kromě RGS domény mají například $G\alpha$ -vazebnou doménu, tzv. GoLoco motiv, který inhibuje disociaci GDP z $G\alpha$ podjednotky. Některé sestříhové varianty RGS12 mohou obsahovat PDZ doménu, stejně jako zástupci A/RZ skupiny. Třetí člen této skupiny je RGS10, který se strukturou podobá proteinům ze skupiny B/R4. Příslušníci této skupiny jsou schopny interakce s řadou enzymů a různých proteinů, kupříkladu s PLC β nebo napětím ovládanými vápníkovými kanály, a tím regulují jejich aktivitu (Abramow-Newerly *et al.*, 2006).

Skupina, značená E/RA, sdružuje dva proteiny, axin a konduktin, které sice sdílejí podobnou sekvenci s RGS proteiny, ale nebyla u nich prokázána GAP aktivita, ani schopnost vázat $G\alpha$ podjednotku. Zástupci této skupiny patří ke klíčovým regulátorům Wnt signální dráhy (Bernkopf *et al.*, 2019).

Další třídění RGS proteinů je na skupiny F/GEF, G/GRK a H/SNX. Tyto skupiny zahrnují členy Rho GEF, kinázy receptorů spřahovaných s G proteiny (GRK) a „sorting“ nexin (SNX), které také vlastní RGS doménu. Další dva proteiny, RGS22 a D-AKAP2, nejsou zařazeny do žádné skupiny, protože obsahují více RGS domén (Willars, 2006). Také pro některé efekторы G proteinů bylo prokázáno, že mohou urychlovat GTPázovou aktivitu. Například fosfodiesteráza cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) může kromě své úlohy při štěpení cGMP urychlovat hydrolyzu GTP na G proteinu fotoreceptorů, transducinu (Arshavsky a Bownds, 1992). I klíčový efektor signalizace TRH-R, PLC β , vykazuje GAP aktivitu na $G_q\alpha$ proteinu (Biddlecome *et al.*, 1996).

2.3.2 Aktivátory asociované s G proteiny

Aktivátory G proteinové signalizace (AGS) mění aktivitu G proteinů nezávisle na GPCR. Mohou sloužit také jako náhradní vazební partneři podjednotek jednotlivých G proteinů. Je možné

je rozdělit do čtyř skupin v závislosti na jejich funkčních vlastnostech a schopnosti interakce s určitými G proteiny.

První skupinu tvoří několik proteinů, které fungují jako GEF faktory, slouží k zesílení signalizace, neboť jsou zodpovědné za výměnu GDP za GTP na $G\alpha$ podjednotkách G proteinů. Patří sem AGS1 (RASD1), který interaguje s vybranými G proteiny, jmenovitě $G_i\alpha$, $G_o\alpha$ a $G_{i/o}\alpha\beta\gamma$ proteiny (Cismowski *et al.*, 2000). Dále se sem řadí dva proteiny tzv. rezistence vůči inhibitorům cholinesteráz (Ric)-8A a Ric-8B. Ric-8A přednostně moduluje aktivitu $G_i\alpha$, $G_o\alpha$, $G_q\alpha$ a $G_{13\alpha}$ proteinů, Ric-8B ovlivňuje aktivitu $G_s\alpha$ a $G_{olf}\alpha$ proteinů (Tall *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2011a, b). GIV protein, známý také jako Girdin, aktivuje signalizaci od $G_i\alpha$ a $G_s\alpha$ proteinů (Le-Niculescu *et al.*, 2005; Garcia-Marcos *et al.*, 2009). Blíže příbuzná této skupině, s níž sdílí 62% podobnost, je malá GTPáza Rhes (RASD2) exprimovaná preferenčně ve striatu (Vargiu *et al.*, 2004). Tento aktivátor urychluje přenos signálu přes $G_i\alpha$ podjednotky G proteinů (Harrison a He, 2011). Za zmínku stojí, že zástupci této skupiny se účastní regulace enzymů jako jsou AC či MAPK ERK1/2 (Graham *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2006; Harrison a He, 2011).

Do druhé skupiny náležejí proteiny, které obsahují 1-4 regulační motivy sloužící pro vazbu G proteinů. Jsou to zejména AGS3-6, GTPázu aktivující protein Rap1Gap, RGS14 a tzv. „Purkinje cell“ protein 2 (PCP2/L7). Tyto proteiny působí jako GDI, tedy stabilizují konformaci G proteinů s navázaným GDP na jejich α podjednotce. Mohou vázat jak různé $G\alpha$ podjednotky, tak $G\beta\gamma$ komplex (Takesono *et al.*, 1999). V rámci různých $G\alpha$ podjednotek G proteinů interagují kupříkladu s $G_i\alpha$, $G_o\alpha$ a $G_{i/o}\alpha$ proteiny a o svou vazbu na tyto proteiny soupeří s $G\beta\gamma$ dimerem (Cao *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že zástupci této skupiny mohou ovlivňovat spřažení mezi GPCR a G proteiny (Ma *et al.*, 2003).

Následující skupina sdružuje proteiny, které interagují přednostně s $G\beta\gamma$ dimery, ale mohou se vázat i s různými $G\alpha$ podjednotkami či dokonce s celým komplexem $G\alpha\beta\gamma$ (Yuan *et al.*, 2007). Patří sem čtyři členové, AGS2 a AGS7-9. Díky své interakci s $G\beta\gamma$ dimery ovlivňují tyto AGS vazbu s $G\alpha$ proteinem a napomáhají tak signalizaci skrz komplex $G\beta\gamma$ (Sato *et al.*, 2006).

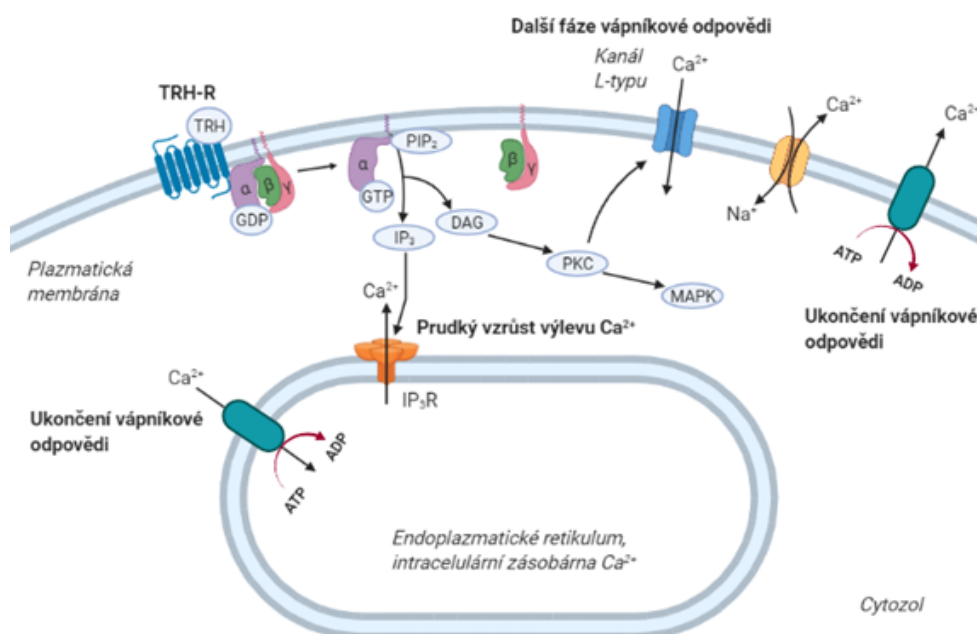
Poslední, relativně nová skupina AGS proteinů spojuje AGS 11-13 a transkripční faktory s motivem helix-smyčka-helix. Tyto proteiny ovlivňují signální dráhy směřující od $G_{16\alpha}$ proteinu (Sato *et al.*, 2011).

2.4 Receptor pro tyreoliberin (TRH-R)

2.4.1 Signální dráha TRH-R

TRH-R patří do velké a fyziologicky velmi významné skupiny GPCRs, v rámci níž se klasifikuje do skupiny A, stejně jako například rhodopsin. Tento receptor se vyskytuje převážně v membráně tyreotropních buněk předního laloku hypofýzy, ale byl identifikován i v jiných buněčných typech (Gershengorn a Osman, 1996). TRH-R se nachází v genetické informaci od ryb

až po člověka (Harder *et al.*, 2001a), což dokazuje důležitost tohoto proteinu pro všechny obratlovce, savce nevyjímaje. Vazba hormonu na TRH-R, který signalizuje přes $G_{q/11\alpha}$ protein, vede k aktivaci PLC β . Tento enzym katalyzuje hydrolytické štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PI(4,5)P₂) na dva důležité druhé posly, inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ řídí uvolňování vápníku (Ca²⁺) z vnitřních zásobáren buňky a dále vede k asociaci proteinkinázy C (PKC) s membránou, její interakci s DAG a její následné aktivaci. Zvýšená koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky a aktivovaná PKC pak uvede v činnost příslušné efektorové systémy, které mohou v různých buňkách vést k odlišným buněčným odpovědím (např. aktivace mitogenem aktivovaných protein kináz či regulace iontových kanálů) (Hinkle *et al.*, 2012; Kanasaki *et al.*, 2015; Joseph-Bravo *et al.*, 2016). Schéma signální dráhy TRH-R je shrnuto na obr. 1.



Obr. 1: Regulace výlevu vápníku. Vazba TRH na TRH-R aktivuje štěpení PIP₂ na IP₃ a DAG. IP₃ následně řídí výlev Ca²⁺ z intracelulárních zásobáren. Zvýšené hladiny Ca²⁺ v cytozolu jsou poté regulovány pomocí vápníkových pump umístěných jednak na plazmatické membráně a jednak na membráně endoplazmatického retikula. Za regulaci cytoplazmatického Ca²⁺ jsou zodpovědné také ionotropní vápníkové kanály typu L v souhře s Na⁺/Ca²⁺ výměníkem. Upraveno podle Nelson a Hinkle, 1994a, b; Hinkle *et al.*, 2012.

2.4.2 Typy TRH-R

V různých živočišných druzích byly postupně identifikovány 3 typy TRH-R: TRH-R1-3. Zatímco v lidské DNA je obsažen pouze jeden gen kódující jeden TRH-R, pojmenovaný TRH-R1, ostatní savci exprimují další typ tohoto receptoru, TRH-R2. U ptáků byl identifikován třetí typ receptoru pro TRH, TRH-R3 (Li *et al.*, 2020a).

Předpokládá se, že jednotlivé varianty TRH-R mohou mít odlišnou fyziologickou roli, neboť ačkoliv TRH-R1 i TRH-R2 spouští stejnou signalizaci, tak jsou odlišně distribuovány v mozku a na periférii (O'Dowd *et al.*, 2000). Zdá se, že TRH-R1 spíše zprostředkovává neuroendokrinní odpověď a TRH-R2 moduluje výlev neurotransmiterů. Bylo také prokázáno, že ačkoli mají oba tyto typy TRH-R podobnou vazebnou afinitu, TRH-R2 vykazuje vyšší bazální signalizační aktivitu než TRH-R1 (Wang a Gershengorn, 1999) a je po vazbě TRH rychleji internalizován a výrazněji downregulován (O'Dowd *et al.*, 2000).

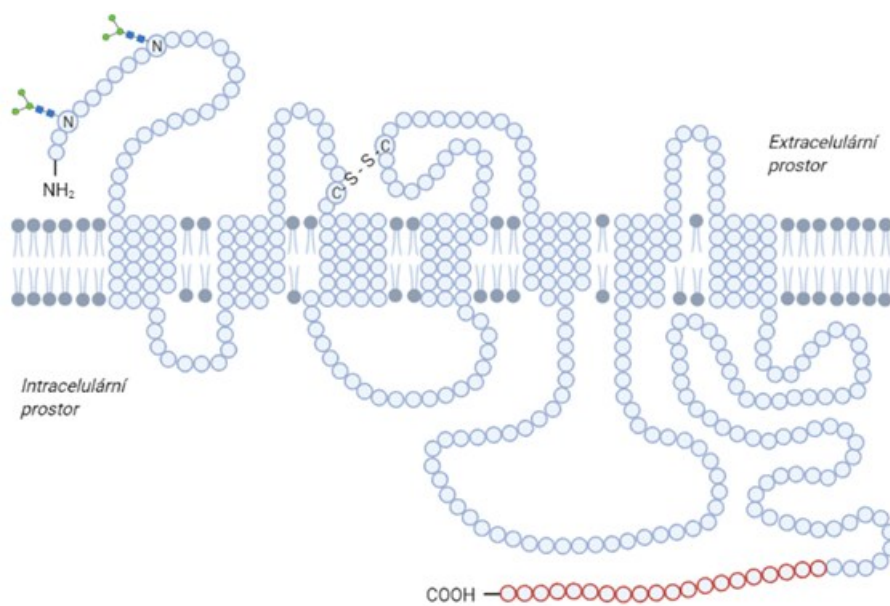
2.4.3 Struktura TRH-R

TRH-R se řadí do stejné třídy GPCRs spolu s rhodopsinem a adrenergními receptory. Právě popsání krystalové struktury rhodopsinu, modelového GPCR, poskytlo důležité informace vedoucí k porozumění mezi strukturou a funkcí u tohoto a dalších GPCRs. TRH-R spolu s ostatními členy této skupiny GPCRs sdílí stejnou strukturu: extracelulární N-konec, 7 transmembránových helixových domén (TM1-7), tři extracelulární (EL1-3) a tři intracelulární smyčky (IL1-3) a cytoplazmaticky orientovaný C-konec. Schematické znázornění struktury TRH-R je znázorněno na obr. 2.

Rovněž rhodopsin byl první, u kterého byl popsán molekulární mechanismus aktivace přirozenými agonisty. Po stimulaci dochází v molekule receptoru ke konformačním změnám v cytoplazmatických částech helixů 2, 3, 5 a 6 a jednotlivé helixy se vůči sobě natočí tak, že dojde k odhalení zbytků zásadních pro vazbu G proteinu (v případě rhodopsinu se jedná o transducin) (shrnuto v Okada *et al.*, 2001). To platí i v případě TRH-R, kdy cytoplazmatická oblast TM6 po vazbě TRH rotuje a oddálí se od TM5. V důsledku toho se změní oblast v okolí IL3 a dojde k odhalení dalších, jinak skrytých domén TRH-R, potřebných například pro vazbu G proteinu (Huang *et al.*, 2005).

V rámci skupiny receptorů spřažených s G proteiny se v jejich struktuře nachází mnoho konzervovaných zbytků. Je všeobecně přijímáno, že právě tyto konzervované části mají důležitou roli pro správnou funkci receptorů. Například se předpokládá, že tři vysoce konzervované aminokyseliny, Asn43 (z TM1), Asp71 (z TM2) a Asn316 (z TM7) spolu interagují a tyto interakce jsou klíčové pro aktivaci TRH-R, ačkoli nejsou součástí vazebného místa pro TRH (Perlman *et al.*, 1997a).

Extracelulární smyčky patří k zásadní části receptoru zodpovědné za první interakci s ligandem. V jejich rámci se nachází několik aminokyselinových zbytků, které váží TRH a tvoří „vstupní kanál“ do vazebného místa pro hormon (Perlman *et al.*, 1997b). Kromě toho všechny GPCRs sdílí dva cysteinové zbytky Cys98 (EL1) a Cys179 (EL2), které jsou propojeny disulfidovou vazbou. V případě TRH-R je cysteinový můstek zodpovědný za správnou, vysokoafinitní konformaci receptoru, ale nehraje roli v jeho aktivaci (Perlman *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1996).



Obr. 2: Struktura TRH-R. TRH-R je tvořen 7 transmembránovými helixy, extracelulárně orientovaným N-koncem a intracelulárně orientovaným C-koncem. Extracelulární a intracelulární smyčky propojují transmembránové domény. Asn3 a Asn10 jsou glykosylovány, Cys98 a Cys179 jsou propojeny disulfidovou vazbou. Dvacet C-koncových aminokyselin (znázorněny červeně) chybí v krátké formě sekvence myšičího TRH-R. C, Cys, cystein; N, Asn, asparagin; -S-S-, disulfidový můstek. Upraveno podle Straub *et al.*, 1990; Han a Tashjian, 1995b.

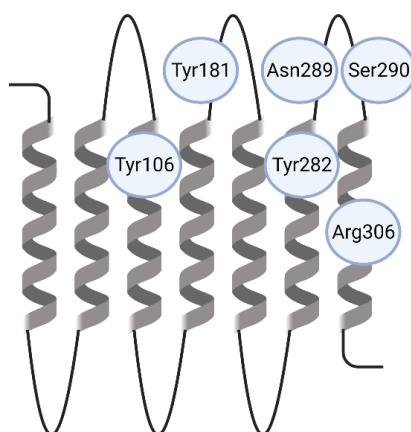
Intracelulární část GPCR je klíčovým prvkem v signální transdukcii, neboť umožňuje molekulární rozpoznání a navázání různých signalizačních molekul jako jsou G proteiny, kinázy nebo arrestiny. TRH-R má na svém cytoplazmatickém konci NPxxY motiv, který spojuje TM7 s amfipatickým helixem. Tento helix, značený helix 8, je umístěn rovnoběžně s povrchem cytoplazmatické membrány, k membráně je zakotven prostřednictvím dvou palmytoilovaných cysteinových zbytků a je kladně nabitý (Du *et al.*, 2005). Po aktivaci ligandem se helix 8 významně posouvá a pozitivně nabitě zbytky helixu 8 hrají rozhodující roli ve fosforylaci receptoru (Gehret *et al.*, 2010). Helix 8 spojuje membránovou doménu receptoru s jeho C-koncovou částí. C-konec receptoru je znám zejména pro svou úlohu v interakci s molekulou arrestinu, desenzitizaci a internalizaci receptoru (viz níže).

V GH3 buňkách byly identifikovány dvě sestřihové varianty TRH-R, které se liší délkou sekvence v C-koncové části receptoru o 52 párů bází (de la Peña *et al.*, 1992). Tato delece nemá vliv na způsob přenosu signálu, obě varianty TRH-R aktivují stejnou signalizační dráhu zahrnující stimulaci TRH, spřažení s $G_{q/11\alpha}$ proteinem, a následnou tvorbu IP_3 a výlev vápníku z intracelulárních zásobáren (Lee *et al.*, 1995).

2.4.4 Vazebné místo TRH-R

Do dnešní doby nejsou molekulární interakce ligandů se svými GPCRs detailně popsány a zcela pochopeny. K předvídání struktury jednotlivých GPCRs a snazšímu porozumění jak a kam se ligandy na molekulu receptoru váží a jakým způsobem jsou receptory aktivovány slouží kombinace metody molekulárního modelování a experimentálního pozorování.

V případě TRH-R a jeho vazebného partnera TRH byla provedena rozsáhlá analýza vazebného místa v 90. letech 20. století. Vazebné místo bylo situováno mezi tři TM helixy – TM3, 5 a 6. Byla prokázána přímá interakce mezi pyroGlu z TRH a Tyr106 a Asn110, dvěma aminokyselinovými zbytky z TM3 TRH-R (Perlman *et al.*, 1994a, b). Následně byly identifikovány další dvě přímé interakce mezi TRH a TRH-R, a to jednak interakce mezi His v molekule TRH a Tyr282 z TM6 v molekule TRH-R a jednak interakce Arg306 z TM7 helixu receptoru s ProNH₂ ligandu (Perlman *et al.*, 1996). Vazebné místo pro TRH se zdálo být podobné místu pro vazbu malých nepeptidových ligandů. Toto tvrzení bylo ale brzy vyvráceno zjištěním, že pro vazbu TRH hrají důležitou roli také extracelulární části TRH-R. Pravděpodobně dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi N-koncovou částí TRH a Asn289 (spíše než Asn110) a Ser290 z EL3 v molekule TRH-R (Han a Tashjian, 1995a). Dále se His zbytek z molekuly TRH váže do místa v oblasti EL2 a horní části TM5 tvořeného zbytky Tyr188, Tyr192, Phe196 a Phe199 receptoru. V rámci C-koncové části TRH se předpokládá interakce (vodíkovými vazbami) se zbytky Tyr181 a Tyr93 opět z extracelulárních částí TRH-R (Han a Tashjian, 1995b). Schematická reprezentace struktury TRH-R s vyznačením jednotlivých aminokyselinových zbytků pravděpodobně zapojených ve vazbě TRH je znázorněna na obr. 3. Pro potvrzení některých známých interakcí mezi TRH-R a TRH či k identifikaci dalších skupin, které by se mohly potenciálně účastnit této vazby byla využita metoda molekulárního modelování vazebného místa na modelu myšního TRH-R (Laakkonen *et al.*, 1996).



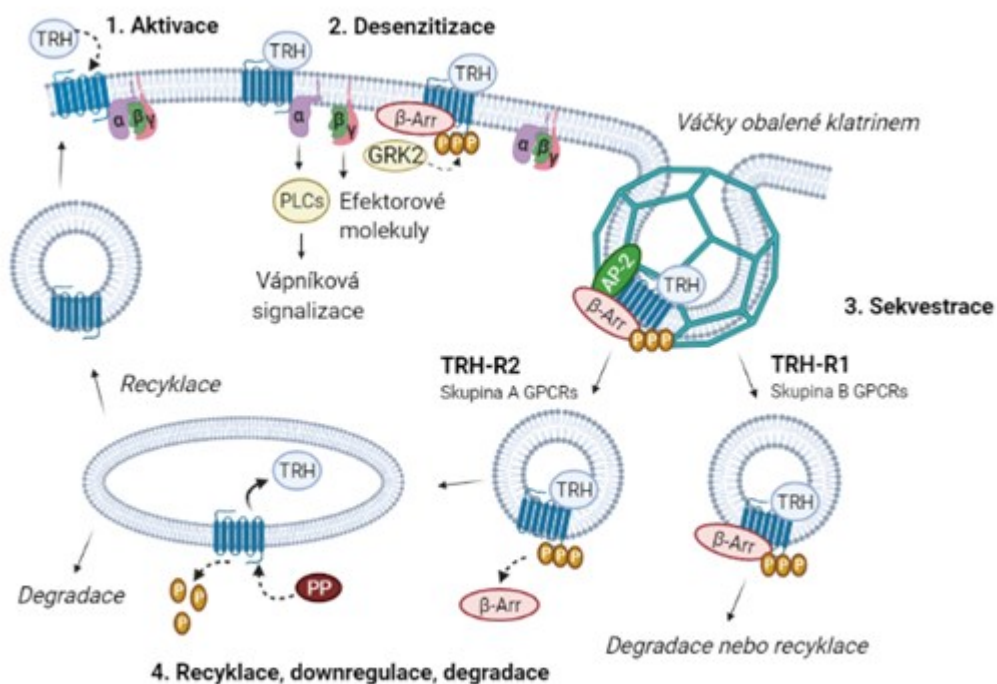
Obr. 3: Zjednodušený model TRH-R s vyznačenými aminokyselinovými zbytky potenciálně zapojenými ve vazbě TRH. Vytvořeno podle Perlman *et al.*, 1994a, b; Han a Tashjian, 1995a, b; Perlman *et al.*, 1996; Laakkonen *et al.*, 1996.

2.4.5 Komplexy TRH-R

Homo/heterodimerizace GPCRs a tvorba nových interakcí receptoru s intracelulárními proteiny je celkem běžný jev, který má významné důsledky pro regulaci buněčných událostí. Mnoho různých typů receptorů působí jako dimery, protože v tomto stavu mají jejich vazebná místa vysokou afinitu pro interakci s ligandem.

Proces dimerizace a tvorby komplexů s dalšími vazebnými partnery nastává i v případě TRH-R. Po stimulaci agonistou dochází k tvorbě komplexů jak s agonistou, G proteiny, tak například i s efektorovými enzymy jako je PLC (Nussenzveig *et al.*, 1993b). Další studie prokázala, že v průběhu internalizace nedochází k disociaci TRH-R a $G_{11\alpha}$ proteinu a obě molekuly internalizují společně v klathrinem obalených váčcích (Petrou a Tashjian, 1998). Prostřednictvím nativní gelové elektroforézy bylo zjištěno, že existují již předem vytvořené komplexy TRH-R s $G_{q/11\alpha}$ proteinem na membráně (Drastichova a Novotny, 2012b) a že vysokomolekulární komplexy $G_{q/11\alpha}$ po stimulaci TRH disociují a $G_{q/11\alpha}$ protein poté translokuje do cytozolu (Drastichova a Novotny, 2012a). Metodou bioluminiscenčního rezonančního přenosu energie (bioluminiscence resonance energy transfer, BRET) bylo zjištěno, že TRH-R tvoří homooligomerní komplexy i v nepřítomnosti ligandu (Kroeger *et al.*, 2001). Na druhou stranu bylo ale prokázáno, že přítomnost TRH zvyšuje tvorbu dimerů TRH-R (Zhu *et al.*, 2002). Regulovaná dimerizace TRH-R ukázala, že samotná dimerizace tohoto GPCR nestačí k aktivaci navazujících signálních drah, ale dimerní podoba TRH-R může mít určitou úlohu v internalizaci receptoru a endocytóze (Song a Hinkle, 2005). Je totiž známo, že dimerizací TRH-R se také umocňuje jeho fosforylace, tudíž dimerizace GPCRs může znamenat zásadní dopad na intenzitu a trvání transdukce signálu (Song *et al.*, 2007).

Různé podtypy TRH-R mohou v buňkách savců tvořit jak homooligomery, tak heterooligomery. Bylo pozorováno, že heterooligomery TRH-R1/TRH-R2 ovlivňují kinetiku internalizace, neboť TRH-R2 oproti TRH-R1 internalizuje pomaleji. Tato skutečnost souvisí s preferencí toho určitého subtypu receptoru pro molekulu arrestinu, kterou přednostně používají k internalizaci a zda internalizují s navázaným arrestinem či nikoliv. TRH-R1 využívá pro internalizaci stejně β -arrestin1 i β -arrestin2 a internalizuje společně s ním ve váčcích. Naproti tomu, TRH-R2 přednostně váže β -arrestin2, který ale po aktivaci receptoru není internalizován a zůstává na povrchu buňky (Hanyaloglu *et al.*, 2002). Odlišnosti v regulaci jednotlivých typů TRH-R jsou nastíněny na obr. 4. Tyto i další rozdíly, ať už v signalizaci nebo internalizaci, mohou mít velký význam při regulaci TRH-R1 a TRH-R2 a mohou hrát důležitou roli ve fyziologii.



Obr. 4: Cyklus TRH-R v buňce. Po aktivaci TRH-R dochází k disociaci $Gq_{11}\alpha$ od $G\beta\gamma$ komplexu a zahájení signalizace vedoucí k výlevu vápníku. Receptor je následně desenzitizován a signalizace ukončena fosforylací GRK2 a vazbou β -arrestinu (β -Arr). Arrestin jako adaptorový protein váže proteiny endocytárního aparátu (AP-2, klatrín) a receptor je sekvestrován v klatrínových váčcích. Internalizovaný TRH-R poté podstupuje další procesy s různou kinetikou v závislosti na typu TRH-R a interakci s β -arrestinem. Receptory řadí se do třídy „A“, kam patří například i TRH-R2, okamžitě po internalizaci disociují od β -arrestinu, TRH je odstraněn, receptor je defosforylován pomocí proteinfosfatázy (PP) a recyklován ve váčcích zpět k plazmatické membráně. Naproti tomu, TRH-R1 je představitel třídy „B“, jejíž zástupci internalizují spolu s β -arrestinem a tento komplex může být následně degradován nebo směřován k recyklaci do plazmatické membrány. Upraveno podle Luttrell a Lefkowitz, 2002; Hanyaloglu et al., 2002.

2.5 Regulace na úrovni receptorů

2.5.1 Kinázy receptorů spřažených s G proteiny

GRK jsou regulační proteiny, které hrají klíčovou roli v desenzitizaci GPCR. Proces desenzitizace je uskutečňován fosforylací aktivovaného receptoru těmito proteinkinázami na serinových a threoninových zbytcích. Bylo identifikováno celkem 7 typů GRK (GRK1-7). Jsou to solubilní proteiny, které používají několik mechanismů k tomu, aby se dostaly na membránu do blízkosti GPCR a G proteinů. Některé z nich k tomuto účelu využívají prenylaci (GRK1 a 7), jiné vazbu přes $G\beta\gamma$ komplex (GRK 2 a 3) a další z nich jsou palmitoylovány (GRK4, 5 a 6) (Gurevich a Gurevich, 2019).

Regulaci TRH-R zajišťuje zejména GRK2. Ta kromě své role v desenzitizaci receptoru také pravděpodobně přímo vazbou na aktivovanou $G_{q\alpha}$ podjednotku reguluje/inhibuje signalizaci směrem k efektorům (Sallese *et al.*, 2000). GRK2 dokonce dokáže při své interakci rozeznávat mezi členy skupiny $G_{q\alpha}$ proteinů (Day *et al.*, 2003). Jedná se o typickou kinázu tvořenou 689 aminokyselinami, které formují 3 strukturální domény: N-koncovou, katalytickou a C-koncovou doménu (Komolov a Benovic, 2017). Bylo dokázáno, že interakce mezi $G_{q\alpha}$ proteinem a GRK2 může být posílena fosforylací této kinázy c-Src kinázou na jejím tyrozinovém zbytku (Mariggio *et al.*, 2006). Vazebné místo pro interakci s $G_{q11\alpha}$ proteinem se patrně nachází v N-koncové doméně GRK2, která se strukturou podobá RGS doméně. Na rozdíl od ostatních RGS proteinů je však součástí vazebného místa nejspíš také C-konec helixu $\alpha 5$ (Sterne-Marr *et al.*, 2003).

Pomocí důkladné mutační analýzy plekstrin homologní domény GRK2 bylo odhaleno, že pro správnou fosforylací receptoru je důležitá interakce mezi kinázou, $G\beta\gamma$ dimerem a negativně nabitými membránovými fosfolipidy. V interakci GRK2 s volnými $G\beta\gamma$ podjednotkami jsou rozhodující Arg587, Lys663 a Lys665. Lys567, Trp576, Arg578 a Arg579 jsou naopak nezbytné pro vazbu s fosfolipidy (Carman *et al.*, 2000).

GPCRs mohou být fosforylovány i jinými kinázami, například cAMP-dependentní proteinkinázou či proteinkinázou C (Grimberg *et al.*, 1999).

2.5.2 β -Arrestin

Změny spojené s fosforylací receptoru vedou k navázání β -arrestinu. β -Arrestiny jsou cytosolické proteiny, které patří k nejdůležitějším regulačním molekulám. Tyto proteiny náleží do rodiny, která u savců obsahuje 4 typy arrestinů kódovaných různými geny. Skupina zrakových arrestinů zahrnuje arrestin1 obsažený v tyčinkách a arrestin4 v čípcích. Dalšími zástupci jsou arrestin2, známý jako β -arrestin1 a arrestin3, běžně označovaný jako β -arrestin2.

Po vazbě na fosforylovaný GPCR pak β -arrestiny slouží jako tzv. adaptéry, které propojují komplex s receptorem se součástmi endocytárního aparátu, tvořeného klatrinem a adaptorovým proteinem-2 (AP-2), a tím zastavují signalizaci. Tento popsáný proces představuje původní chápání funkce β -arrestinů jako molekul klíčových pro internalizaci receptoru. Dnes je však známo, že role β -arrestinu je mnohem rozmanitější. Tyto molekuly mohou mít řadu signálních funkcí. Například propojují Src kinázy s receptory (Luttrell *et al.*, 1999) či slouží jako tzv. lešení pro vazbu jednotlivých komponent MAPK kaskád, jako jsou Raf-1, MEK1 a ERK1/2 (Cassier *et al.*, 2017; Coffa *et al.*, 2011; Luttrell *et al.*, 2001). Bylo potvrzeno i zapojení β -arrestinu v jaderné signalizaci, kdy se po vazbě s dalšími proteiny přemisťuje do jádra a reguluje genovou expresi (Kang *et al.*, 2005; Rosano *et al.*, 2013).

2.5.3 Desenzitizace TRH-R

Desenzitizace na úrovni receptoru vede k poklesu citlivosti receptoru na stimulaci ligandem, chrání tak receptor před nadměrnou stimulací signální molekulou. V jejím důsledku může nastat downregulace, neboli snížení denzity receptorů v plazmatické membráně. Slouží buňce k regulaci odpovědi na širokou škálu stimulů. Jejím následkem je internalizace nadbytečných receptorů nebo snížení jejich produkce.

Pro procesy desenzitizace a internalizace je nezbytná fosforylace GPCR a navázání β -arrestinu. Jak bylo popsáno výše, β -arrestin přerušuje interakce mezi GPCR a G proteinem ukončí signalizaci. Receptor s navázaným ligandem a značený β -arrestinem je poté internalizován ve formě endozomu do cytoplazmy ve váčcích obalených klatrinem. Internalizovaný receptor může být následně recyklován zpět do plazmatické membrány nebo degradován.

I přesto, že dlouhé izofomy lidského a potkaního TRH-R1 sdílejí vysokou sekvenční podobnost, nejvíce se liší právě v C-koncové části, která je zásadní pro desenzitizaci receptoru. Nicméně ani tyto odlišnosti pravděpodobně nehrají roli v procesu desenzitizace tohoto receptoru, protože jak lidská forma, tak potkaní forma TRH-R jsou po vazbě ligandu velmi rychle (v řádech minut) desenzitizovány (Anderson *et al.*, 1995). Proces desenzitizace tohoto receptoru je uskutečňován výhradně GRK2. V C-koncové části TRH-R se nachází řada fosforylačních míst, kam se β -arrestin může navázat, přičemž velmi záleží, která oblast receptoru je fosforylována. Studie z roku 1993 uvádí dvě aminokyselinové sekvence v C-koncové části TRH-R, které se zdají být důležité pro internalizaci ligandem aktivovaného receptoru (Nussenzweig *et al.*, 1993a). První úsek se nachází v rozmezí aminokyselin 360-367, druhý ve své sekvenci zahrnuje cysteinové zbytky v oblasti 335-337. Právě druhá zmiňovaná aminokyselinová sekvence je zodpovědná také za sekvestraci funkčně nespřážených receptorů a brání konstitutivní internalizaci TRH-R (Petrou *et al.*, 1997). Na začátku nového tisíciletí byl proveden podrobný výzkum C-koncové oblasti TRH-R, ve kterém se určovalo, jaké další sekvence hrají roli v procesech desenzitizace a internalizace (Drmotá a Milligan, 2000; Groarke *et al.*, 2001). Jones se spolupracovníky vymezil oblast v molekule receptoru, do které se po vazbě agonisty váže β -arrestin (Jones *et al.*, 2007). TRH iniciuje fosforylaci mezi aminokyselinami 355 a 365, a 371 až 391. Fosforylace Thr365 se zdá být zásadní pro vazbu β -arrestinu, desenzitizaci i internalizaci TRH-R (Jones a Hinkle, 2008), nikoli však pro jeho defosforylaci (Jones a Hinkle, 2005). Podle další studie mají na fosforylaci a defosforylaci GPCR vliv i další oblasti receptoru mimo jeho C-konec (Gehret a Hinkle, 2010). Ačkoli je známo, že právě C-koncová oblast receptoru hraje klíčovou roli v regulaci GPCRs, molekulární mechanismy, které řídí procesy fosforylace a defosforylace, stále nejsou zcela objasněny.

Pro lepší pochopení procesů souvisejících s redistribucí a internalizací TRH-R a $G_{q11\alpha}$ proteinu po stimulaci hormonem byla použita vizualizace pomocí konfokální mikroskopie s aplikací dlouhé izofomy TRH-R1 značené fluorescenčním proteinem. Bylo zjištěno,

že po aktivaci receptoru dochází k jeho oddělení od $G_{q/11\alpha}$ a jeho rychlé internalizaci (Drmota *et al.*, 1998a; Drmota *et al.*, 1999). Původně se předpokládalo, že internalizovaný TRH-R je navracen na plazmatickou membránu do 20 minut od odstranění TRH (Ashworth *et al.*, 1995). Recyklace tohoto receptoru zpět na plazmatickou membránu však probíhá spíše v řádech několika hodin, a membrána je tedy v případě potřeby pravděpodobně doplněna novými receptory (Cook a Hinkle, 2004b). K resenzitizaci TRH-R, obnovení jeho citlivosti k další stimulaci, může dojít i bez jeho předchozí internalizace (Yu a Hinkle, 1998).

Ve srovnání s internalizací TRH-R, jsou internalizační procesy $G_{q/11\alpha}$ proteinu mnohem pomalejší (Drmota *et al.*, 1998b). Dále bylo popsáno, že po expozici TRH jsou jak $G_q\alpha$, tak $G_{11\alpha}$ protein downregulovány stejnoměrně (Kim *et al.*, 1994) a dochází ke změně v distribuci jak $G\alpha$, tak i $G\beta$ proteinů a k jejich downregulaci (Svoboda *et al.*, 1996). Dlouhodobá stimulace TRH dokonce ovlivňuje distribuci $G_{q/11\alpha}$ i v rámci různých domén plazmatické membrány (Pesanova *et al.*, 1999).

2.6 Efektory spojené se signalizací prostřednictvím TRH-R

V následujících podkapitolách budou představeny nejvýznamnější efekty související se signalizací TRH-R.

2.6.1 Adenylycykláza

AC jsou membránově vázané proteiny s charakteristickou strukturou. Jsou tvořené N-koncem, dvěma TM doménami (TM1 a TM2) a C-koncem. Každá TM doména se skládá ze šesti segmentů. TM1 a TM2 jsou propojeny intracelulární smyčkou rozdělenou na oblasti C1a a C1b. C-Konec je další intracelulární částí obsahující oblasti C2a a C2b. U savců bylo identifikováno 10 typů AC, značených AC I – AC X, všechny izoformy katalyzují přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cAMP, všudypřítomný druhý posel. Aktivovaná AC reguluje funkci cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA), která následně fosforyluje různé cílové proteiny (shrnuto v Taussig a Gilman, 1995).

Regulace těchto enzymů probíhá především prostřednictvím G proteinových podjednotek (zejména $G_s\alpha$ a $G_i\alpha$ proteiny), ale pravděpodobně mohou být regulovány i celou řadou jiných substancí, jako například působením $G\beta\gamma$ dimeru, Ca^{2+} ionty, či proteinkinázami. Právě těmito dalšími způsoby je umožněno modulovat funkci AC ligandům a receptorům, které primárně nesignalizují přes $G_s\alpha$ nebo $G_i\alpha$ proteiny. Přímá či nepřímá regulace AC je tedy možná i například prostřednictvím některých článků signalizační dráhy TRH-R. Například je známo, že cAMP ovlivňuje homeostázu Ca^{2+} , a stejně tak Ca^{2+} může přímo či nepřímo modulovat syntézu cAMP, tudíž se zde nabízí jeden z možných způsobů propojení signalizace TRH-R s působením AC.

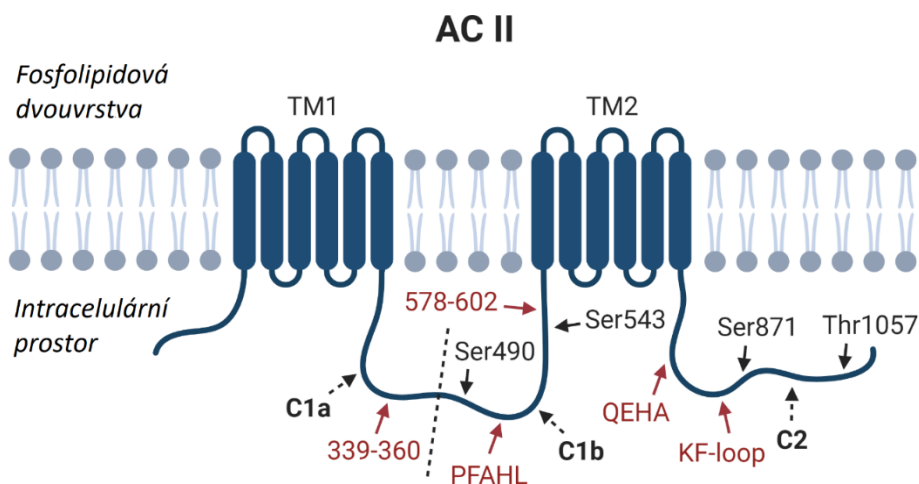
K získání správné buněčné odpovědi na určitý stimul je velmi důležité, aby byla signalizace prostřednictvím různých typů AC řádně regulována. Zatímco AC typu I, III a VIII jsou přímo

aktivovány submikromolárním množstvím Ca^{2+} vázaném na kalmodulin (CaM) (Mamluk *et al.*, 1999; Masada *et al.*, 2012), AC V a VI jsou ionty Ca^{2+} inhibovány (Hu *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2008). Byla také prokázána nepřímá inhibice AC I fosforylací Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinázou (CaMK) typu IV a AC III fosforylací CaMK typu II (Wayman *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998). Zároveň existují data, že určité typy AC (např. AC IX) mohou být fosforylací CaMKII naopak aktivovány (Cumbay a Watts, 2005), a inhibovány fosfatázou kalcineurinem (CaN) (Antoni *et al.*, 1998). AC II, IV a VII mohou být aktivovány $\text{G}\beta\gamma$ dimerem (Chakrabarti a Gintzler, 2003; Diel *et al.*, 2008; Marjamaki *et al.*, 1997; Weitmann *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 1996) či nepřímo regulovány PKC (Bol *et al.*, 1997a, b; Nelson *et al.*, 2003; Zimmermann a Taussig, 1996). Naopak AC I, III, VIII, obvykle aktivované Ca^{2+} /CaM, jsou $\text{G}\beta\gamma$ dimerem inhibovány (Diel *et al.*, 2006; Diel *et al.*, 2008; Steiner *et al.*, 2006).

Nejpodrobněji je prostudována regulace AC II (obr. 5). Tento enzym je regulovaný buďto fosforylací PKC nebo prostřednictvím $\text{G}\beta\gamma$ dimeru, jak bylo zmíněno výše. V případě regulace prostřednictvím PKC se fosforylační místa nacházejí v C-koncových doménách AC II. Patří mezi ně Ser871 a Thr1057 z C2 domény (Bol *et al.*, 1997a, b). Další předpokládaná místa fosforylace jsou součástí C1b cytoplazmatické domény, jedná se o Ser490 a Ser543 (Shen *et al.*, 2012). V rámci C-koncových domén také existuje několik oblastí, které se podílejí na interakci s $\text{G}\beta\gamma$. Součástí C2a domény je jednak oblast zvaná QEHA (Chen *et al.*, 1995) a dále oblast KF-loop (Diel *et al.*, 2008). V doméně C1b AC II je další významný region pro vazbu $\text{G}\beta\gamma$, motiv PFAHL (Diel *et al.*, 2006). Jsou známy ale i další oblasti pro možnou interakci AC II s $\text{G}\beta\gamma$ podjednotkami (Boran *et al.*, 2011).

V řadě studií bylo prokázáno, že receptory, které signalizují přes $\text{G}_q\alpha$ protein mohou ovlivňovat aktivaci různých typů AC. Například in vivo experimenty na buněčné linii HEK293 exprimující AC I ukázaly, že tato adenylycykláza je aktivována Ca^{2+} ionty nebo agonistou muskarinového receptoru, karcholem (Choi *et al.*, 1992; Wayman *et al.*, 1994). Ve stejné linii bylo dosaženo zvýšení cAMP po aktivaci AC typu VI (Beazely a Watts, 2005). Také prostanoidní receptory mají vliv na modulaci AC, zejména AC III (Mamluk *et al.*, 1999). V tomto případě se zdá být důležitá kooperace mezi jednotlivými signalizačními systémy, neboť právě ko-aktivace prostanoidního receptoru spřaženého s $\text{G}_q\alpha$ proteinem spolu s EP2 receptorem spřaženým s $\text{G}_s\alpha$ proteinem mění produkci cAMP díky propojení těchto dvou receptorů přes AC III (Abera *et al.*, 2010). Další propojení $\text{G}_q\alpha$ a $\text{G}_s\alpha$ signalizací, které ve výsledku vede ke zvýšení produkce cAMP, je prostřednictvím angiotensinových ($\text{G}_q\alpha$ -spřažených) a β -adrenergických ($\text{G}_s\alpha$ -spřažených) receptorů. Například angiotensin II moduluje v srdečních fibroblastech β -adrenergní signalizaci a tím tvorbu cAMP prostřednictvím AC III, působením přes receptor spřažený s $\text{G}_q\alpha$ a výlev Ca^{2+} iontů (Ostrom *et al.*, 2003). Po stimulaci V1 vazopresinového receptoru v buňkách hladkého svalstva cév dochází také ke zvýšení produkce cAMP přes stejný typ AC, tedy AC III (Zhang *et al.*, 1997). V případě AC II může také docházet k integraci signálů přenášených od různých G proteinů, kupříkladu signály vedoucí přes $\text{G}_s\alpha$ mohou být synergisticky zesíleny prostřednictvím signálů

transmitovaných přes $G_i\alpha$ (Federman *et al.*, 1992) a $G_q\alpha$ (Lustig *et al.*, 1993) a tím pádem mohou vést ke zvýšení syntézy cAMP. Na druhou stranu bylo také zjištěno, že aktivita AC II může být modulována kooperací signalizací vedoucích přes $G_i\alpha$ a $G_q\alpha$ nezávisle na signalizaci přes $G_s\alpha$ protein (Tsu a Wong, 1996). Zvýšení hladin cAMP prostřednictvím AC II aktivované signalizační dráhou muskarinového receptoru spřaženého s $G_q\alpha$ proteinem reguluje pravděpodobně komplex proteinů tvořený z PKC, PKA, PKA kotvícího proteinu 79 a fosfodiesterázy (Shen a Cooper, 2013).



Obr. 5: Znárodnění struktury AC s vyznačenými místy pro fosforylaci prostřednictvím PKC a pro vazbu $G\beta\gamma$ dimeru v C-terminálních doménách. Po aktivaci receptoru spřaženého s $G_{q/11}\alpha$ proteinem dochází k modulaci PKC, která aktivuje AC II a produkci cAMP. Fosforylační místa pro PKC v molekule AC II jsou znázorněna plnými černými šipkami. $G\beta\gamma$ reguluje funkci AC II vazbou do několika různých oblastí v C-terminálních doménách tohoto enzymu (vyznačeno červenými šipkami). AC II, adenylylcykláza typu 2; TM1/TM2, transmembránové domény; C1a/C1b/C2, intracelulární cytoplasmatické domény. Upraveno podle Bol *et al.*, 1997a, b; Shen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 1995; Diel *et al.*, 2006; Diel *et al.*, 2008; Boran *et al.*, 2011.

2.6.2 Fosfolipáza C

PLC je na vápníku závislá fosfodiesteráza, klíčový enzym zapojený v metabolismu fosfoinositidů. U savců bylo identifikováno přinejmenším 13 různých izoenzymů PLC, které jsou rozděleny do 6 tříd (β , γ , δ , ϵ , ζ , η) podle strukturní homologie. Všechny podtypy sdílejí společnou strukturu – N-koncovou plextrin homologní (PH) doménu, několik motivů EF-rukou, katalytickou doménu (TIM barel) a C-koncovou doménu. Přestože všechny PLC katalyzují stejnou reakci, každý izoenzym má svou vlastní fyziologickou úlohu a může být aktivován rozličnými molekulami, jako jsou Ca^{2+} ionty, heterotrimerické G proteiny i malé GTPázy či tyrozinkinázy (shrnuto v Kadamur a Ross, 2013).

V následujícím odstavci se budeme zabývat zejména studiemi týkajícími se PLC β , neboť TRH-R po stimulaci ligandem aktivuje právě tento subtyp PLC. V roce 1991 bylo zjištěno, že PLC β_1 je regulována pertusis toxin nesenzitivním G proteinem (Martin *et al.*, 1991). Velký

význam v regulaci PLC β má jejich unikátní struktura. Jejich C-koncová „coiled-coil“ doména, patrně důležitá pro dimerizaci a membránovou asociaci těchto enzymů (Ilkaeva *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2002), je oproti doménám dalších izotypů PLC prodloužena (Waldo *et al.*, 2010). Zároveň je součástí struktury všech PLC β smyčka mezi třetí a čtvrtou EF-rukou. Jedná se o sekvenci o osmi aminokyselinách, která má klíčovou úlohu v aktivaci GTPázové aktivity PLC β . Podle krystalové struktury komplexu PLC β a G $_{q\alpha}$ je pro hydrolyzu GTP nezbytná přímá interakce Asn260 právě z této smyčky PLC β a Gln209 ze struktury G $_{q\alpha}$ (Waldo *et al.*, 2010). I z toho důvodu, že sama PLC β může fungovat jako GTPáza je zřejmé, že regulační mechanismy mezi tímto enzymem a G $_{q\alpha}$ podjednotkou jsou mnohem sofistikovanější a složitější (Navaratnarajah *et al.*, 2017). Ve struktuře G $_{q\alpha}$ jsou obsaženy dva cysteinové zbytky (Cys9 a Cys10), které hrají roli v interakci jak s receptory, tak s efektory (Hepler *et al.*, 1996). Po stimulaci může G $_{q\alpha}$ navíc interagovat také s kaveolinem. Tato interakce ovlivňuje vazbu mezi G $_{q\alpha}$ a komplexem G $\beta\gamma$, tím reguluje aktivaci PLC β a tedy i dobu trvání výlevu vápníku (Sengupta *et al.*, 2008).

Nejen G $_{q\alpha}$, ale i komplex G $\beta\gamma$, se může účastnit regulace funkce PLC β . Přesný charakter interakce těchto dvou významných signalizačních molekul nebyl dosud objeven, nicméně z několika studií je patrné, že zpřístupnění vazebného místa pro G $\beta\gamma$ dimer zahrnuje kooperaci několika částí molekuly PLC β . Pokud je PLC β v takzvané otevřené konformaci, kdy je N-doména odchýlena od motivu EF-rukou, je vazebné místo pro G $\beta\gamma$ komplex přístupné (Kadamur a Ross, 2016). Kromě N-koncové PH domény může být součástí vazebného místa pro regulaci PLC β prostřednictvím G $\beta\gamma$ dimeru také část katalytické domény (Barr *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000a). U dalšího izoenzymu PLC, PLC ϵ , je pro přímý kontakt s komplexem G $\beta\gamma$ zapotřebí PH doména spolu s C-koncovou doménou (Madukwe *et al.*, 2018).

2.6.3 Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkináza

CaMK jsou Ser/Thr specifické proteinkinázy aktivované zvýšenou koncentrací intracelulárních Ca²⁺ iontů a kalmodulinu. Tyto enzymy jsou zodpovědné zejména za fosforylaci transkripčních faktorů. Na GH3 buněčné linii bylo prokázáno, že stimulace TRH a jím způsobený nárůst v koncentraci Ca²⁺ iontů uvnitř buňky může vést k aktivaci CaMK a následné fosforylaci proteinů (Drust a Martin, 1982; Jefferson *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 1994). Aktivovaná CaMK se pravděpodobně účastní regulace transkripce tyreotropního hormonu (TSH) a prolaktinu (PRL) (Muraio *et al.*, 2004). Inhibice CaMK snižuje schopnost TRH aktivovat prolaktinový promotor (Nowakowski *et al.*, 1997). Signalizace, kterou TRH reguluje transkripci PRL, zahrnuje Ca²⁺ a vápníkové kanály L-typu (Laverriere *et al.*, 1988). Tento hormon může navíc prostřednictvím vápníkových kanálů L-typu, PLC β , a CaMK modulovat svou aktivitu regulací enzymu aminopeptidázy PP II, který ho štěpí (Vargas *et al.*, 2002). V tomto ohledu je velmi důležitá koordinace jednotlivých procesů vedoucích od TRH k biosyntéze PRL či regulaci aktivity PP II.

Jeden z nejznámějších transkripčních faktorů, vazebný protein cAMP responzivního elementu (CREB), může být fosforylován řadou proteinkináz (Ca²⁺/kalmmodulin-dependentní proteinkinázu nevyjímaje) na pozici Ser133 v reakci na různé extracelulární signály a v závislosti na buněčném typu. Jsou známy přinejmenším dva různé receptory spřažené s G_{q/11α}, M₃ muskarinový acetylcholinový receptor a B₂ bradykininový receptor, které regulují fosforylaci transkripčního faktoru CREB. Přestože oba tyto receptory využívají signalizační dráhy zahrnující PKC a CaMK, B₂ bradykininový receptor navíc k regulaci CREB používá ERK1/2 signalizaci (Rosethorne *et al.*, 2008). Regulace transkripčních faktorů je pravděpodobně velmi komplexní a složitý proces, který zahrnuje zapojení více překrývajících se signálních drah.

2.6.4 Proteinkináza C

Tyto enzymy jsou další z rodiny Ser/Thr proteinkináz, které regulují funkci jiných proteinů prostřednictvím fosforylace hydroxylových skupin jejich Ser a Thr aminokyselinových zbytků. Existuje devět izoform PKC (α, β, γ, δ, ε, η, θ, ζ, ι), které jsou transkribovány ze samostatných oddělených genů a třídí se do tří skupin na základě toho, jaký typ druhého posla potřebují ke své aktivaci. Každá izoforma je odlišně exprimována v různých buněčných typech. Všechny izoformy opět sdílí podobnou strukturní architekturu, která sestává z regulační N-koncové domény a kinázové C-koncové domény. Regulační doména PKC má dvě důležité funkce. Jednak propojuje PKC s místem její činnosti (například s plazmatickou membránou) díky množství vazebných modulů pro druhé posly a další vazebné partnery. A dále je jejím úkolem regulovat katalytickou aktivitu PKC. K tomuto účelu obsahuje ve struktuře své N-koncové domény krátkou sekvenci, která napodobuje substrát (tzv. „pseudosubstrát“) a v přítomnosti podprahových hladin Ca²⁺ a DAG se váže do místa v katalytické doméně a tím udržuje enzym neaktivní (Dutil a Newton, 2000).

Fakt, že PKC zprostředkovává fosforylaci proteinů po stimulaci TRH je znám už dlouho (Drust a Martin, 1984). Isoforma PKCε je například po stimulaci TRH zodpovědná za fosforylaci Ser8 a Ser23 intermediárního filamenta, keratinu (Akita *et al.*, 2007). Vliv dlouhodobého působení TRH má za následek změny v distribuci PKC (α, β, δ a ε) z frakce solubilní do detergentem nerozpustné frakce a také způsobuje downregulaci PKCε bez vlivu na ostatní izoformy. V důsledku toho by právě PKCε mohla hrát velmi důležitou roli v regulaci transkripce genu pro prolaktin, protože právě downregulace tohoto izotypu PKC korespondovala s poklesem syntézy tohoto hormonu a akumulací DAG (Kiley *et al.*, 1990; Kiley *et al.*, 1991). Účinek TRH na prolaktinový promotor je tedy zřejmě závislý na DAG (Kiley *et al.*, 1991) a následné aktivaci PKC (Pickett *et al.*, 2002).

2.6.5 Iontové kanály

Je všeobecně známo, že TRH způsobuje bifázické změny elektrické aktivity, hladin vápníku uvnitř buňky či v sekreci prolaktinu. První fáze vápníkové odpovědi je vyvolána po aktivaci PLC, kdy dochází ke vzniku IP_3 a výlevu Ca^{2+} z vnitřních zásobáren, jak už bylo dříve řečeno. Toto zvýšení cytozolického Ca^{2+} má mimo jiné za následek aktivaci Ca^{2+} -aktivovaných draslíkových (K^+) kanálů, které způsobují hyperpolarizaci buňky díky ven směřujícímu proudu K^+ iontů. Existují 3 typy Ca^{2+} aktivovaných K^+ kanálů: vápníkem aktivované draslíkové kanály s vysokou vodivostí, vápníkem aktivované draslíkové kanály se střední vodivostí a nízkovodivostní draslíkové kanály aktivované vápníkem, přičemž všechny tři typy se nějakým způsobem podílejí na první fázi odpovědi na TRH (Mork *et al.*, 2005).

Předpokládalo se, že za druhou fázi zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů zodpovídá aktivace PKC prostřednictvím DAG, protože to má na svědomí podobné změny na membráně. Bylo však zjištěno, že PKC se této fázi neúčastní (Bauer *et al.*, 1994) a že její regulace by se mohl účastnit jiný druhý posel, například cAMP (Akerman *et al.*, 1991). Tato fáze je pravděpodobně velmi komplexní, je doprovázena depolarizací buňky vyvolanou inhibicí vápníkem aktivovaných draslíkových kanálů s vysokou vodivostí a napětově řízených draslíkových kanálů a zvýšením průtoku Ca^{2+} přes napětově řízené Ca^{2+} kanály v plazmatické membráně (Haug *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1992). K modulaci svého účinku na napětově řízené draslíkové kanály TRH nevyužívá $G_{q/11\alpha}$ protein, ale signalizace je nejspíše vedena přes G_s , G_{13} či dokonce $G\beta\gamma$ dimer s modulačním účinkem ERK a ribozomální s6 kinázy (RSK) (Miranda *et al.*, 2005; Carretero *et al.*, 2015).

2.6.6 Mitogenem aktivované proteinkinázy

MAPKs jsou evolučně konzervované specifické Ser/Thr proteinkinázy, které mohou být aktivovány širokou škálou podnětů. Tyto enzymy s využitím fosforylace regulují procesy jako je proliferace a diferenciaci buněk, regulace genové exprese nebo například apoptóza.

MAPK uzavírá fosforylační kaskádu složenou ze tří postupně aktivovaných proteinkináz, tvořenou kinázou kinázy MAPK (MAP3K), kinázou MAPK (MAP2K) a MAPK. Nejprve je aktivována MAP3K, nejčastěji interakcí s malou GTPázou (např. Ras protein) či fosforylací proteinkinázou. Ta poté aktivuje MAP2K, která následně aktivuje MAPK fosforylací na konzervovaném motivu TxY v aktivačním segmentu kinázy. Aktivovaná MAPK fosforyluje cílové proteiny v cytozolu nebo jádře na Ser/Thr zbytcích a tím mění jejich funkci a genovou expresi (shrnutí v Keshet a Seger, 2010). Pro zvýšení efektivity přenosu signálu mezi jednotlivými členy kaskády a zamezení interakcí se souběžnými kaskádami se jednotlivé kinázy mohou vázat na různé takzvané „scaffoldy“ (např. molekulu arrestinu), které fungují jako lešení a funkčně oddělují paralelní kaskády. Svou roli mají MAPK například v endocytóze, kdy bylo prokázáno, že po internalizaci komplexu receptoru a β -arrestinu2 mohou tyto kinázy fosforylovat Thr178

v molekule β -arrestinu2 a tak řídit endozomální procesy (Khoury *et al.*, 2014). MAPK mohou vedle této funkce sloužit také jako negativní regulátory signalizace prostřednictvím GPCR. Bylo zjištěno, že kináza ERK1/2 fosforyluje Ser14 a Thr276 v molekule β -arrestinu2 ve výsledku způsobuje redistribuci GPCR z membrány a vede tak k utlumení signalizace (Paradis *et al.*, 2015).

MAPK lze v rámci třídy savců rozdělit do tří skupin, na extracelulárním signálem regulované kinázy, ERK, Jun aminotermínální kinázy (JNK) a stresem aktivované proteinkinázy (p38/SAPK). Aktivace jednotlivých MAPK se liší v závislosti na typu buňky a jejím receptorovém vybavení. Je však jisté, že receptory spřažené s $G_{q/11\alpha}$ proteinem se podílejí na řízení a regulaci různých komponentů všech hlavních MAPK kaskád. Co se týče vlivu TRH na kaskády MAPK, je známo, že tento hormon může stimulovat aktivitu ERK odlišnými signálními dráhami, na PKC závislými i nezávislými (Ohmichi *et al.*, 1994a). Na PKC nezávislá cesta by mohla pravděpodobně vést přes aktivaci MAPK pomocí komplexu $G\beta\gamma$ (Palomero *et al.*, 1998). Jak už bylo zmíněno výše pro CaMK, také pro MAPK platí, že syntéza a sekrece PRL je řízena stimulací MAPK prostřednictvím TRH (Kanda *et al.*, 1994; Kanasaki *et al.*, 1999) a stejně tak TRH řídí i regulaci prolaktinového promotoru pomocí MAPK přes aktivaci PKC a zvýšení proudu Ca^{2+} díky Ca^{2+} kanálům L-typu (Wang a Maurer, 1999). Aktivace MAPK signalizace prostřednictvím TRH může být inhibována dopaminovým D2S receptorem prostřednictvím G_o nebo G_{i3} proteinu (Ohmichi *et al.*, 1994b; Banihashemi a Albert, 2002). TRH indukuje fosforylací receptoru epidermálního růstového faktoru, která je potřeba pro plnou aktivaci MAPK po stimulaci TRH (Wang *et al.*, 2000b). Stejně jako na AC dochází pravděpodobně i na MAPK k integraci signálů z různých signálních drah. Je zřejmé, že konvergence různých signálních drah má velkou roli v konečné buněčné odezvě.

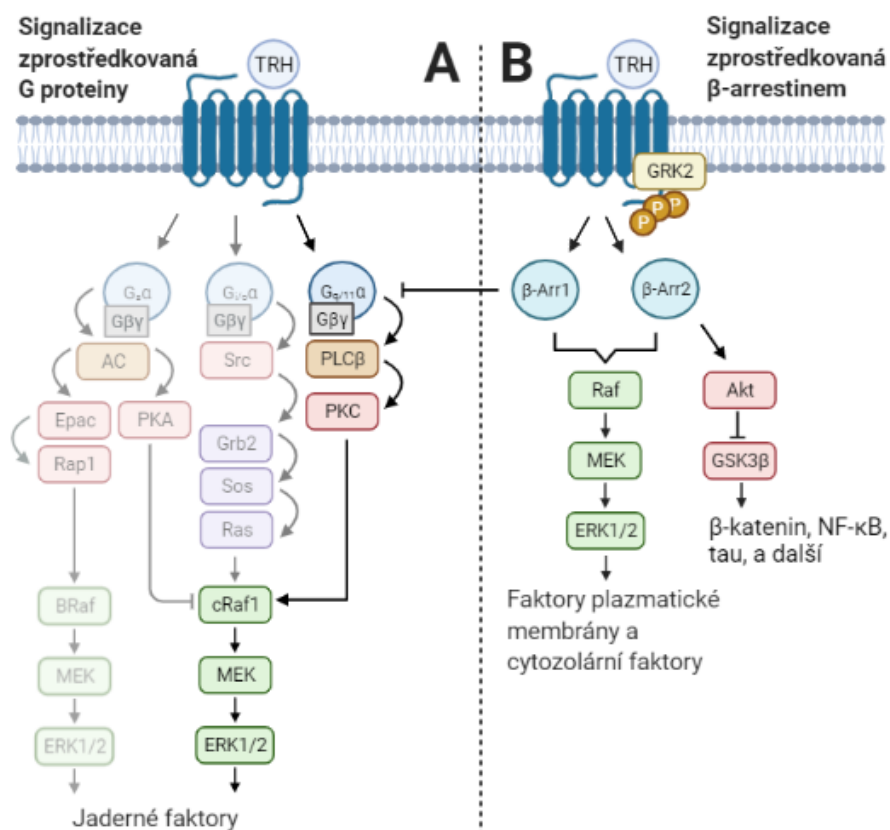
2.7 Usměrnovací agonismus

Velmi aktuálním a zároveň hodně diskutovaným tématem v rámci studia GPCRs je takzvaný usměrnovací agonismus (biased agonism). Je založen na skutečnosti, že každý receptor může tvořit mnoho různých specifických konformací, tzv. aktivních stavů, do kterých se mohou ligandy navázat, a spouštět různé signální kaskády v závislosti na aktuální konformaci daného receptoru. Různí agonisté také vykazují různé afinity k jednotlivým konformačním stavům, mohou tedy prostřednictvím jednoho typu receptoru aktivovat různé signální dráhy proto, že svou vazbou stabilizují různé konformace receptoru (Kenakin, 2011). V podstatě se jedná o funkční selektivitu daného ligandu pro jednu ze dvou signálních drah, vedoucí buďto přes G proteiny nebo přes β -arrestin.

Usměrnovací agonismus byl studován u celé řady GPCRs. Pro svůj značný fyziologický význam byl tento jev studován například pro různé metabolity morfinu a různé agonisty μ -OR. Při porovnání morfinu a jeho devíti metabolitů v jejich schopnosti aktivovat signální dráhu vedoucí buď přes G_i protein nebo β -arrestin, bylo pro tři metabolity morfinu (normorfin, 6-acetylmorfin

a morfin-6-glukuronid) prokázáno, že preferují signalizaci spíše skrz β -arrestin (Frolich *et al.*, 2011). Co se týče usměrňovacích ligandů μ -OR, bylo zjištěno, že odlišné ligandy mohou mít odlišný účinek na mobilitu tohoto receptoru v plazmatické membráně. Zatímco DAMGO a morfin laterální mobilitu μ -OR zvyšují, endomorfin-2 má vliv opačný (Melkes *et al.*, 2016). Endomorfin-1/2 navíc vykazoval odlišnou preferenci signalizační dráhy v porovnání s dynorfinem B, kdy upřednostňoval spřažení se signalizací zahrnující cAMP. Naproti tomu dynorfin B upřednostňoval vazbu s G proteinem (LaVigne *et al.*, 2020). Velmi důležitou úlohu hraje usměrňovací agonismus také v zánětu. Malé molekuly, jako jsou chemokiny, aktivující chemokinový receptor CXCR3, mohou prostřednictvím usměrňovacího agonismu regulovat migraci T-buněk a tedy zastávat klíčovou roli v regulaci imunitní zánětlivé odpovědi (Smith *et al.*, 2018). Jiná studie potvrzuje zapojení usměrňovacího agonismu v procesu internalizace receptoru pro dopamin, která není závislá na β -arrestinu (Xu *et al.*, 2019).

V případě receptorů spřažených s $G_{q/11}\alpha$ proteinem byl usměrňovací agonismus studován například na muskarinovém receptoru a receptoru pro angiotenzin II. Zdá se, že oba tyto receptory aktivují kinázu ERK5 mechanismem zahrnujícím $G_q\alpha$ protein a nezávislým na β -arrestinu (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2013). Ačkoli zatím není znám žádný přímý důkaz o usměrňovacím agonismu u TRH-R, což může být dáno i tím, že je znám pouze jeden jeho přirozený agonista, je možné, že i tento receptor může tvořit několik různých konformací a tedy iniciovat více možných signálních drah. Obr. 6 znázorňuje možné rozdělení signalizačních drah iniciovaných TRH vedoucích přes G proteiny nebo β -arrestiny směrem k regulaci MAPK a transkripčních faktorů.



Obr. 6: Diferenciální regulace MAPK kaskád. Aktivita ERK1/2 může být modulována signální dráhou vedoucí přes G proteiny nebo také β -arrestinem zprostředkovanou signalizací. (A) TRH primárně řídí signalizaci přes $G_{q/11}$ -PLC-PKC dráhu, přičemž aktivovaná PKC přímo aktivuje první kinázu z MAPK kaskády (cRaf1). TRH může pravděpodobně aktivovat i další G proteiny, které mohou MAPK modulovat jinými mechanismy (zeslabená část obrázku). Aktivovaná ERK1/2 následně translokuje do jádra, kde se účastní regulace genové exprese fosforylací různých transkripčních faktorů. (B) β -Arrestin1 a 2 jsou molekuly důležité pro desenzitizaci TRH-R, současně však mohou fungovat jako signální scaffoldy, díky kterým dochází k aktivaci enzymů, které následně fosforylují různé substráty. Upraveno podle Eishingdrelo a Kongsamut, 2013; Luo et al., 2002; Del'Guidice et al., 2011; Strungs a Luttrell, 2013; Khurana a Bedi, 2022; Vallentin et al., 2001.

2.8 Ligandy TRH-R a důležitost jejich účinků pro farmakologii

2.8.1 TRH

TRH je nejjednodušší hypotalamický hormon, tripeptid, složený z aminokyselin glutamátu, histidinu a prolinu (Glu-His-Pro). Je znám především pro svou roli v regulaci osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT osa, hypothalamic-pituitary-thyroid axis). TRH je sekretován rytmicky a řídí tvorbu a výdej TSH. Ten poté působí na folikulární buňky štítné žlázy a řídí akumulaci jódu a sekreci hormonů štítné žlázy - thyroxinu a trijodthyroninu. Biologické účinky hormonů štítné žlázy jsou velmi rozmanité: mají zásadní vliv na rychlost látkové výměny, spotřebu kyslíku, růst a vývoj, ovlivňují celou řadu biochemických reakcí, které vedou k regulaci energetického metabolismu (Daimon et al., 2013). TRH má mimo jiné důležitou roli v regulaci

sekrece dalších hormonů – stimuluje uvolňování prolaktinu (Tashjian *et al.*, 1971; Akita *et al.*, 1994) a růstového hormonu (Kanasaki *et al.*, 2015; Szabo *et al.*, 1984; Zarate *et al.*, 1986). Ovlivnění sekrece těchto hormonů bývá spojeno s patofyziologickými situacemi zahrnujícími akromegalii (Zarate *et al.*, 1986), selhání ledvin, onemocnění jater, rakovinu, diabetes mellitus, anorexii a bulimii, schizofrenii či deprese (Freeman *et al.*, 2000; Harvey, 1990; Ohbu *et al.*, 1995).

TRH může působit také jako neurotransmiter díky své široké distribuci v nervovém systému. Jeho účinky jsou známy jak v mozku, tak míše, či kardiovaskulárním a gastrointestinálním systému. Vzhledem k jeho krátkému poločasu života, nízké lipofilitě a silnému stimulačnímu účinku na HPT osu, je vyvíjeno velké úsilí najít analogy s lepšími vlastnostmi.

Na buněčné úrovni bylo prokázáno, že TRH má vliv na regulaci koncentrace TRH-R (Cook a Hinkle, 2004a), zejména dlouhodobá stimulace (16 hodin) 10 μM TRH může měnit genovou expresi v buňkách (Drastichova *et al.*, 2010).

Předpokládá se, že by TRH po vazbě na TRH-R mohl, kromě známého vlivu na PLC, regulovat i další efektorové systémy a spouštět jiné signalizační dráhy prostřednictvím různých $G\alpha$ proteinů. Existují starší publikace dokládající toto tvrzení. I přesto, že Hinkle a Tashjian na konci 70. let minulého století vliv TRH na aktivitu AC neprokázali (Hinkle a Tashjian, 1977), bylo později zjištěno, že stimulace buněk pomocí TRH může k regulaci aktivity AC vést, a to pravděpodobně přes $G_s\alpha$ protein (Paulssen *et al.*, 1992a; Johansen *et al.*, 2001). Zvýšená aktivita AC byla zjištěna také v přední hypofýze potkana (Brozmanova *et al.*, 1980), tedy v části mozku, kde dochází k vazbě TRH na receptor. Ve studii na oocytech rodu *Xenopus* bylo zjištěno, že TRH-R se pravděpodobně může spřahovat s $G_s\alpha$ způsobem, který vede k aktivaci stejné signalizační dráhy, jako kdyby byla spuštěna signalizace přes $G_{q/11\alpha}$ protein (PLC/IP₃/Ca²⁺) (de la Peña *et al.*, 1995). Dokonce i regulace výlevu prolaktinu v laktotropních buňkách či u GH₄C₁ buněk se zdá být řízena TRH-R funkčně spřaženým s $G_s\alpha$ (Gordeladze *et al.*, 1988; Kineman *et al.*, 1996). V buňkách GH₄C₁, které produkují prolaktin, dochází prostřednictvím TRH k tvorbě cAMP a tím aktivaci cAMP-dependentní proteinkinázy (Gautvik *et al.*, 1977). Mimo jiné, TRH-R1 se může spřahovat i s G proteiny, které AC neaktivují, ale inhibují, jako například G₁₂ nebo G₁₃ (Offermanns *et al.*, 1989; Gollasch *et al.*, 1993). TRH a stejně tak i další hypotalamické hormony pravděpodobně mohou modulovat hladiny G proteinů a tedy ovlivňovat, která signalizační dráha bude spuštěna (Paulssen *et al.*, 1992b, c). Účinky TRH na adenylylcyklázu jsou stále sporné. Buněčná odpověď na extracelulární signály je velmi složitý proces, ve kterém hraje významnou roli vzájemná komunikace mezi jednotlivými signálními systémy a souhra mezi druhými posly. Velmi důležité faktory při studiu takovýchto procesů představují zvolené experimentální podmínky a zejména experimentální model (buněčná linie/tkáň), na kterém je signalizace studována.

2.8.2 Analogy TRH

Různé analogy TRH se zkoumají hlavně kvůli svým lepším účinkům ve srovnání s TRH. Je známo, že některé analogy TRH jsou účinnějšími agonisty na TRH-R než samotný TRH. Bylo zjištěno, že nízkoafinitní analogy mají na TRH-R větší účinnost než analogy s vysokou afinitou (Engel *et al.*, 2006). Další důležité vlastnosti analogů TRH souvisí s jejich delším poločasem života a zanedbatelnými vedlejšími účinky. V posledních dvaceti letech se velká pozornost zaměřovala na zkoumání vlastností a účinků taltirelinu (TAL), jediného analogu TRH, který byl schválen pro použití u lidí. TAL se na TRH-R váže s nižší afinitou než TRH a je považován za tzv. superagonistu právě díky své vyšší vnitřní účinnosti při stimulaci tvorby IP₃ (Thirunarayanan *et al.*, 2012). Dále v kapitole 2.8.4 budou diskutovány účinky dalších známých analogů TRH, jako je azetirelin, montirelinhydrát, posatirelin a další, které vykazují velkou řadu užitečných vlastností a mají vysoký potenciál pro své možné využití například v léčbě neurodegenerativních poruch.

2.8.3 Antagonisté TRH-R

Velké množství benzodiazepinů, psychofarmak tvořených fúzí benzenového a diazepinového kruhu, je považováno za antagonisty TRH-R. Nejúčinnějšími blokátory TRH-R jsou ty benzodiazepiny, které mají substituovaný cyklický kruh v poloze 1 a 2 a jejich afinita závisí na teplotě (Joels a Drummond, 1989). Prvním objeveným benzodiazepinem byl chlordiazepoxid. Tato látka má sedativní a hypnotické účinky a používá se například k léčbě abstinčních příznaků u osob léčících se z drogové závislosti či závislosti na alkoholu. Byly zkoumány účinky chlordiazepoxidu, jakožto kompetitivního antagonisty, na procesy internalizace a downregulace TRH-R. Zdá se však, že tato látka nehraje roli ani v internalizaci, ani v downregulaci TRH-R (Hinkle a Shanshala, 1989).

Dalším z benzodiazepinů je midazolam (MDL). Toto silné sedativum lze použít k léčbě křečí a k navození sedace a anestézie v lékařské péči. Jeho vazebné místo na TRH-R1 se částečně překrývá s místem pro vazbu TRH. MDL spolu s dalšími benzodiazepiny mohou inhibovat konstitutivní aktivitu a působit jako kompetitivní inverzní agonisté na TRH-R1 (Lu *et al.*, 2004).

2.8.4 Cytoprotektivní a neuroprotektivní účinky TRH a jeho analogů

Kromě svého uplatnění v řízení HPT osy vykazuje TRH své účinky v centrálním nervovém systému i na periférii jako neuromodulátor či neurotransmitter. Zdá se, že výsledný efekt působení TRH záleží na tom, jaký typ receptoru je aktivován. Zatímco TRH-R1 pravděpodobně zprostředkovává endokrinní účinky TRH, TRH-R2 je zodpovědný za jeho neuromodulační vliv (Monga *et al.*, 2008). Účinky TRH na CNS jsou velmi rozsáhlé a důležité zejména pro svůj významný terapeutický potenciál. Příznivý vliv TRH byl pozorován v léčbě traumatických poranění míchy (Pitts *et al.*, 1995), či ve spojitosti s paměťovými (Molchan *et al.*, 1990) a dalšími behaviorálními procesy (Hara *et al.*, 2009). TRH se pravděpodobně účastní regulace nálady (Sun

et al., 2009) a má vliv například i na úzkost (Gutierrez-Mariscal *et al.*, 2008). Inotropní účinky TRH byly popsány v souvislosti s ischemickou kardiomyopatií u potkanů (Jin *et al.*, 2004).

Je znám i jistý vliv TRH na energetický metabolismus a funkci mitochondrií. Tak například dlouhodobé účinky TRH ovlivňují (snižují) aktivitu mitochondriálního enzymu ubichinol-cytochrom c-reduktázy (komplex III) u novorozených potkanů (Miyamori *et al.*, 1988). V orgánových kulturách keratinocytů TRH naopak vyvolal zvýšení v enzymatické aktivitě NADH-ubichinonreduktázy (komplex I) a cytochrom c-oxidázy (komplex IV) a zvýšil spotřebu kyslíku (Knuever *et al.*, 2012). K důležitým účinkům TRH patří také to, že napomáhá k obnovení buněčné bioenergetiky a zvyšuje průtok krve v mozku (Faden *et al.*, 2005a).

Jak na buněčných, tak i animálních modelech byly prokázány antiapoptotické účinky TRH (Drastichova *et al.*, 2010; Koo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013). Avšak svou roli TRH hraje i při vyvolání apoptózy v rámci morfogeneze během embryonálního vývoje (Mulla *et al.*, 2009). Účinky TRH jsou patrně závislé na konkrétním studovaném buněčném typu a experimentálních podmínkách či fyziologickém kontextu.

TRH projevuje neuromodulační účinky na CNS obvykle ve spolupráci s účinky různých neurotransmiterů, jako jsou noradrenalin, acetylcholin, dopamin, serotonin, GABA nebo glutamát. Zejména kooperace s cholinergní a dopaminergní signalizací má velký význam vzhledem k případné aplikaci TRH (nebo jeho analogů) v léčbě neurodegenerativních chorob, zvláště pak Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby (Jaworska-Feil *et al.*, 2010). Ukázalo se, že například TAL, analog TRH s delším trváním účinků, zmírnil poruchu lokomoce u modelových potkanů pro studium Parkinsonovy choroby (Zheng *et al.*, 2018a). Použití stabilního analogu TRH, L-pyro-2-aminoadipyl-histidyl-thiazolidin-4-karboxamidu kódovaného jako MK-771, vedlo ke zlepšení paměťových problémů způsobených cholinergní nedostatečností, proto se naskýtá možnost použití těchto látek v léčbě paměťových nedostatečností spojených s Alzheimerovou chorobou (Horita *et al.*, 1989). Neuroprotektivní účinky TRH a jeho analogů byly popsány už dávno (Faden *et al.*, 2005a, b), avšak přesný mechanismus těchto účinků není zatím zcela vysvětlen. Jedná se pravděpodobně o multifaktoriální proces, jehož objasnění vyžaduje důkladný výzkum. Pravděpodobně je za neuroprotektivní účinky těchto látek zodpovědný jejich C-konec, protože modifikací N-konce a imidazolového kruhu analogu TRH byly zachovány jeho neuroprotektivní vlastnosti, ba dokonce byly potlačeny jeho nežádoucí endokrinní a další fyziologické účinky (Faden *et al.*, 1999).

Co se týče účinků různých analogů TRH, periferně podaný MK-771 a další analog TRH gama-butyrolakton-gama-karbonyl-histidyl-prolinamid citrát (kódovaný pod zkratkou DN-1417) zesilují působení opioidů na gastrointestinální trakt (Bansinath a Bhargava, 1988). L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-ProNH(2), analog TRH kódovaný jako NP-647, se pravděpodobně váže selektivně na TRH-R2 a zdá se být účinnějším antiepileptikem se zanedbatelnými vedlejšími endokrinními účinky ve srovnání s TRH (Rajput *et al.*, 2009). Epileptiformní aktivitu tato látka

patrně tlumí nepřímo prostřednictvím inhibice sodíkových kanálů (Sah *et al.*, 2011). Kromě toho NP-647 chrání hipokampální neurony před ischemickým poškozením mozku (Rajput *et al.*, 2011). TRH a jeho analogy byly také zkoumány pro své antidepresivní účinky (Ogawa *et al.*, 1984) nebo pro použití v terapeutické léčbě spánkových poruch (Nishino *et al.*, 1997).

Dalším slibným analogem TRH pro zlepšení kognitivních funkcí při Alzheimerově chorobě je montirelinhydrát (N[[[(3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorfolinyl]karbonyl]-L-histidyl-L-prolinamid tetrahydrát, NS-3) (Ogasawara *et al.*, 1995; Ogasawara *et al.*, 1996). Tato látka se ukázala být účinnější než TRH v řadě parametrů (Huang *et al.*, 1992). Po působení NS-3 na TRH-R dochází ke zvýšenému uvolňování acetylcholinu v hipokampu. Tento proces je nejspíše spojený se signalizací přes cAMP, PKA a PKC (Oka *et al.*, 1996).

Dalším z analogů TRH, který byl testován pro své příznivé účinky při léčbě různých druhů demencí je posatirelin (L-pyro-2-aminoadipyl-L-leucil-L-prolinamid, RGH 2202) (Parnetti *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1996; Gasbarrini *et al.*, 1997). Tento analog vykazoval výhodnější vlastnosti než TRH v různých behaviorálních testech (Drago *et al.*, 1991). Zdá se, že RGH 2202 zlepšuje kognitivní schopnosti potkanů (Drago *et al.*, 1996), ale i pacientů s demencí, a nevykazuje interferenci ani s HPT osou, ani se sekrecí prolaktinu (Reboldi *et al.*, 1996). Jak RGH 2202, tak TRH, dokázali inhibovat neurotoxicitu vyvolanou kainátem (Jaworska-Feil *et al.*, 2001).

Azetirelin (YM-14673, N alfa-[[S]-4-oxo-2-azetidiny]karbonyl]-L-histidyl-L-prolinamid dihydrát), také účinný analog TRH, by mohl být využíván u pacientů se spinocerebelární degenerací, neboť byly prokázány jeho anti-ataxické účinky u modelových typů mutantních myší (Matsui *et al.*, 1994). Vzhledem ke svému působení proti účinkům endogenních opioidů, které jsou považovány za jeden z faktorů zapojených v patologických následcích po poranění CNS, mohl by YM-14673 mít uplatnění také při léčbě traumatických poranění míchy (Faden, 1989; Puniak *et al.*, 1991; McIntosh *et al.*, 1993). Podávání azetirelinu se ukázalo také vhodné pro léčbu mozkových cévních onemocnění, neboť zmírnilo cerebrální poškození vzniklá ischemií (Yamamoto *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991). Také tento analog zlepšuje kognitivní funkce u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou působením na cholinergní signalizaci (Okada, 1991) a jeho účinky na dlouhodobou potenciaci by mohly být slibné při zmírňování poruch paměti (Ishihara *et al.*, 1992).

3. Cíle práce

Cíl 1: Vliv vybraných signálních molekul na chování TRH receptoru v plazmatické membráně

- 1) Charakterizace TRY-1 buněčné linie
- 2) Vliv TRH na laterální mobilitu TRH-R
- 3) Vliv vybraných signálních molekul na laterální mobilitu TRH-R

Cíl 2: Vliv vybraných signálních molekul na funkční stav signalizace TRH receptoru

- 1) Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii TRY-1
- 2) Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii E2
- 3) Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci IP1
- 4) Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a ligandů TRH-R na intracelulární koncentraci cAMP
- 5) Vliv ligandů TRH-R na expresi ERK1/2 a Akt

Cíl 3: Vliv aktivace TRH receptoru na redoxní rovnováhu, stav mitochondrií, cytoprotekci

- 1) Celková antioxidační kapacita
- 2) Vliv TRH a TAL na energetický metabolismus

Cíl 4: Role β -arrestinu v TRH receptorem řízené signalizaci

- 1) Vliv inhibice β -arrestinu na signalizaci malých GTPáz a MAP kináz

4. Seznam vlastních publikací

4.1 Seznam publikací souvisejících s disertační prací

- 1) Moravcová, R., Melkes, B., Novotný, J. 2018. TRH receptor mobility in the plasma membrane is strongly affected by agonist binding and by interaction with some cognate signaling proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*; 38:1; 20-26. (IF=2,092)
- 2) Drastichová, Z., Trubačová, R., Novotný, J. 2022. β -Arrestin2 is critically involved in the differential regulation of phosphosignaling pathways by thyrotropin-releasing hormone and taltirelin. *Cells*; 11:9; 1473. (IF=6,600)

4.2 Další publikace

- 3) Šilhavý, J., Malínská, H., Hüttl, M., Marková, I., Oliyarnyk, O., Mlejnek, P., Šimáková, M., Liška, F., Kazdová, L., Moravcová, R., Novotný, J., Pravenec, M. 2020. Downregulation of the *Glo1* gene is associated with reduced adiposity and ectopic fat accumulation in spontaneously hypertensive rats. *Antioxidants (Basel)*; 9:12; 1179. (IF=6,313)
- 4) Drastichová, Z., Hejnová, L., Moravcová, R., Novotný, J. 2021. Proteomic analysis unveils expressional changes in cytoskeleton- and synaptic plasticity-associated proteins in rat brain six months after withdrawal from morphine. *Life (Basel)*; 11:7; 683. (IF=3,78)

4.3 Podíl na publikacích použitých pro sepsání disertační práce

- 1) Moravcová, R., Melkes, B., Novotný, J. 2018. TRH receptor mobility in the plasma membrane is strongly affected by agonist binding and by interaction with some cognate signaling proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*; 38:1; 20-26.

Provedla jsem všechny experimenty týkající se přípravy buněčné linie TRY-1 a všechny experimenty s touto linií, analyzovala získaná data, připravila grafy a podílela se na sepsání manuskriptu.

- 2) Drastichová, Z., Trubačová, R., Novotný, J. 2022. β -Arrestin-2 is critically involved in the differential regulation of phosphosignaling pathways by thyrotropin-releasing hormone and taltirelin. *Cells*; 11:9; 1473.

Provedla jsem experiment s buněčnou linií, připravila vzorky pro měření hmotnostním spektrometrem, analyzovala jsem získaná data a připravila základní tabulky a grafy pro tvorbu finálních obrázků, podílela jsem se na sepsování manuskriptu.

Předkládané publikace, na kterých je založena tato disertační práce, jsou výsledkem spolupráce několika vědeckých pracovníků. Autorka disertační práce se na těchto publikacích podílela a její příspěvek je výše rozepsán. Spoluautoři jsou s tím seznámeni a souhlasí.

Tímto potvrzuji, že údaje o podílu Mgr. Radky Trubačové na vzniku předložených publikací odpovídají skutečnosti.

V Praze dne

.....
doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

5. Metodická část práce

5.1 Materiál

Opti-MEM médium, Lipofektamin 2000 a Lipofektamin RNAiMAX byly pořízeny od Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), všechny siRNA od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), fetální bovinní sérum (FBS) a plastik pro kultivaci buněčných kultur od Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), ostatní chemikálie v nejvyšší dostupné čistotě od Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA).

5.2 Tvorba buněčné linie TRY-1

5.2.1 Konstrukce plazmidu

Plazmid obsahující TRH-R-YFP byl klonován pomocí vektoru pcDNA3-YFP (Addgene plazmid č. 13033, dar od Douga Golenbocka, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA) a sekvence DNA kódující lidský TRH-R (Source Bioscience, Nottingham, UK). YFP tag byl připojen na C-konec sekvence TRH-R pomocí standardních technik molekulární biologie.

5.2.2 Polymerázová řetězová reakce

K sekvenci TRH-R byly pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) přidány přesahy DNA odpovídající YFP vektoru. Pro tuto reakci byl použit Q5^R High-Fidelity 2x master mix (New England Biolabs). Jednotlivé složky PCR byly smíchány podle tabulky 3.

Tab. 3: Množství složek pipetovaných na 1 reakci PCR

| množství | jednotlivé složky |
|----------|---|
| 1 ng | templátová DNA |
| 12,5 µl | Q5 ^R High-Fidelity 2x Master Mix |
| 1,25 µl | 10 µM forward primer (5' - CAG TGT GCT GGA ATT CAT GGA AAA CGA GAC AGT C -3') |
| 1,25 µl | 10 µM reverse primer (5' - GAT ATC TGC AGA ATT CAC TTT GGC TAA AGG ATA C -3') |

Do konečného objemu 25 µl doplněno „nuclease-free“ vodou.

Reakce probíhala v termocykleru (Bio-Rad) za podmínek uvedených v tabulce 4.

Tab. 4: Program nastavený na přístroji Thermal Cycler

| program | teplota | čas | počet cyklů |
|----------------------|----------------|------------|--------------------|
| počáteční denaturace | 98 °C | 30 sekund | 1 |
| denaturace | 98 °C | 10 sekund | 30 |
| nasedání primerů | 55 °C | 30 sekund | 30 |
| elongace | 72 °C | 1 minuta | 30 |
| závěrečná extenze | 72 °C | 3 minuty | 1 |
| ukončení | 4 °C | ∞ | 1 |

Amplifikovaná DNA byla rozdělena na 1% agarózovém gelu (100 V, 30 minut) a separované fragmenty vizualizované pomocí ethidium bromidu. Výsledný PCR produkt byl následně pročištěn pomocí kitu DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, USA) a byl klonován pomocí In-Fusion^R HD klonovacího systému (Clontech, Mountain View, CA). 100 ng DNA bylo smícháno s 80 ng linearizovaného vektoru, 2 µl 5x In-Fusion^R HD Enzyme premixu a reakce byla doplněna do 10 µl vodou. Směs byla inkubována po dobu 15 minut při 50 °C a poté umístěna na led.

5.2.3 Transformace a sekvenování

Plazmid (1 ng) byl smíchán se 100 µl chemicky kompetentních bakteriálních buněk (XL-1 Blue *E. Coli*) a ponechán 30 minut na ledu. Směs byla poté vystavena teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a následně ihned uložena na 2 minuty na led. Po přidání 200 µl Luria Bertani (LB) média byla směs ponechána míchat na třepačce 1 hodinu při 37 °C. Směs byla rozetřena na předem připravené LB agarové plotny obsahující selekční antibiotikum ampicilin a při 37 °C ponechána inkubovat přes noc. Jednotlivé kolonie byly zaočkovány do 5 ml LB média s ampicilinem (5 µg/µl) a inkubovány na třepačce přes noc při 37 °C. DNA byla izolována pomocí kitu ZR plasmid Miniprep kit (ZymoResearch, Irvine, CA, USA) a její sekvence ověřena servisním pracovištěm Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Laboratoří sekvenace DNA.

5.2.4 Transfekce a sorting

Buněčná linie HEK293 byla pěstována v Dulbecco's modified Eagle's médiu (DMEM) obohaceném 10% FBS při 37 °C a 5% obsahu CO₂. Pro transfekci byly buňky rozsazeny do 24-jamkových destiček a při 70% konfluenci transfekovány rekombinantní DNA (viz předchozí kroky) pomocí Lipofektaminu 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) podle doporučení od výrobce. Následně byly buňky inkubovány se selektivním antibiotikem geneticin (G418 Sulfate; 0,8 mg/ml) po dobu 2 týdnů a tato heterogenní buněčná směs byla tříděna pomocí přístroje BD Influx TM cell sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Kultivací jednotlivých buněk po dobu 6 týdnů bylo identifikováno 9 klonů, z nichž byl poté pomocí důkladné mikroskopické analýzy, real-time PCR a elektroforetickým stanovením exprese TRH-R vybrán nejvhodnější klon a označen TRY-1.

Kvalita transfekovaného receptoru byla ověřena funkční studií, a to měřením koncentrace intracelulárního vápníku.

5.3 Real-time PCR

5.3.1 Izolace RNA

Buňky pěstované v 6-jamkových destičkách byly lyzovány v 1 ml RNAzol[®]RT (Molecular Research Center, Inc.). Buněčný lyzát byl důkladně smíchán se 400 μ l H₂O a inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Následnou centrifugací při 12 000 g po dobu 15 minut byla odstraněna buněčná debris a 1 ml vzniklého supernatantu byl jemně smíchán s 1 ml isopropanolu. Směs byla inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě a poté centrifugována při 12 000 g po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byl jemně smíchán s 500 μ l 75% etanolu a centrifugován při 8 000 g po dobu 3 minut. Čištění peletu pomocí etanolu bylo ještě jednou zopakováno a výsledný pelet byl resuspendován v 50 μ l klávované vody a inkubován po dobu 5 minut při 55-60 °C. Čistota a koncentrace vyizolované RNA byly zjištěny pomocí NanoDropu.

5.3.2 Reverzní transkripce

V procesu reverzní transkripce byla RNA přepsána do cDNA pomocí High Capacity RNA-to-DNA kitu (Applied Biosystems) podle instrukcí výrobce. Jednotlivé složky byly smíchány podle tabulky 5.

Tab. 5: Množství složek pipetovaných na 1 reakci reverzní transkripce pomocí kitu High Capacity RNA-to-DNA Kit

| množství | jednotlivé složky |
|------------|-------------------|
| 2 μ g | celková RNA |
| 10 μ l | 2x RT Buffer |
| 1 μ l | 20x Enzyme Mix |

Do konečného objemu 20 μ l doplněno „nuclease-free“ vodou.

Reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny a poté byla reakce zastavena zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut. Před použitím v dalším kroku byla vzniklá cDNA držena při 4 °C.

5.3.3 Real-time PCR

Vzorky cDNA byly amplifikovány pomocí TaqMan Gene Expression Assay obsahující sondu pro detekci TRH-R (Invitrogen) na přístroji LightCycler[®] 480 Instrument (Roche Molecular Systems, Inc.). Současně byly zahrnuty negativní kontrola na kontaminaci při přípravě reakce a RT-kontrola. Počáteční denaturace probíhala při 95 °C po dobu 15 minut. Následujících 60 cyklů

sestávalo z denaturace při 95 °C po dobu 18 sekund a amplifikace při 60 °C po dobu 1 minuty. Jako vnitřní kontrola bylo použito několik referenčních genů: AA-NAT, ICER, HPRT, SPI-3. Zároveň byly pomocí desítkového ředění cDNA sestrojeny standardní křivky, z jejichž sklonu byla kalkulována účinnost PCR reakce.

5.4 Ligandy

V experimentech byly použity dva agonisté TRH-R, TRH a TAL. Jednotlivé experimenty se lišily koncentrací ligandů, která byla buďto 1 μ M nebo 10 μ M. Zkoumány byly zejména jejich akutní účinky (15-30 minut inkubace). Antagonista TRH-R midazolam byl použit v koncentracích 10 μ M nebo 100 μ M (vždy o řád vyšší koncentrace než koncentrace agonisty). V případě současného použití agonisty a antagonisty, byly buňky vždy nejprve inkubovány v přítomnosti midazolamu po dobu 5-10 minut před přidáním agonisty.

5.5 siRNA inhibice

Pro snížení exprese jednotlivých proteinů účastnících se signalizace TRH-R byla použita metoda siRNA inhibice. K tomuto účelu byla zvolena technika lipofekce, při které transfekční reagentie Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) vytvoří v OptiMEM médiu liposom a obalí tak danou siRNA a umožní jí vstup do buňky. Pro jednotlivé experimenty byly buňky kultivovány a transfekovány buďto v 6-jamkových, 12-jamkových nebo 24-jamkových destičkách podle doporučení výrobce. Transfekované buňky byly experimentálně analyzovány 2 dny po transfekci. Hladiny cílových proteinů po siRNA inhibici byly monitorovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a imunoblotingem (viz dále). Tabulka 6 znázorňuje seznam všech použitých siRNA.

Tab. 6: Seznam použitých siRNA

| siRNA (lidské) | katalogové číslo | siRNA (potkaní) | katalogové číslo |
|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| G _q α | sc-35429 | G _q α | sc-45998 |
| G ₁₁ α | sc-41740 | G ₁₁ α | sc-45999 |
| G _s α | sc-29328 | G _s α | sc-41757 |
| G _i α | sc-105382 | G β ₁ | sc-41763 |
| G β ₁ | sc-41762 | G β ₂ | sc-41765 |
| G β ₂ | sc-41764 | β Arr-1 | sc-63298 |
| β Arr-1 | sc-29741 | β Arr-2 | sc-63299 |
| β -Arr2 | sc-29208 | PLC β ₁ | sc-270424 |
| GRK2 | sc-29337 | GRK2 | sc-270408 |
| PLC β ₁ | sc-36266 | | |
| cav-1 | sc-29241 | | |
| RGS2 | sc-40659 | | |
| Rab4A | sc-41820 | | |
| Rab5A | sc-36344 | | |
| kontrolní siRNA | sc-37007 | | |

5.6 Příprava vzorků pro elektroforetické metody

Buněčné kultury byly sklizeny ve fosfátovém pufru (PBS; 137,93 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 8,06 mM Na₂HPO₄ a 1,47 mM KH₂PO₄) centrifugací 1800 rpm po dobu 10 minut při 4 °C (Hettich Universal 320).

Pro SDS-PAGE byly buňky následně resuspendovány v homogenizačním pufru TMES (250 mM sacharóza, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a 3 mM MgCl₂, pH 7,4) obohaceném o inhibitory proteáz a fosfatáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail a PhosSTOP, Sigma-Aldrich). Buňky byly homogenizovány na ledu za použití sklo-teflonového homogenizátoru při 1500 rpm po dobu 5 minut a vzniklý homogenát byl následně centrifugován 600-800 g, 10 minut, 4 °C (Hettich Universal 320). Vzorky postnukleárního supernatantu (PNS) byly před použitím zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -20 °C.

5.7 SDS-PAGE elektroforéza a imunobloting

Vzorky PNS (20 µg proteinů) byly solubilizovány v Laemmliho vzorkovém pufru a rozděleny na 10% polyakrylamidových gelech při konstantním napětí 200 V po dobu přibližně 1 hodiny s použitím aparatury Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Následně byly proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou membránu (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) za konstantního napětí 100 V po dobu 1 hodiny. Membrána byla poté obarvena Ponceau S (0,1% (w/v) v 5% kyselině octové (v/v)), což bylo využito pro normalizaci při hodnocení, a dále uložena do blokovacího roztoku 5% nízkotučného mléka v TBS-T pufru (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl a 0,1% Tween 20, pH 8,0) na 1 hodinu. Dále byla membrána inkubována při 4 °C přes noc s příslušnými primárními protilátkami. Seznam všech použitých protilátek je zobrazen v tabulce 7.

Druhý den byla membrána opláchnuta destilovanou vodou pro odmytí nenavázané protilátky a 3x 10 minut promyta TBS-T pufrém. Poté byla membrána inkubována v sekundární protilátce konjugované s křenuvou peroxidázou (anti-mouse, NXA931V; anti-rabbit, NA934V, obě GE Healthcare) po dobu 1 hodiny a následně opět promyta 3x 10 minut TBS-T pufrém. Inkubací membrány se substrátovým roztokem (SuperSignal West Dura, ThermoFischer Scientific) po dobu 1 minuty došlo k přeměně chemiluminiscenčního substrátu na nestabilní produkt, který se stabilizoval vyzářením kvanta světla. Uvolněné světlo bylo detekováno pomocí fotografického filmu (Agfa) a filmy byly následně vyvolány v temné místnosti vyvolávacím přístrojem Optimax. Vyvolané filmy byly naskenovány a získaný signál vyhodnocen volně dostupným programem ImageJ.

Tab. 7: Primární protilátky použité pro imunobloting

| protilátka | katalogové číslo | specifikace | ředění | molekulová hmotnost (kDa) |
|--|------------------|---------------------------------|----------|---------------------------|
| Akt | 4691L | králičí polyklonální protilátka | 1:5 000 | 62 |
| (p)Akt (Ser473) | 4060L | králičí polyklonální protilátka | 1:5 000 | 62 |
| β -Arrestin1 (E274) | ab32099 | králičí monoklonální protilátka | 1:2 000 | 47 |
| β -Arrestin2 | PA1-732 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 50 |
| Catalase (H-300) | sc-50508 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 60 |
| Caveolin-1 (N-20) | sc-894 | králičí polyklonální protilátka | 1:10 000 | 22 |
| ERK1/2 (137F5) | 4695 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 44/42 |
| (p)ERK 1/2 (197G2) (Thr202/Tyr204) | 4377 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 44/42 |
| G _{q/11} α (C-19) | sc-392 | králičí polyklonální protilátka | 1:3 000 | 40, 43 |
| G _q α (E-17) | sc-393 | králičí polyklonální protilátka | 1:3 000 | 40 |
| G ₁₁ α (D-17) | sc-394 | králičí polyklonální protilátka | 1:3 000 | 43 |
| G _i α (I-20) | sc-391 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 41 |
| G _s α | ab235956 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 46 |
| G β_1 (C-16) | sc-379 | králičí polyklonální protilátka | 1:10 000 | 36 |
| G β_2 (C-16) | sc-380 | králičí polyklonální protilátka | 1:10 000 | 36 |
| GRK2 (C-15) | sc-562 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 80 |
| PLC β_1 (R-233) | sc-9050 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 150 |
| Rab4A | PACO0018329 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 24 |
| Rab5A | CAB1180 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 20 |
| RGS2 (H-90) | sc-9103 | králičí polyklonální protilátka | 1:2 000 | 24 |
| SOD1 | ab245352 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 25 |
| SOD2 (FL-222) | sc-30080 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 25 |
| SOD3 | ab83108 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 25 |
| Total OXPHOS Rodent WB antibody cocktail | ab110413 | myši monoklonální protilátka | 1:2 000 | 20, 30, 40, 48, 55 |
| TRH-R | ABIN1536075 | králičí polyklonální protilátka | 1:1 000 | 45 |

5.8 FRAP experimenty

TRY-1 buňky byly nasazeny na misky se skleněným dnem a pěstovány v DMEM médiu bez fenolové červeně obohaceném o 10% FBS v přítomnosti geneticinu (0,8 mg/ml). V případě, že byl měřen vliv jednotlivých proteinů účastnících se signalizace prostřednictvím TRH-R, byly buňky následující den transfekovány příslušnými siRNA a dále kultivovány po další dva dny. Deset minut před samotným měřením byly do média přidány ligandy. Mikroskopie živých buněk byla prováděna ve vyhřívané komůrce při 37 °C a 5% CO₂ na konvertovaném konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss AG, Jena, Německo) vybaveném 40x/1,2 W DICIII C apochromatickým objektivem a CCD kamerou (Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Německo). Fotovybělení proběhlo zaostřeným laserovým paprskem (40-mV argonový laser o vlnové délce 488 a 514 nm a 100% síle) na kruhové oblasti plazmatické membrány (o průměru 2 μ m) přilehlé ke sklíčku. Každé vybělení trvalo 300 ms a zahrnovalo 6 pulsů. Následné navrácení fluorescence po fotovybělení (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching) bylo

monitorováno při nízké intenzitě laseru, aby nenastávalo vysvícení fluoroforu (2 % intenzity použité pro fotovybělení). Obrázky byly pořízeny ve formátu 512 x 512 pixelů s rychlostí skenování 500 Hz. Pro monitorování změny v distribuci fluorescence bylo před fotovybělením nahráno 15 obrázků a ihned po fotovybělení dalších po sobě jdoucích 400 obrázků. Zároveň byla v průběhu experimentu zaznamenávána intenzita celkové fluorescence, neboli fluorescence v kontrolní oblasti, a intenzita pozadí a jejich hodnoty byly před kvantifikací fluorescence použity k normalizaci. Do hodnocení bylo zahrnuto přinejmenším 30 buněk ze tří nezávislých pokusů. Pro vypočtení procentuální hodnoty návratu fluorescence byl použit vzorec: návrat (%) = $(I_{\text{bleach}} - I_{\text{bckg}})/(I_{\text{ref}} - I_{\text{bckg}}) \times 100$, kdy I_{bleach} odpovídá intenzitě fluorescence vybělené oblasti, I_{bckg} je intenzita fluorescence pozadí a I_{ref} odpovídá intenzitě fluorescence kontrolní oblasti. Kvantifikace byla provedena pomocí programu easyFRAP (Rapsomaniki *et al.*, 2012), kde byly jednotlivé křivky normalizovány a získány hodnoty pro výpočet difuzního koeficientu (D). Pro jeho výpočet byl použit vzorec: $D = 0,224 \omega^2/t_{1/2}$, kdy ω odpovídá průměru vybrané vybělené oblasti a $t_{1/2}$ je poločas návratu fluorescence. Mobilní frakce (M_f) byla určena z poměru výsledné a počáteční fluorescence podle vzorce: M_f (%) = $(I_{\infty} - I_{\text{bleach } 0})/(I_{\infty} - I_{\text{bleach } 0}) \times 100$, kdy I_{∞} odpovídá maximální návratné intenzitě fluorescence a $I_{\text{bleach } 0}$ je intenzita fluorescence vybělené oblasti.

5.9 Kultivace buněčných kultur

Buněčná linie TRY-1 a buněčná linie E2 (HEK293 buňky stabilně exprimující dlouhou izoformu potkaního TRH-R1) byly kultivovány v DMEM s 10% FBS a geneticinem (0,8 mg/ml) při 37 °C a 5% obsahu CO₂.

GH1 buněčná linie (CCL-82, klonální kmen nádorových buněk hypofýzy potkanů) byla kultivována v Ham's F-12 médiu obohaceném o 15% koňské sérum a 2,5% FBS při 37 °C a 5% obsahu CO₂.

5.10 Měření vápníkových odpovědí

Pro měření vápníkových odpovědí byly buňky nasazeny na sklíčka (v případě TRY-1 buněk byla sklíčka potažena poly-L-lysinem) ve 24-jamkových destičkách v koncentraci 20 000 buněk/jamka v den transfekce. Kontrolní nebo konkrétní vybrané siRNA o koncentraci 10 pmol byly smíchány se 3 μ l lipofektamínu (Lipofectamine RNAiMAX Reagent) v Opti-MEM médiu a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklé siRNA-lipidové komplexy byly poté přidány do každé jamky obsahující 1 ml DMEM. Transfekované buňky byly analyzovány o dva dny později.

Buňky na sklíčku byly opláchnuty puřem (160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10 mM glukóza a 10 mM HEPES, pH 7,2) a barveny v přítomnosti 1 μ M Fura-2AM po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Poté byly buňky opláchnuty puřem bez Fura-2AM a sklíčko

bylo rozděleno na několik střípků. Z každého sklíčka byly použity nejméně 3 střípky a na každém z nich bylo naměřeno minimálně 30 buněk. Každý pokus byl takto alespoň 3x zopakován.

Sklíčko s buňkami bylo poté umístěno v pufru pod invertovaný epifluorescenční mikroskop Olympus IX 50 a byly zaznamenávány změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} při vlnových délkách 340 nm a 380 nm. Každé 2 s byl získán jeden pár snímků. Snímky fluorescence byly uchovány pro následnou analýzu. Po odečtení pozadí byl vypočítán poměr intenzit emisní fluorescence při excitaci 340/380 nm.

Testovaný agonista byl aplikován v $1\ \mu\text{M}$ koncentraci a stanovených časech přímo k buňkám. Doba působení hormonu se u různých linií poněkud lišila. V případě TRY-1 buněk bylo zjišťováno působení hormonu po dobu 10 s a 30 s a v případě E2 linie bylo navázáno na již dříve publikované výsledky při působení TRH po dobu 20 s (Ostasov *et al.*, 2008). Při dvou následných aplikacích ligandu byly vždy po prvním působení TRH buňky ponechány po určitou dobu v médiu bez TRH (TRY-1 linie 3 minuty, E2 linie 5 minut), aby hladina vápníku klesla opět na původní úroveň, a poté byla opět aplikována stejná dávka hormonu (pro TRY-1 linii po dobu 10 s a pro E2 linii po dobu 20 s).

5.11 Detekce IP_3 metodou HTRF

Pro měření hladin IP_3 v buňce byl použit kit IP-One-Gq KIT (Cisbio, Francie), kterým byly měřeny hodnoty D-myo-inositol 1-fosfátu (IP_1), metabolitu IP_3 . Tato metoda využívá technologie homogenní časově rozlišené fluorescence (HTRF) a je založena na přenosu energie mezi dvěma fluorofory (fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET). Spočívá v kompetici IP_1 produkovaným buňkami a značeným IP_1 -d2 (akceptor) o vazbu na protilátku anti- IP_1 -kryptát (donor). Jestliže dojde k vazbě značeného IP_1 na protilátku, energie se přenesse z donoru na akceptor a je možné detekovat signál. Tento signál je nepřímo úměrný koncentraci IP_1 ve vzorku.

E2 buňky byly v den transfekce nasazeny do 12-jamkových destiček v koncentraci 500 000 buněk/jamka. Dvacet pmol kontrolní nebo konkrétních vybraných siRNA bylo smícháno se 6 μl lipofektamínu (Lipofectamine RNAiMAX Reagent) ve 200 μl Opti-MEM média a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklé siRNA-lipidové komplexy byly poté přidány do každé jamky obsahující 1 ml DMEM. Dva dny po transfekci byly buňky rozsazeny do 384-jamkové destičky v koncentraci 6 000 buněk/jamka a ponechány další dva dny v DMEM médiu obsahujícím 1% FBS a antibiotika, aby mohla zregenerovat plazmatická membrána po účincích lipofektamínu. Poté byly buňky použity pro samotnou analýzu množství IP_3 .

Stanovení bylo provedeno podle protokolu pro adherentní buňky v instrukcích od výrobce. DMEM s 1% FBS bylo nahrazeno 28 μl stimulačního pufru, ve kterém byla provedena stimulace agonistou (1 μM TRH, 30 minut) v nepřítomnosti nebo přítomnosti antagonisty (10 μM nebo 1 μM midazolam). V případě, že byly buňky ovlivňovány oběma ligandy současně, TRH byl přidán 10 minut po midazolamu. Stimulace buněk byla zastavena přidáním 6 μl monoklonální protilátky

anti-IP₁-kryptát (donoru) a IP₁-d2 (akceptoru) ředěných v lyzačním pufru. Destičky byly následně potaženy folií a inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Měření bylo provedeno v bílých HTRF 96-jamkových destičkách (Cisbio) na readeru Safire II podle instrukcí od firmy TECAN (Implementation of HTRF on Tecan Safire²™). Pomocí Tecan XFluor4™ Safire II softwaru byla provedena dvě postupná měření: při vlnové délce 620 nm pro emisi kryptátu a při 665 nm pro specifický signál vydávaný akceptorem, přičemž excitační vlnová délka byla vždy 317 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako poměr těchto dvou fluorescenčních intenzit (665/620; akceptor/donor) po vynásobení 10 000 a odečtení pozadí. Pro odečet pozadí a zároveň pro normalizaci dat v rámci porovnání nezávislých experimentů byl použit výpočet hodnoty Delta F, která představuje rychlost přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Tato hodnota byla vypočtena podle následujícího vzorce: $\text{Delta F (\%)} = (\text{poměr intenzit vzorku} - \text{poměr intenzit pozadí}) / \text{poměr intenzit pozadí} \times 100$. Koncentrace IP₁ v každém experimentu byla vypočítána podle známých koncentrací IP₁ z kalibračních křivek.

5.12 Detekce cAMP metodou HTRF

Pro měření hladin cAMP v buňce byl použit kit cAMP-Gs dynamic kit (Cisbio, Francie). Tento kit je založen na stejném principu, jako výše popsané měření IP₃ (viz kapitola 5.11). Spočívá v přenosu energie z donoru, v tomto případě anti-cAMP-kryptát na akceptor, d2 značené cAMP.

Hladina cAMP byla měřena jak na E2 buněčné linii (8 000 buněk/jamka), tak na GH1 buněčné linii (12 000 buněk/jamka). Stanovení bylo provedeno podle protokolu pro adherentní buňky. DMEM s 1% FBS bylo nahrazeno 20 µl stimulačního pufru, ve kterém byla provedena stimulace agonistou (1 µM TRH, 1 µM TAL, 30 minut). Stimulace buněk byla zastavena přidáním 10 µl monoklonální protilátky anti-cAMP-kryptát (donoru) a cAMP-d2 (akceptoru) ředěných v lyzačním pufru. Destičky potažené folií byly inkubované po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Měření bylo provedeno v bílých HTRF 96-jamkových destičkách na readeru CLARIOstar (BMG LABTECH, Německo). Výsledky byly zpracovány stejně jako v případě detekce IP₁.

5.13 Oxygrafické stanovení spotřeby kyslíku

Kontrolní GH1 buňky nebo buňky po siRNA inhibici β-arrestinu2 (proces popsán výše) byly ovlivněny agonisty (1 nebo 10 µM TRH nebo TAL) po dobu 30 minut, centrifugovány při 1 250 rpm po dobu 3 minut při 25 °C a naředěny v koncentraci 6×10^6 ve 100 µl bezbarvého DMEM média obohaceného o 1 mM pyruvát, 15 mM glukózu a 2 mM glutamin (pH 7,4). Mitochondriální respirace byla měřena přístrojem Oxygraph-2k (Oroboros Instruments). Základní charakteristiky činnosti mitochondriálního dýchacího řetězce byly zkoumány postupným přidáváním látek ovlivňujících různé fáze oxidativní fosforylace. Jako inhibitor syntézy ATP byl použit oligomycin (1 µM), karbonylkyanid p-trifluoromethoxyfenylhydrazon (FCCP, 175 nM) jako odpráhuující ionofor. Antimycin A (1 µM) nám sloužil k inhibici komplexu III a rotenon (1 µM)

k inhibici komplexu I. Ze získané křivky byla stanovena bazální klidová respirace, mitochondriální „leak“, maximální kapacita dýchacího řetězce a rezervní mitochondriální kapacita. Data byla zpracována programem DatLab5.

Pomocí SDS-PAGE a imunoblotingu byla provedena analýza exprese proteinů OXPHOS a bazální respirace měřena také pomocí stanovení MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay (Agilent).

5.14 MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay

Bazální respirace byla určena pomocí stanovení MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay (Agilent) založené na reakci MitoXpress Xtra s kyslíkem. V důsledku molekulových kolizí dochází ke zhášení MitoXpress Xtra kyslíkem a výsledný fluorescenční signál je pak nepřímo úměrný množství extracelulárního kyslíku ve vzorku. Míra spotřeby kyslíku (OCR, oxxygen consumption rate) je určena ze změn fluorescenčního signálu v průběhu času. GH1 buňky byly nasazeny v koncentraci 60 000 buněk do černostěnných 96-jamkových destiček a inkubovány s TRH nebo TAL (oba v koncentraci 1 μ M) po dobu 30 minut. Následně bylo médium nahrazeno 90 μ l čerstvého média a přidáno 10 μ l MitoXpress reagens. Vše bylo pokryto 2 kapkami minerálního oleje vytemperovaného na 37 °C. Zároveň se vzorky byly měřeny příslušné kontroly. Detekce byla provedena pomocí Dual-read TRF (time-resolved fluorescence) lifetime detekce, na přístroji BioTek synergy HT a Gen5 programu podle doporučení výrobce.

5.15 FACS

Množství intracelulárních ROS bylo u GH1 buněk pozorováno s použitím fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H_2DCFDA) a průtokové cytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting). GH1 buňky byly ovlivněny ligandy (1 μ M TRH nebo TAL, 30 minut) a/nebo *tert*-butyl hydroperoxidem (5-320 μ M *t*-BHP, 10 minut) a barveny 20 μ M H_2DCFDA při 37 °C po dobu 30 minut. Následně byly buňky trypsinizovány, sklizeny centrifugací (500 g, 1 min, 4 °C) a opláchnuty dvakrát v PBS. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD LSRII a data vyhodnocena programem Kaluza 2.1.

5.16 Stanovení MTT

Buněčná viabilita byla monitorována prostřednictvím MTT testu. GH1 buňky byly nasazeny na 96-jamkové destičky a po ovlivnění ligandy (1 μ M TRH nebo TAL, 30 minut) a/nebo *t*-BHP (v různých koncentracích, 10 minut) byly inkubovány v přítomnosti 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidu (MTT) v čerstvém bezbarvém DMEM obohaceném o 1% FBS po dobu 3 hodin při 37 °C. Poté bylo odsáto 85 μ l média a vzniklé krystaly formazánu rozpuštěny 10 minutovou inkubací s 50 μ l DMSO při 37 °C. Absorbance

barevného roztoku byla měřena při 540 nm a kvantifikována pomocí BioTek synergy HT spektrofotometru.

5.17 Stanovení LDH

Buněčná cytotoxicita byla stanovena pomocí stanovení LDH (Cytotoxicity detection kit^{PLUS}, Roche). Principem této metody je detekce laktátdehydrogenázy (LDH) uvolněné z cytozolu poškozených buněk do média. Jedná se o dvoukrokovou enzymatickou reakci, při které dochází k redukci 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloridu (světle žlutá barva) na formazán (červená). GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti TRH, TAL (oba 1 μ M, 30 minut) a/nebo *t*-BHP (v různých koncentracích, 10 minut) v médiu obohaceném o 1% FBS. Poté bylo k buňkám přidáno 100 μ l reakčního mixu a destička byla ponechána ve tmě po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním 50 μ l stop solution a jemným mícháním po dobu 10 sekund. Absorbance byla čtena při 490 nm a 630 nm (referenční vlnová délka) na spektrofotometru BioTek synergy HT.

5.18 Měření celkové antioxidační kapacity

Schopnost antioxidantů, přítomných v buněčných homogenátech, zabránit oxidaci 2,2-azino-di-3-ethylbenzthiazolin sulfonátu (ABTS) na stabilní radikálový kation byla studována pomocí Total antioxidant capacity assay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). GH1 buňky byly pěstovány v 12-jamkových destičkách, ovlivněny ligandy po dobu 30 minut a sklizeny centrifugací (1 000 g, 10 minut, 4 °C). Pelet byl následně sonikován (3x po dobu 10 sekund, 50 % power) na ledu v 250 μ l chlazeného pufru Antioxidant assay buffer a vzniklý homogenát byl stočen při 10 000 g po dobu 15 minut při 4 °C. Pro vlastní experiment bylo smícháno 10 μ l supernatantu s 10 μ l metmyoglobinu a 150 μ l chromogenu. Po přidání 40 μ l pracovního roztoku peroxidu vodíku byla destička inkubována na třepačce za pokojové teploty po dobu 5 minut. Absorbance byla měřena při 750 nm na spektrofotometru BioTek synergy HT. Jako standard byl použit trolox, výsledky byly vyjádřeny jako antioxidační kapacita ekvivalentní k troloxu (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC, μ M/l).

5.19 Fosfoproteomická analýza

Kontrolní GH1 buňky, buňky podrobené snížení exprese β -arrestinu2 pomocí siRNA inhibice a/nebo ovlivněné agonisty (TRH nebo TAL o koncentraci 1 μ M, po dobu 30 minut) byly stočeny (1 800 rpm, 10 minut, 4 °C, Hettich Universal 320) a opláchnuty v PBS. Vzniklý pelet buněk (přibližně 500 μ g proteinu) byl zamražen v dusíku a takto nachystané vzorky analyzované pomocí LC-MS techniky a bioinformaticky zpracované pomocí softwarových platforem MaxQuant a Perseus. Rozdíly ve fosforylacích proteinů mezi porovnávanými skupinami byly definovány jako kvalitativní nebo kvantitativní. Za kvalitativní byla považována změna, pokud byly proteiny

detekované pouze v jedné experimentální skupině ze dvojice porovnávaných a alespoň ve dvou vzorcích biologického triplikátu. Jako kvantitativní byla označena změna, kdy byl detekován alespoň dvojnásobný rozdíl ve fosforylaci mezi porovnávanými skupinami a zároveň byl protein detekován alespoň ve dvou vzorcích z biologického triplikátu. Soubory takto změněných fosfoproteinů pro každou experimentální skupinu byly dále hodnoceny v GO (Gene Ontology) analýze pomocí databáze DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery), ze všech detekovaných biologických procesů jsme se zaměřili na procesy související s GTPázovou aktivitou, fosforylací a signalizací prostřednictvím MAP kináz. Interakce mezi proteiny byly vizualizovány pomocí STRING (**S**earch **T**ool for the **R**etrieval of **I**nteracting **G**enes/**P**roteins) databáze.

5.20 Analýza dat

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). Data pro jednotlivé analýzy pocházejí z minimálně tří na sobě nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu dat byl použit software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) s využitím nepárového Studentova t-testu nebo jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s následným Bonferroniho testem. V případě měření vápníkových odpovědí, z důvodu velké variability buněčných odpovědí, byla data ověřena na normalitu a na základě výsledků byla použita neparametrická jednofaktorová analýza rozptylu pro nezávislá měření (ANOVA, Kruskal-Wallisův test) s následným Dunnovým testem. Statistická významnost byla určena na hladině $p < 0,05$.

Obrázky použité v literární části a ve výsledcích fosfoproteomické studie byly vytvořeny pomocí online software biorender.com.

6. Výsledky

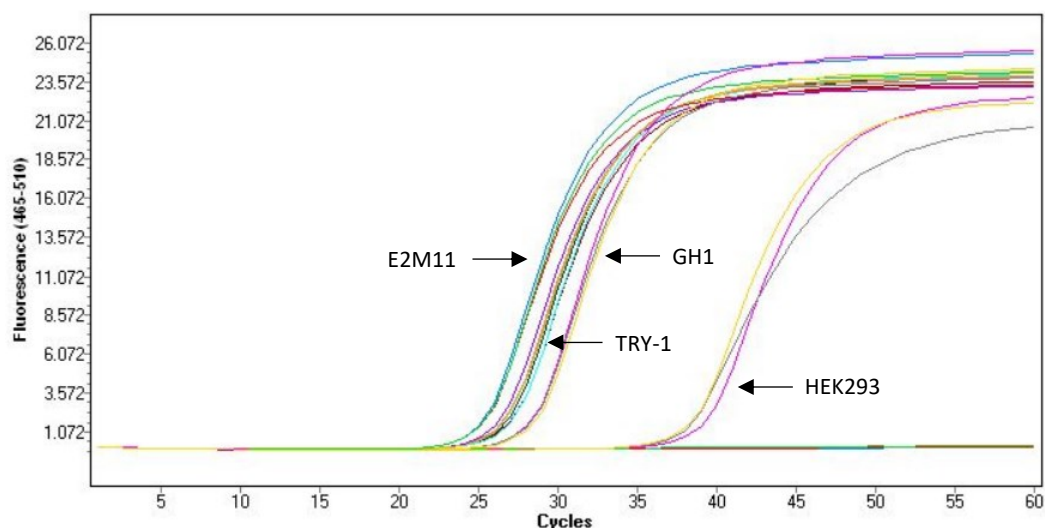
6.1 Cíl 1: Vliv vybraných signálních molekul na chování TRH receptoru v plazmatické membráně

6.1.1 Charakterizace TRY-1 buněčné linie

S použitím klonovacích technik a průtokové cytometrie jsme z heterogenní směsi buněk získali 9 buněčných linií exprimujících TRH-R na C-konci značený YFP (TRH-R-YFP). Na základě pečlivé mikroskopické analýzy (kdy byl sledován zejména tvar buněk, rychlost jejich dělení či lokalizace TRH-R v buňce) byla vybrána pouze jedna buněčná linie a nazvána TRY-1. Pomocí real-time RT-PCR a stanovením exprese TRH-R pomocí imunoblotingu byla u této linie porovnávána hladina TRH-R s dalšími buněčnými liniemi. Funkčnost receptoru v TRY-1 linii byla ověřena pomocí stimulace TRH a jeho vlivem na výlev vápníku.

6.1.1.1 Porovnání exprese TRH-R pomocí real-time PCR

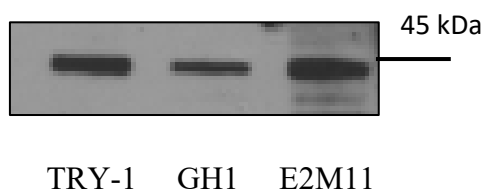
Pomocí real-time PCR a specifické próby proti TRH-R byla porovnána exprese TRH-R v TRY-1 buněčné linii, v E2M11 buněčné linii, GH1 buněčné linii a HEK293 buňkách (obr. 7). Základem E2M11 buněk jsou buňky HEK293 exogenně exprimující velké množství TRH-R. Naproti tomu GH1 buněčná linie, odvozená od nádoru adenohypofýzy potkana, vykazuje relativně vysokou úroveň endogenního TRH-R a patří mezi primární cílové buňky pro hormon TRH. Obě zmíněné linie nám sloužily jako pozitivní kontrola. Jako negativní kontrolu jsme použili buňky HEK293, neboť u nich TRH-R pravděpodobně není endogenně vůbec exprimován (Atwood *et al.*, 2011). Ukázalo se, že TRY-1 buňky vykazovaly relativně vysokou úroveň exprese TRH-R oproti kontrolním HEK293 buňkám. Zároveň byly hladiny TRH-R u TRY-1 linie o něco nižší než v případě exogenně exprimovaného receptoru v E2M11 buňkách a o něco vyšší než v případě endogenního receptoru GH1 buněk (obr. 7).



Obr. 7: Graf z real-time PCR znázorňující amplifikační křivky odrážející expresi TRH-R v TRY-1, E2M11, GH1 a HEK293 buňkách.

6.1.1.2 Porovnání exprese TRH-R pomocí imunoblotingu

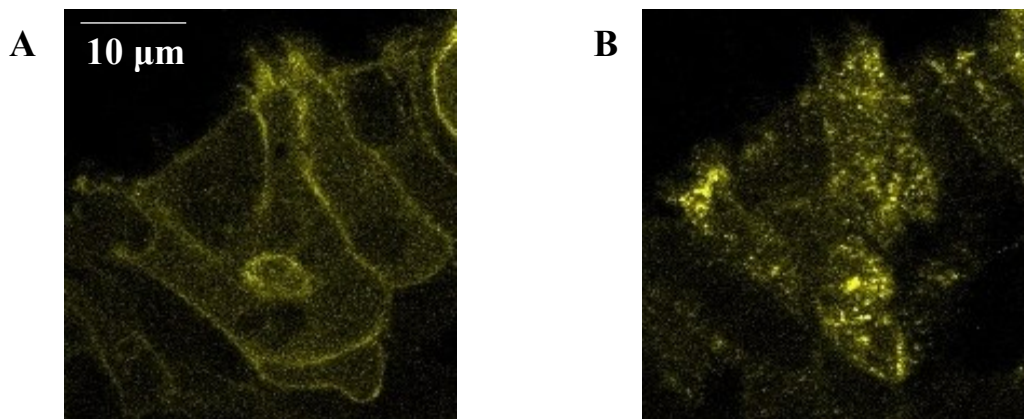
Hladiny exprese TRH-R u TRY-1 linie byly porovnány s expresí tohoto proteinu u GH1 linie a E2M11 linie pomocí specifických protilátek proti TRH-R. Z obrázku č. 8 je patrné, že úroveň exprese TRH-R je v TRY-1 linii vyšší (zhruba o 50 %) než u linie GH1, kde je TRH-R exprimován přirozeně. Naproti tomu je množství TRH-R u TRY-1 linie v porovnání s linií E2M11 mírně nižší (zhruba o 30 %).



Obr. 8: Detekce TRH-R v liniích TRY-1, GH1 a E2M11. Znázorněn je reprezentativní imunoblot ze tří nezávislých pokusů.

6.1.1.3 Mikroskopická analýza

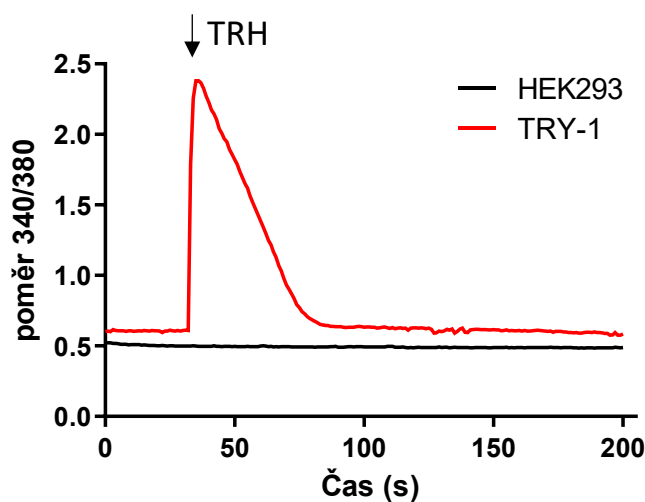
Expres a lokalizace TRH-R-YFP v rámci buněčné linie TRY-1 byla ověřena pomocí konfokálního mikroskopu. Z obr. 9A je patrné, že fluorescenčně značený receptor se nachází v plazmatické membráně buněk. Po aplikaci 10 μ M TRH docházelo k internalizaci receptoru (obr. 9B).



Obr. 9: Mikroskopická analýza TRH-R-YFP. (A) Reprezentativní obrázek TRY-1 buněčné linie pořízený fluorescenčním konfokálním mikroskopem znázorňující distribuci TRH-R značeného žlutým fluorescenčním proteinem v plazmatické membráně. (B) Aplikace TRH navodila masivní translokaci TRH-R-YFP z plazmatické membrány do vnitřku buněk. Snímek je pořízený po 10 minutách od aplikace agonisty.

6.1.1.4 Cytoplazmatická koncentrace vápenatých iontů

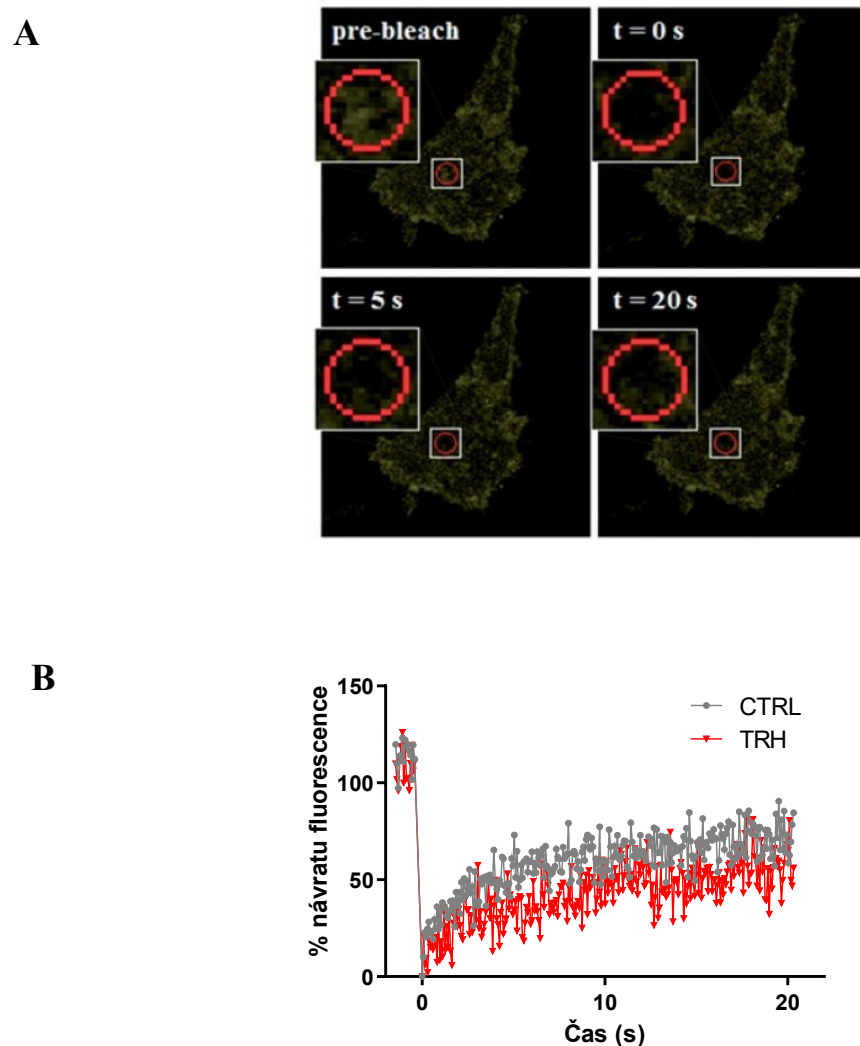
K ověření, zda je transfekovaný TRH-R v buňkách plně funkční, byla použita reakce receptoru na stimulaci TRH s následným výlevem vápníku (obr. 10). Jako negativní kontrola nám opět posloužily HEK293 buňky. Po stimulaci TRY-1 buněk pomocí ligandu TRH došlo k okamžitému nárůstu v poměru intenzit fluorescence Fura-2AM po excitaci 340 a 380 nm, což odpovídá zvýšení koncentrace vápníku v cytoplazmě. Aplikací TRH k HEK293 buňkám nedošlo k žádné změně v intenzitě fluorescence vápníkového indikátoru Fura-2AM.



Obr. 10: Vápníková odpověď na stimulaci TRH u HEK293 a TRY-1 buněk. Křivky představují změnu v intenzitě fluorescence vápníkového indikátoru Fura-2AM detekované u netransfekovaných HEK293 buněk (černá linka) a u buněk transfekovaných TRH-R-YFP (červená linka) po stimulaci 10 µM TRH. Nárůst v intenzitě fluorescence odpovídá zvýšení hladin volného cytoplazmatického vápníku. Znáznorněn je reprezentativní graf z měření alespoň 30 buněk v každém ze tří nezávislých pokusů.

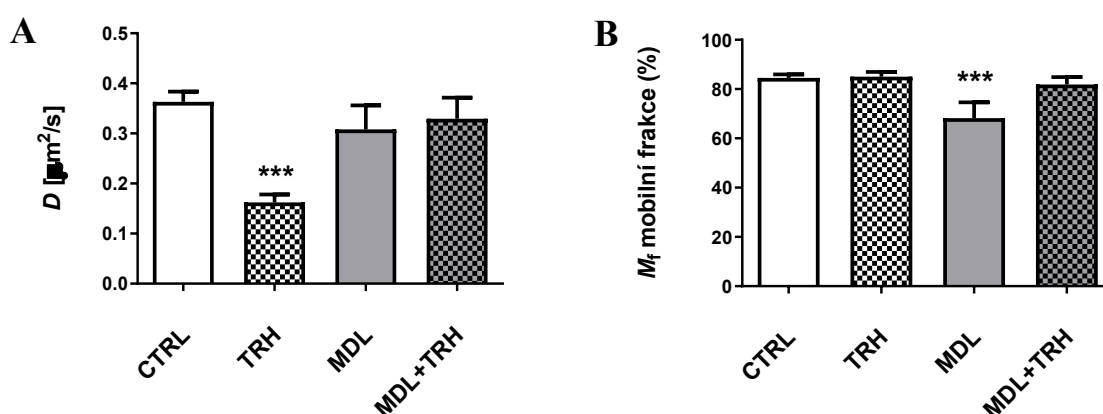
6.1.2 Vliv TRH na laterální mobilitu TRH-R

Pomocí konfokálního mikroskopu a metody FRAP byl studován účinek vazby ligandu na laterální difúzi TRH-R v plazmatické membráně TRY-1 buněk. Obr. 11A znázorňuje průběh typického FRAP experimentu. Obr. 11B pak představuje reprezentativní křivky návratu fluorescence po fotovybělení pro kontrolní buňky a buňky po stimulaci TRH.



Obr. 11: Schematické zobrazení typického FRAP experimentu. (A) Analýza fotovybělení fluorescence u TRY-1 buněk. Obrázky byly pořízeny zaostřením na spodní membránu na sklíčku a ukazují rozložení fluorescenčního signálu TRH receptoru před fotovybělením (pre-bleach), na konci fotovybělení ($t=0$ s) a v dalších časových úsecích po fotovybělení (5 s a 20 s). Vybělená plocha je označena červeným kruhem o velikosti 2 μ m. Oblasti, kde došlo ke změnám v intenzitě fluorescence způsobené fotovybělením a následnou laterální difúzí, jsou pro lepší viditelnost zvětšeny v rámečcích. (B) Reprezentativní křivka ukazující obnovení fluorescence díky transportu TRH-R-YFP z okolí. Graf ukazuje časovou závislost změn v intenzitě fluorescence v oblasti vybělené zaostřeným laserovým paprskem pro kontrolní buňku (CTRL) a pro buňku stimulovanou TRH.

Při studiu laterální pohyblivosti TRH-R v membráně TRY-1 buněk jsme porovnávali vliv TRH a také inhibiční účinek antagonisty TRH-R, MDL, na dva základní difúzní parametry: difúzní koeficient a mobilní frakci. Jak je vidět na obr. 12A, TRH snížil difúzní koeficient TRH-R o více než polovinu (o 55,6 %) oproti kontrole a jeho efekt byl zablokovan působením MDL. Aplikace antagonisty neměla na velikost difúzního koeficientu žádný vliv. Část molekul, které se účastní difúzní výměny, tzv. mobilní frakce, se po aplikaci TRH v porovnání s kontrolou nezměnila. Tento hormon však dokázal zvrátit pokles (o 20 % vůči kontrole) v mobilní frakci způsobený aplikací MDL (obr. 12B). Tabulka 8 ukazuje hodnoty difúzních koeficientů a mobilních frací naměřených pro kontrolní a agonistou a/nebo antagonistou stimulované buňky.



Obr. 12: Vliv vazby agonisty a/nebo antagonisty k TRH receptoru značenému fluorescenčním proteinem na jeho laterální pohyblivost v membráně. Experimenty byly prováděny na kontrolních (nestimulovaných) TRY-1 buňkách a na buňkách vystavených 10 µM TRH (agonista) nebo 100 µM MDL (antagonista). Ligandy byly přidávány do kultivačního média vždy 5 minut před začátkem měření a buňky byly v jejich přítomnosti po celou dobu experimentu. V případě, že byl měřen vliv kombinace obou ligandů, MDL byl aplikován 5 minut před stimulací TRH. Hodnoty difúzních koeficientů (A) a mobilních frací (B) byly získány z naměřených dat proložení křivky s použitím dvoukomponentového modelu. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z měření minimálně 30 buněk z minimálně tří nezávislých pokusů, ****p* < 0,001 versus kontrolní nestimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Tab. 8: Parametry laterální difúze TRH-R-YFP v plazmatické membráně TRY-1 buněk po stimulaci ligandy

| Testované podmínky | <i>D</i> (µm ² /s) | <i>M_f</i> (%) |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------|
| kontrola | 0,36 ± 0,02 | 85 ± 1 |
| + TRH | 0,16 ± 0,01*** | 85 ± 2 |
| + MDL | 0,31 ± 0,04 | 68 ± 4*** |
| + MDL + TRH | 0,33 ± 0,04 | 80 ± 3 |

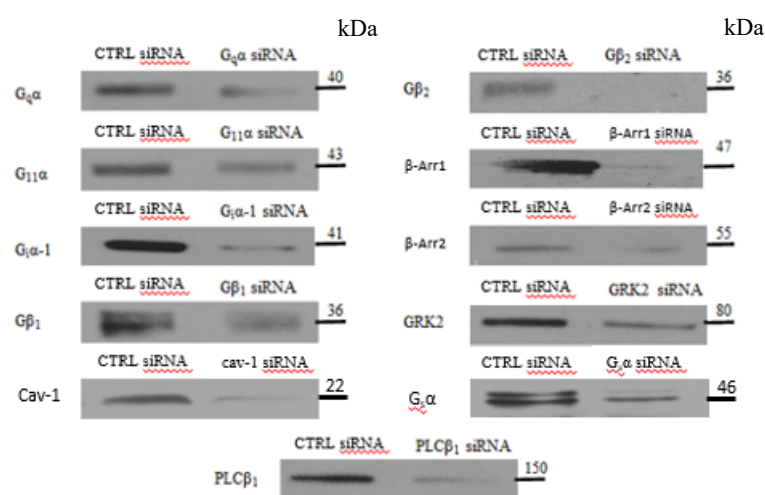
Hodnoty difúzních koeficientů (*D*) a mobilních frací (*M_f*) pro TRH-R-YFP byly získány z dat z měření FRAP odpovědí získaných z alespoň 30 buněk ve třech nezávislých měření. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM. ****p* < 0,001 versus kontrolní buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

6.1.3 Vliv vybraných signálních molekul na laterální mobilitu TRH-R

Na buněčné linii TRY-1 jsme studovali význam vybraných signálních proteinů pro signalizaci TRH-R. Zejména nás zajímal vliv příslušných molekul na mobilitu TRH-R v plazmatické membráně.

6.1.3.1 Ověření siRNA inhibice

Pro studium vlivu jednotlivých proteinů na signální dráhu TRH-R byla použita metoda siRNA inhibice. Pomocí této metody v kombinaci s SDS-PAGE elektroforézou bylo ověřeno, že veškeré námi použité siRNA jsou schopny signifikantně snížit expresi daného proteinu v buněčné linii TRY-1 (obr. 13). Znárodněny jsou imunoblotty pro všechny použité siRNA souhrnně pro všechny experimenty provedené na TRY-1 buňkách.



Obr. 13: Reprezentativní imunoblotty ukazující změny v genové expresi vybraných signálních proteinů u TRY-1 buněčné linie po siRNA inhibici. Pro potlačení genové exprese vybraných proteinů byly buňky transfekovány konkrétními siRNA jak je popsáno v metodické části práce. Dva dny po transfekci byly buněčné homogenáty (20 μ g proteinů) rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti $G_{q/11\alpha}$, $G_{i\alpha-1}$, $G_{s\alpha}$, $G_{\beta 1/2}$, β -Arr1/2, GRK2, caveolinu-1 a PLC β_1 . Míra exprese po inhibici byla srovnávána s expresí daného proteinu v kontrolních buňkách transfekovaných negativní siRNA (CTRL siRNA). Znárodněny jsou reprezentativní imunoblotty ze tří nezávislých pokusů.

6.1.3.2 Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na laterální mobilitu TRH-R v plazmatické membráně

Pomocí metody FRAP byl dále studován účinek siRNA inhibice specifických vybraných proteinů souvisejících se signalizací TRH-R na laterální difúzi tohoto receptoru v plazmatické membráně buněk TRY-1. Hodnoty difúzních koeficientů a mobilních frakcí jsou pro přehlednost uvedeny v následujících tabulkách. Je patrné, že samotná inhibice $G_{q/11\alpha}$ proteinů (tabulka 9), G_{β} proteinů (tabulka 10), β -arrestinu2, GRK2 nebo PLC β_1 (tabulka 11), vedla k poklesu v hodnotě difúzního koeficientu oproti kontrolním buňkám. Následná stimulace TRH tuto hodnotu ještě více

snížila. Inhibice některých proteinů měla vliv také na velikost mobilní frakce. Její změna (pokles) byla nejvíce patrná při snížené expresi pro $G_i\alpha$ -1 protein (tabulka 9) a pro β -arrestin1 (tabulka 11). V případě snížení exprese $G_i\alpha$ -1 proteinu byl pokles po stimulaci TRH ještě markantnější (o více než 41 % oproti kontrole). V případě následné aplikace TRH po siRNA inhibici ostatních sledovaných G proteinů se hodnota mobilní frakce signifikantně zvýšila (tabulky 9 a 10).

Tab. 9: Vlastnosti laterální difúze TRH-R-YFP v plazmatické membráně TRY-1 buněk po inhibici vybraných Ga proteinů

| Testované podmínky | D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | M_f (%) |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| kontrola | $0,36 \pm 0,02$ | 85 ± 1 |
| + TRH | $0,16 \pm 0,01^{***}$ | 85 ± 2 |
| $G_q\alpha^{(1)}$ | $0,23 \pm 0,02^{***}$ | $77 \pm 3^{**}$ |
| $G_q\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,15 \pm 0,02^{***/\#\#}$ | $83 \pm 3^\#$ |
| $G_{11}\alpha^{(1)}$ | $0,23 \pm 0,03^{***}$ | $79 \pm 2^*$ |
| $G_{11}\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,16 \pm 0,02^{***/\#}$ | $85 \pm 3^\#$ |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)}$ | $0,25 \pm 0,03^{**}$ | $79 \pm 3^*$ |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,20 \pm 0,03^{***}$ | $89 \pm 3^\#$ |
| $G_i\alpha$ -1 ⁽¹⁾ | $0,35 \pm 0,03$ | $76 \pm 3^{**}$ |
| $G_i\alpha$ -1 ⁽¹⁾ + TRH | $0,21 \pm 0,04^{**/\#}$ | $50 \pm 6^{***/\#\#\#}$ |

Hodnoty difúzních koeficientů (D) a mobilních frakcí (M_f) pro TRH-R-YFP byly získány z dat z měření FRAPových odpovědí získaných z alespoň 30 buněk ve třech nezávislých měřeních. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus buňky inhibované příslušnou siRNA. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na pohyblivost TRH-R v plazmatické membráně byla použita one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem, pro porovnání vlivu siRNA inhibice určitého proteinu na pohyblivost TRH-R po aktivaci TRH byl použit nepárový Studentův t -test. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

Tab. 10: Vlastnosti laterální difúze TRH-R-YFP v plazmatické membráně TRY-1 buněk po inhibici G β proteinů

| Testované podmínky | D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | M_f (%) |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| kontrola | $0,36 \pm 0,02$ | 85 ± 1 |
| + TRH | $0,16 \pm 0,01^{***}$ | 85 ± 2 |
| $G\beta_1^{(1)}$ | $0,28 \pm 0,02^*$ | 84 ± 3 |
| $G\beta_1^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,16 \pm 0,02^{***/\#\#\#}$ | $91 \pm 2^{*/\#}$ |
| $G\beta_2^{(1)}$ | $0,25 \pm 0,03^{**}$ | 88 ± 2 |
| $G\beta_2^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,12 \pm 0,02^{***/\#\#\#}$ | 89 ± 3 |
| $G\beta_{1/2}^{(1)}$ | $0,25 \pm 0,02^{**}$ | $77 \pm 3^*$ |
| $G\beta_{1/2}^{(1)} + \text{TRH}$ | $0,19 \pm 0,02^{**/\#}$ | $84 \pm 3^\#$ |

Hodnoty difúzních koeficientů (D) a mobilních frakcí (M_f) pro TRH-R-YFP byly získány z dat z měření FRAPových odpovědí získaných z alespoň 30 buněk ve třech nezávislých měřeních. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus buňky inhibované příslušnou siRNA. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na pohyblivost TRH-R v plazmatické membráně byla použita one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem, pro porovnání vlivu siRNA inhibice určitého proteinu na pohyblivost TRH-R po aktivaci TRH byl použit nepárový Studentův t -test. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

Tab. 11: Vlastnosti laterální difúze TRH-R-YFP v plazmatické membráně TRY-1 buněk po inhibici dalších proteinů významných v signalizaci TRH-R

| Testované podmínky | D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | M_f (%) |
|---|----------------------------------|------------------|
| kontrola | $0,36 \pm 0,02$ | 85 ± 1 |
| + TRH | $0,16 \pm 0,01^{***}$ | 85 ± 2 |
| β -arrestin1 ^(\downarrow) | $0,41 \pm 0,04$ | $69 \pm 4^{***}$ |
| β -arrestin1 ^(\downarrow) + TRH | $0,19 \pm 0,03^{***/###}$ | $66 \pm 6^{***}$ |
| β -arrestin2 ^(\downarrow) | $0,27 \pm 0,02^*$ | 83 ± 2 |
| β -arrestin2 ^(\downarrow) + TRH | $0,17 \pm 0,03^{***/##}$ | $91 \pm 2^{*/#}$ |
| GRK 2 ^(\downarrow) | $0,30 \pm 0,03$ | 81 ± 2 |
| GRK 2 ^(\downarrow) + TRH | $0,21 \pm 0,03^{***/#}$ | 81 ± 3 |
| PLC β_1 ^(\downarrow) | $0,27 \pm 0,02^{**}$ | 84 ± 2 |
| PLC β_1 ^(\downarrow) + TRH | $0,18 \pm 0,02^{***/###}$ | 83 ± 3 |

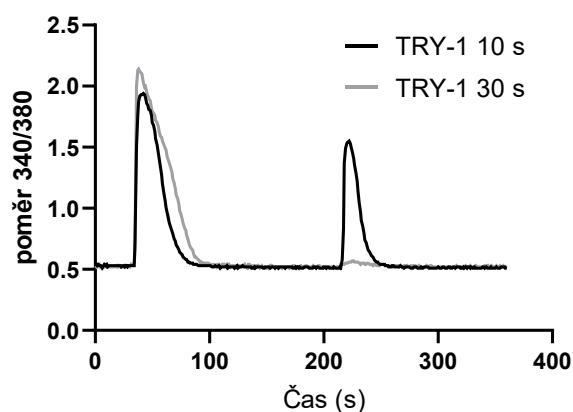
Hodnoty difúzních koeficientů (D) a mobilních frakcí (M_f) pro TRH-R-YFP byly získány z dat z měření FRAPových odpovědí získaných z alespoň 30 buněk ve třech nezávislých měřeních. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ versus kontrolní buňky. $^{\#}p < 0,05$, $^{##}p < 0,01$, $^{###}p < 0,001$ versus buňky inhibované příslušnou siRNA. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na pohyblivost TRH-R v plazmatické membráně byla použita one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem, pro porovnání vlivu siRNA inhibice určitého proteinu na pohyblivost TRH-R po aktivaci TRH byl použit párový Studentův t -test. ^(\downarrow) siRNA inhibice

6.2 Cíl 2: Vliv vybraných signálních molekul na funkční stav signalizace TRH receptoru

6.2.1 Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii TRY-1

Signalizační dráha vedoucí od aktivovaného TRH-R pokračuje přes $G_{q/11\alpha}$ protein, který následně aktivuje PLC β , a v konečném důsledku dochází k nárůstu koncentrace vápníku v cytozolu. Zaměřili jsme se proto na monitorování intracelulární koncentrace vápníku u TRY-1 buněk po stimulaci hormonem TRH (1 μ M) při dvou různých stimulačních dobách (10 s a 30 s, přičemž druhá stimulace byla vždy 10 s a mezi jednotlivými odpověďmi byly vždy ponechány tři minuty, během kterých byl odmyt veškerý hormon a hladina vápníku se dostala zpět na původní úroveň) a po cílené inhibici specifických proteinů ze signalizační dráhy TRH-R pomocí fluorescenční mikroskopie a vápníkového indikátoru Fura-2AM. Zaznamenáván byl poměr intenzit fluorescence při excitaci 340 a 380 nm před a po aplikaci TRH. Sledované parametry byly zejména velikost první odpovědi (a tedy množství uvolněného vápníku) po stimulaci TRH a míra desenzitizace receptoru.

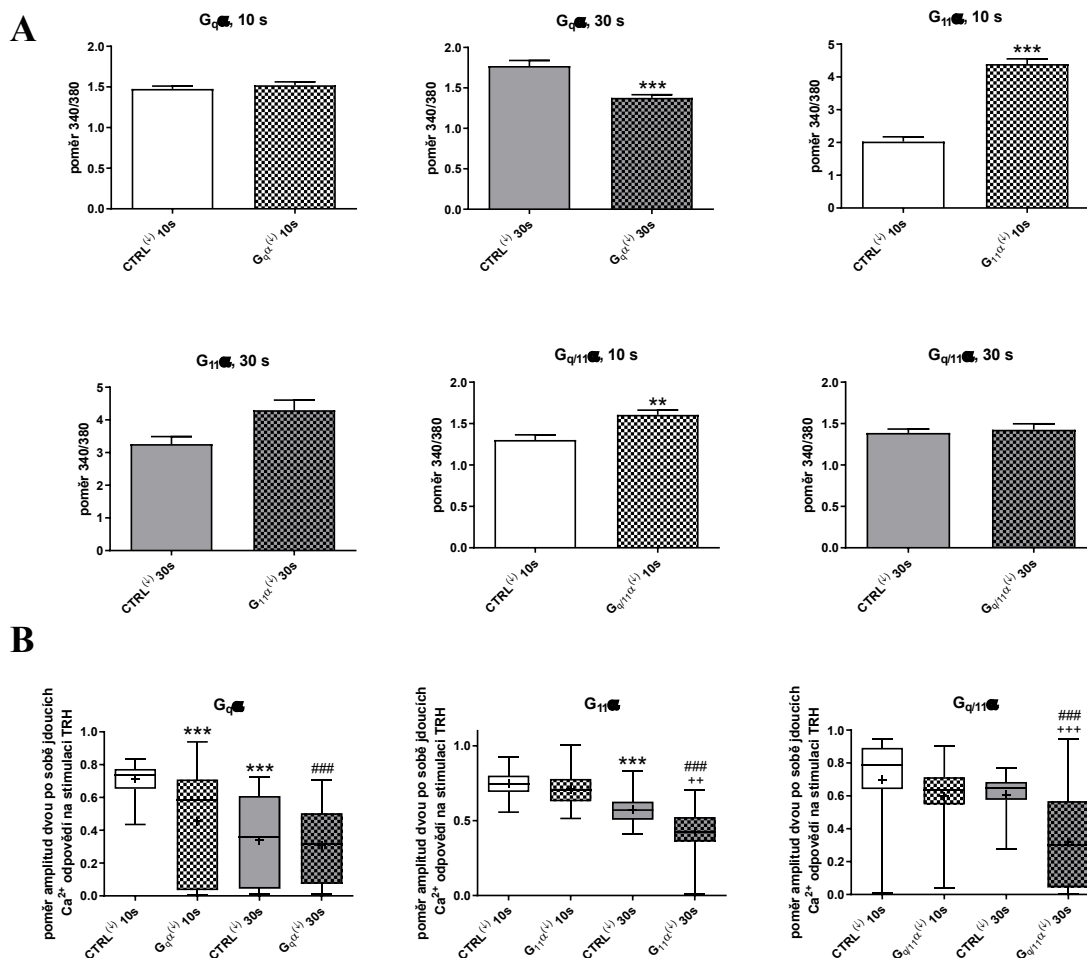
Při porovnání vlivu délky stimulace na míru desenzitizace TRH-R je z grafu na obr. 14 zřejmé, že počáteční kratší desetisekundová stimulace TRH vedla k daleko větší druhé odpovědi na hormon než v případě delší třicetisekundové stimulace. V případě desetisekundové stimulace došlo tedy pouze k mírné desenzitizaci membránových receptorů. Naproti tomu, po třicetisekundové stimulaci byl receptor na další aplikaci TRH téměř necitlivý. Délka počáteční stimulace hormonem měla tedy zásadní vliv na velikost druhé odpovědi.



Obr. 14: Reprezentativní graf vápníkové odpovědi na stimulaci TRH u TRY-1 buněk. Křivky představují změnu v intenzitě fluorescence vápníkového indikátoru Fura-2AM detekovanou u buněk transfekovaných TRH-R-YFP po stimulaci 1 μ M TRH po dobu 10 s (černá křivka) nebo 30 s (šedivá křivka). Nárůst v intenzitě fluorescence odpovídá zvýšení hladin volného cytoplazmatického vápníku. Graf znázorňuje typický průběh odpovědi buňky na 10s nebo 30s aplikaci TRH, měřeno bylo vždy alespoň 15 buněk v každém ze tří nezávislých pokusů.

Při studiu vlivu inhibice proteinů důležitých pro signalizaci a downregulaci TRH-R jsme získali několik kontroverzních výsledků. Pokud byly buňky stimulovány 1 μM TRH po dobu 10 s po předchozím potlačení exprese $G_{q\alpha}$ podjednotky heterotrimerního G proteinu, nedošlo k žádné změně ve velikosti první odpovědi na hormon a tudíž ke změně koncentrace vápníku v buňkách oproti buňkám kontrolním (obr. 15A). Pokud byla stimulace buněk se sníženou expresí $G_{q\alpha}$ podjednotky prodloužena na 30 s, byl pozorován signifikantní pokles v koncentraci vápníku v cytoplazmě oproti kontrolním buňkám. Naproti tomu u buněk s potlačenou expresí $G_{11\alpha}$ podjednotky vedla desetisekundová i třicetisekundová stimulace 1 μM TRH ke zvýšení amplitudy fluorescence v porovnání s kontrolními buňkami a tedy k většímu vyplavování vápníku z vnitřních buněčných zásobáren. V případě desetisekundové stimulace byl tento nárůst signifikantní. Intenzita fluorescence po aplikaci TRH a tedy množství vylitého vápníku v buňkách bylo pozorováno také při současném potlačení $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ podjednotek. V tomto případě rovněž došlo po desetisekundové stimulaci TRH k signifikantnímu nárůstu intracelulární koncentrace vápníku u buněk se sníženou expresí $G_{q/11\alpha}$ proteinů v porovnání s buňkami kontrolními. Při třicetisekundové aplikaci hormonu už rozdíl ve velikosti první odpovědi mezi kontrolními a transfekovanými buňkami nebyl viditelný.

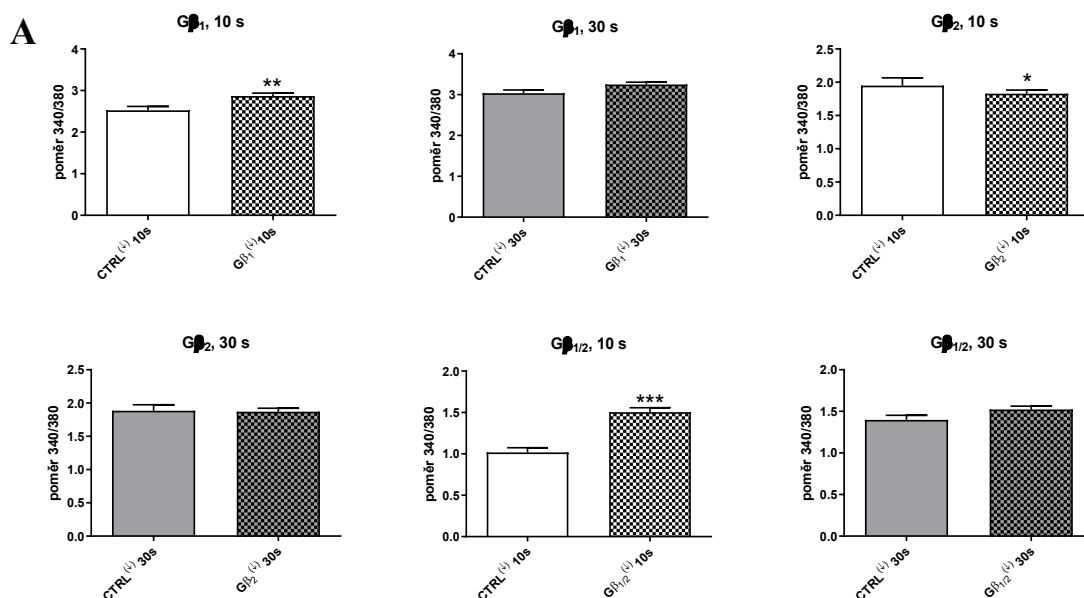
Míra desenzitizace receptoru byla hodnocena jako poměr velikosti amplitud po první a druhé odpovědi na TRH, přičemž druhá odpověď byla vždy desetisekundová. Při měření na buňkách transfekovaných siRNA proti $G_{q\alpha}$ podjednotce se po desetisekundových aplikacích hormonu poměr velikosti amplitud druhé ku první odpovědi oproti kontrolním buňkám signifikantně snížil, což by poukazovalo na větší desenzitizaci (obr. 15B). Při první stimulaci TRH po dobu 30 sekund a následné desetisekundové aplikaci tohoto hormonu nedošlo k žádné změně při porovnání poměrů obou amplitud vápníkových odpovědí transfekovaných buněk oproti kontrolním buňkám. Pokud byla snížena exprese $G_{q\alpha}$ nebo $G_{q/11\alpha}$ podjednotek současně, došlo k poklesu poměru druhé ku první odpovědi po třicetisekundové stimulaci TRH ve srovnání s příslušnými kontrolními měřeními, desetisekundová aplikace hormonu neměla v těchto případech nijak zásadní vliv na míru desenzitizace, tedy na poměr velikostí obou amplitud v porovnání s kontrolou. Z krabicového grafu je také patrné, že variabilita, s jakou jednotlivé buňky reagovali na aplikaci hormonu a následný výlev vápníku, je velmi široká i v rámci kontrolních skupin (obr. 15B).

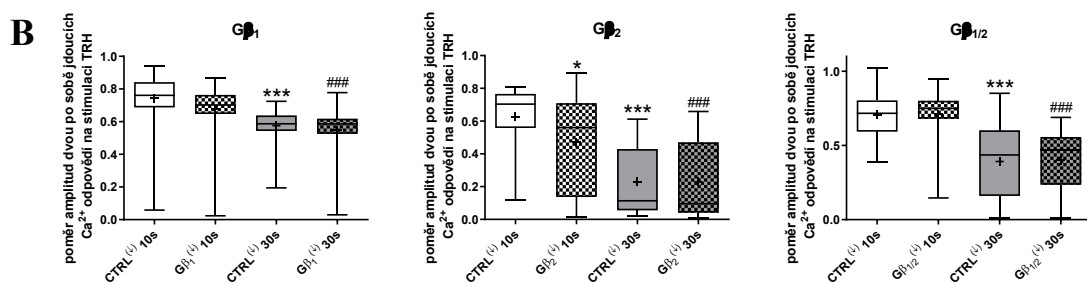


Obr. 15: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u TRY-1 buněk. (A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH (1 μ M) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, prázdné sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici vybraných α podjednotek G proteinů (šrafované sloupce, G_q α , G₁₁ α , G_{q11} α). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u TRY-1 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 10 či 30 sekund a po odmytí hormonu (3 minuty), byly buňky vystaveny jeho další desetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescencí druhé ku první odpovědi na hormon. Pro grafy A) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky, pro B) *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 10s aplikaci TRH, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 30s aplikaci TRH, ### $p < 0,001$ versus příslušné siRNA-ovlivněné buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 10s nebo 30s aplikaci TRH byl použit neparametrický t-test, pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit Kruskal-Wallisův test s následným Dunnovým testem. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

Stejným způsobem jsme porovnávali také hladinu volného vápníku v kontrolních buňkách a buňkách s potlačenou expresí podjednotek pro $G\beta$ proteiny (obr. 16). V případě třicetisekundového působení hormonu nedošlo k žádným signifikantním změnám v koncentracích vápenatých iontů při porovnání velikosti amplitud prvních odpovědí. K významným změnám v poměrech intenzit fluorescence při excitaci vlnovými délkami 340/380 nm však došlo, jestliže byly buňky vystaveny desetisekundové aplikaci TRH. Pokud byla snížena exprese samotné $G\beta_1$ podjednotky nebo obou $G\beta$ proteinů zároveň, amplituda první odpovědi na hormon a tedy koncentrace vápníku v těchto buňkách vzrostla oproti buňkám kontrolním. V případě umlčení $G\beta_2$ podjednotky se velikost první amplitudy, odpovídající hladinám vápníku v cytoplazmě, oproti kontrole naopak zmenšila (obr. 16A).

Porovnáním velikostí dvou po sobě jdoucích stimulací TRH byla signifikantní změna oproti kontrole pozorována pouze v případě snížené exprese samotné $G\beta_2$ podjednotky a desetisekundové aplikaci hormonu. Ve všech pozorovaných případech měla vliv na citlivost receptoru na další stimulaci její původní délka spíše než samotná inhibice $G\beta$ proteinů. Pokud byla doba první stimulace 30 s, došlo vždy k poklesu následné odpovědi a tedy citlivosti na hormon v porovnání s desetisekundovou stimulací (obr. 16B).

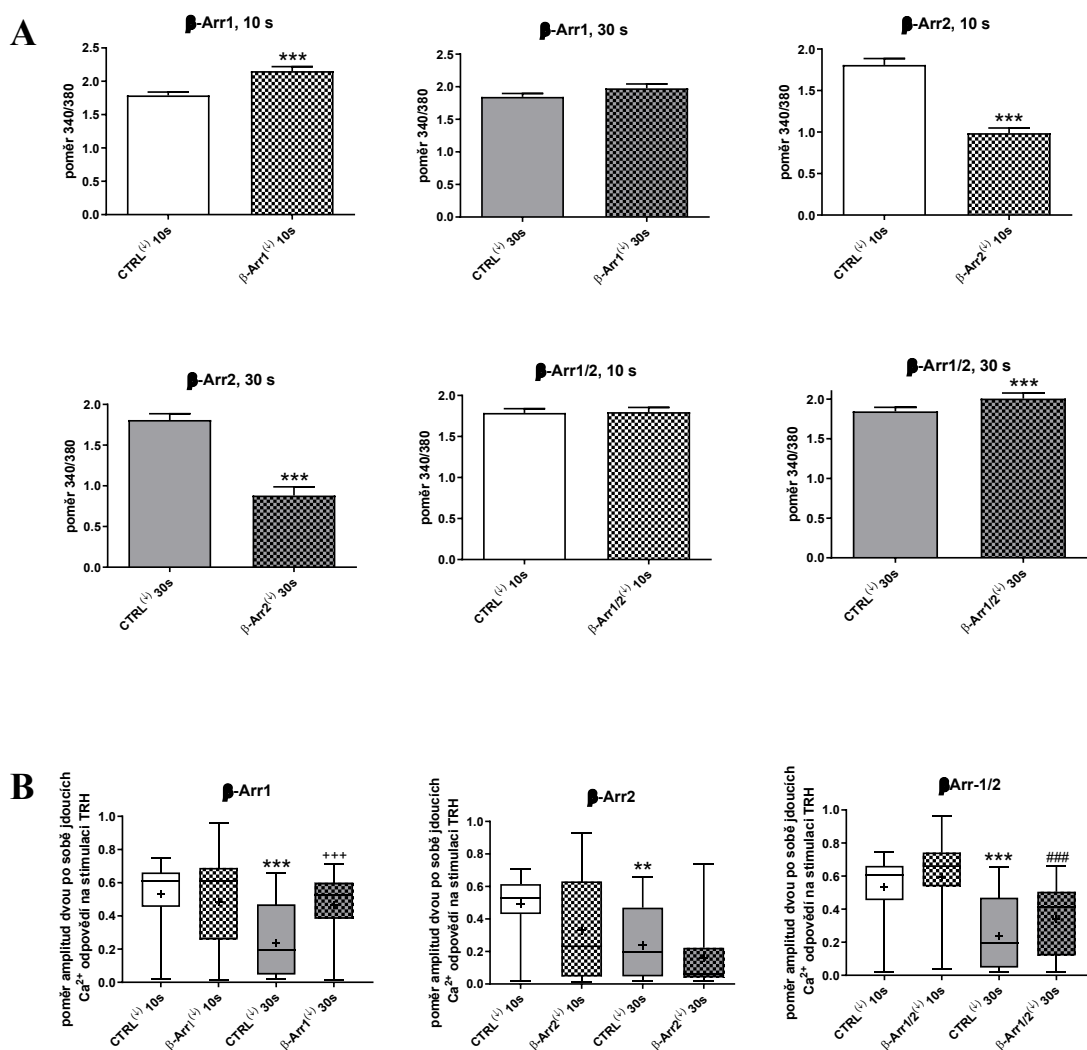




Obr. 16: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u TRY-1 buněk. (A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH (1 μ M) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, prázdné sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici β podjednotek G proteinů ($G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_{1/2}$). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u TRY-1 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 10 či 30 sekund a po odmytí hormonu (3 minuty), byly buňky vystaveny jeho další desetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescencí druhé ku první odpovědi na hormon. Pro grafy A) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky, pro B) * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 10s aplikaci TRH, ### $p < 0,001$ versus příslušné siRNA-ovlivněné buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 10s nebo 30s aplikaci TRH byl použit neparametrický t-test, pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit Kruskal-Wallisův test s následným Dunnovým testem. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

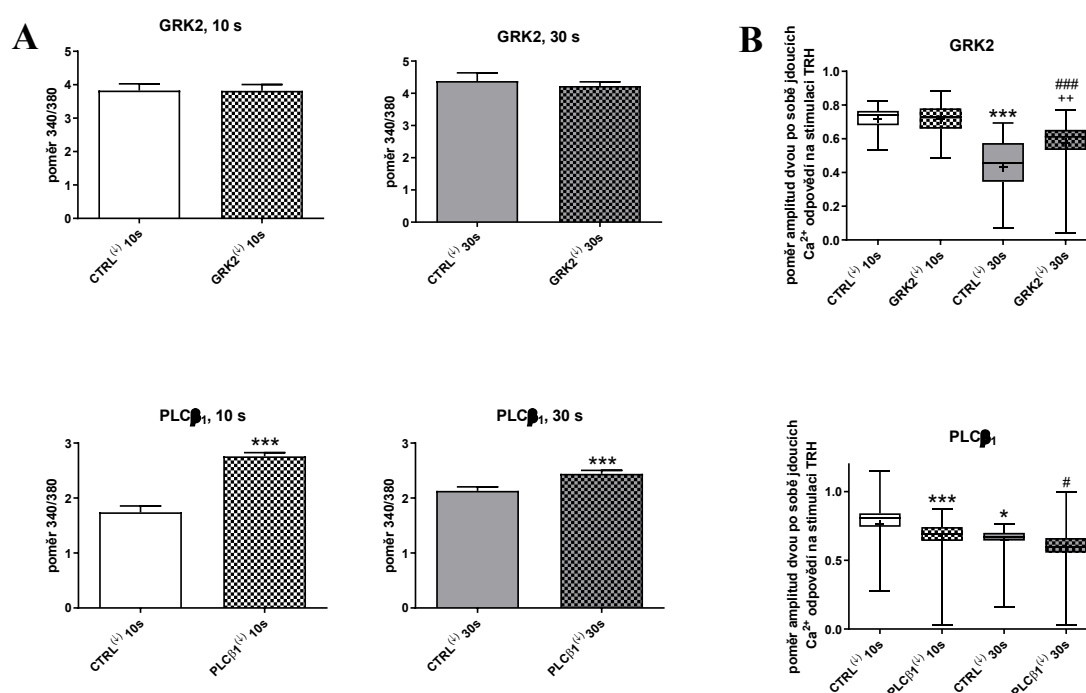
Zaměřili jsme se také na jednotlivé typy β -arrestinů (obr. 17). Tyto molekuly hrají důležitou roli v procesu internalizace receptoru. Downregulace β -arrestin1 pomocí siRNA inhibice měla za výsledek zvýšení průměrné hodnoty koncentrace vápníku v buňce po první odpovědi na hormon aplikovaný po dobu 10 sekund v porovnání s kontrolou (obr. 17A). V případě třicetisekundové aplikace hormonu ke změně nedošlo. Potlačení β -arrestinu2 došlo po stimulaci buněk TRH v obou testovaných časech k pozoruhodnému snížení amplitudy fluorescence na téměř polovinu oproti kontrolním buňkám, což představuje nižší intracelulární koncentrace vápníku. Pokud byly buňky vystaveny snížení exprese obou molekul, poměr intenzit fluorescence 340/380 nm, a tedy výlev vápníku, se signifikantně snížil oproti kontrole pouze v případě delší, třicetisekundové stimulace TRH.

Co se týče vlivu umlčení β -arrestinů na opakovanou stimulaci TRH, byl pozorován nárůst v poměru dosažených maxim oproti kontrole, znamenající menší míru desenzitizace, pokud byla snížena exprese β -arrestin1 a buňky stimulovány TRH po dobu 30 s. V jiných případech k signifikantním změnám nedošlo (obr. 17B).



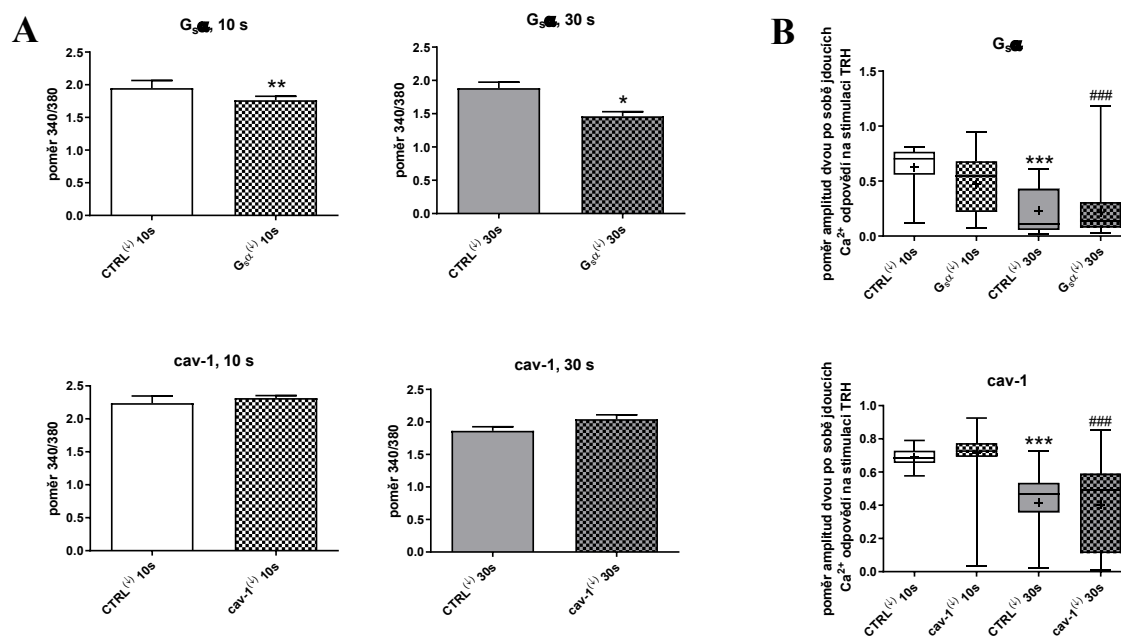
Obr. 17: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u TRY-1 buněk. (A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH (1 μ M) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, prázdné sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici β -arrestin1 a β -arrestin2 (šrafované sloupce, β -arrestin1 a β -arrestin2). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u TRY-1 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 10 či 30 sekund a po odmytí hormonu (3 minuty), byly buňky vystaveny jeho další desetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescence druhé ku první odpovědi na hormon. Pro grafy A) $***p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky, pro B) $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 10s aplikaci TRH, $+++p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 30s aplikaci TRH, $###p < 0,001$ versus příslušné siRNA-ovlivněné buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 10s nebo 30s aplikaci TRH byl použit neparametrický t-test, pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit Kruskal-Wallisův test s následným Dunnovým testem. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

V rámci signální dráhy TRH-R jsme se zaměřili také na dva významné enzymy – GRK2, mající úlohu při desenzitizaci GPCRs, a PLC β_1 , jako ústředního enzymu signalizace TRH-R. V případě GRK2 (obr. 18A, horní panel) nebyla pozorována žádná změna v poměrech fluorescenčních intenzit při vlnových délkách 340/380 nm, udávajících množství intracelulárního vápníku, během první stimulace TRH mezi buňkami kontrolními a buňkami po snížení exprese GRK2. Pokud byla porovnávána druhá aplikace TRH vzhledem k té první, došlo po třicetisekundovém působení TRH k významnému nárůstu v tomto poměru a tudíž TRH-R nebyl za těchto podmínek dostatečně desenzitizován (obr. 18B, horní část).



Obr. 18: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u TRY-1 buněk. (A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH (1 μ M) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, prázdné sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici GRK2 a PLC β_1 (šrafované sloupce). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u TRY-1 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 10 či 30 sekund a po odmytí hormonu (3 minuty), byly buňky vystaveny jeho další desetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescencí druhé ku první odpovědi na hormon. Pro grafy A) *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky, pro B) * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 10s aplikaci TRH, ++ $p < 0,01$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 30s aplikaci TRH, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus příslušné siRNA-ovlivněné buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 10s nebo 30s aplikaci TRH byl použit neparametrický t-test, pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit Kruskal-Wallisův test s následným Dunnovým testem. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

Jestliže jsme cíleně snížili v buňkách expresi PLC β_1 , velikost amplitudy odrážející koncentraci vápníku v buňce se po první aplikaci TRH zvýšila, nehledě na délku stimulace (obr. 18A, spodní panel). Zároveň byl po desetisekundové stimulaci TRH u buněk po umlčení PLC β_1 pozorován pokles ve schopnosti opětovně aktivovat receptor při porovnání poměrů obou odpovědí na hormon oproti buňkám kontrolním (obr. 18B, dolní část).



Obr. 19: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u TRY-1 buněk. (A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH ($1 \mu\text{M}$) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, prázdné sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici kaveolinu-1 a G α_s podjednotky (šrafované sloupce). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u TRY-1 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 10 či 30 sekund a po odmytí hormonu (3 minuty), byly buňky vystaveny jeho další desetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescencí druhé ku první odpovědi na hormon. Pro grafy A) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus kontrolní (nestimulované) buňky, pro B) *** $p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky po 10s aplikaci TRH, ### $p < 0,001$ versus příslušné siRNA-ovlivněné buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 10s nebo 30s aplikaci TRH byl použit neparametrický t-test, pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit Kruskal-Wallisův test s následným Dunnovým testem. (1) siRNA inhibice

Už dříve bylo prokázáno, že by některé účinky TRH-R mohly být zprostředkovány částečně také přes jiný G α protein, konkrétně G α_s podjednotku, proto jsme se rozhodli měřit koncentraci

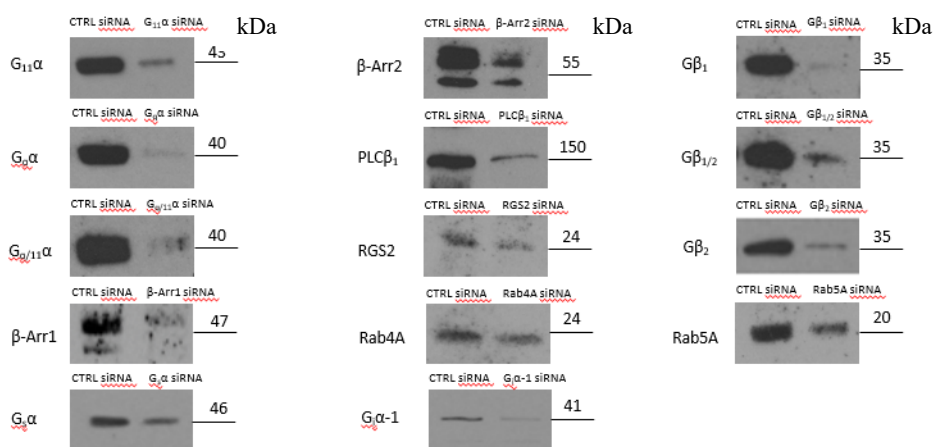
intracelulárního vápníku také po snížení exprese tohoto proteinu. Výsledky měření ukázaly výrazný pokles v koncentraci volného cytoplazmatického vápníku, jestliže před aplikací TRH byly buňky transfekovány siRNA proti $G_{s\alpha}$ podjednotce (obr. 19A, horní panel). Potlačení exprese tohoto proteinu nemělo vliv na opakovanou stimulaci hormonem, tedy na míru desenzitizace TRH-R (obr. 19B, horní část).

Protože kaveolin je protein důležitý pro vznik kaveolárních endocytických váček a byl prokázán jeho účinek na vápníkovou signalizaci vedoucí přes $G_q\alpha$ protein, zajímala nás také reakce našich buněk na TRH po poklesu v jeho expresi. Umlčení kaveolinu-1 s následnou stimulací 1 μ M TRH nevedlo k žádnému signifikantnímu zvýšení či snížení intracelulárních hladin volného vápníku oproti kontrole v TRY-1 buněčné linii (obr. 19A, spodní panel, obr. 19B, dolní část).

Z důvodu, že TRY-1 linie v předchozích pokusech ne vždy reagovala na stimulaci TRH optimálně a reakční škála i v rámci skupiny kontrolních buněk byla velice široká, rozhodli jsme se v dalších experimentech použít již osvědčené buněčné linie, které už dříve sloužily pro studium vlastností TRH-R.

6.2.2 Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci vápníku v buněčné linii E2

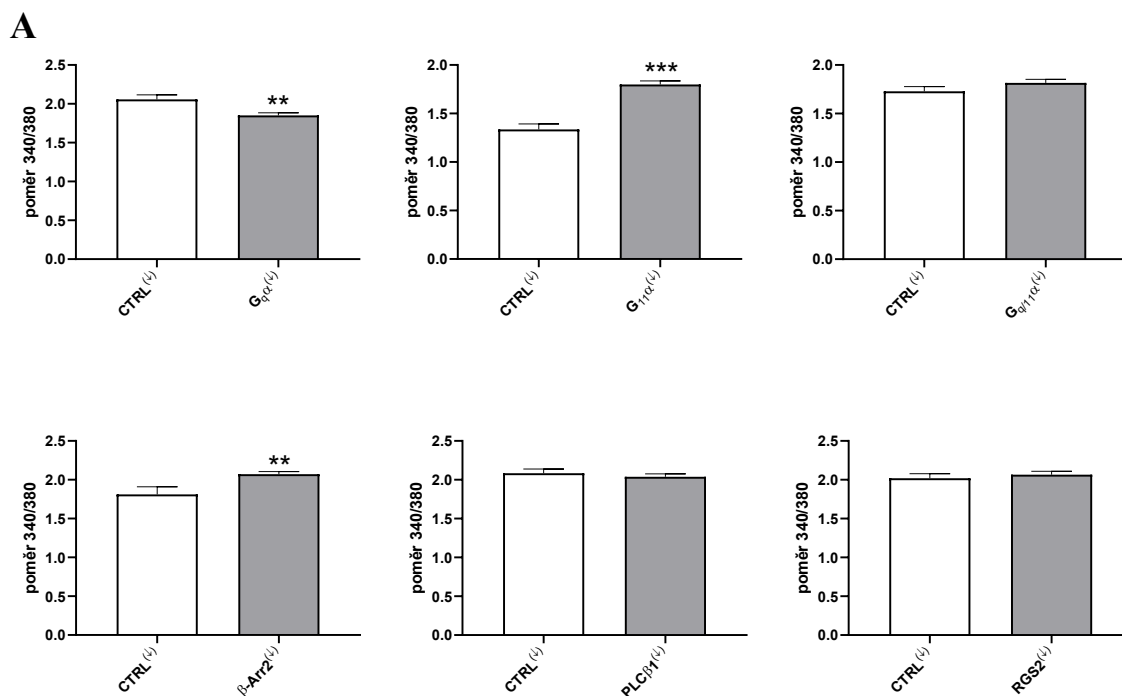
Jako v předchozím případě, také u E2 buněčné linie jsme se zaměřili na výzkum zapojení jednotlivých proteinů v signalizaci TRH-R prostřednictvím jejich cíleného umlčení. V tomto případě se jednalo zejména o proteiny $G_{q/11\alpha}$, β -arrestin2, $PLC\beta_1$ a RGS2 a jejich vliv na intracelulární koncentraci volného vápníku. Pokles v expresi těchto proteinů po siRNA inhibici je zobrazen na obr. 20 společně s poklesy v ostatních proteinech použitých v dalších experimentech na linii E2. Stimulace buněk 1 μ M TRH probíhala po dobu 20 sekund, v souladu s dřívějšími experimenty s touto linií (Novotny *et al.*, 1999; Ostasov *et al.*, 2008).

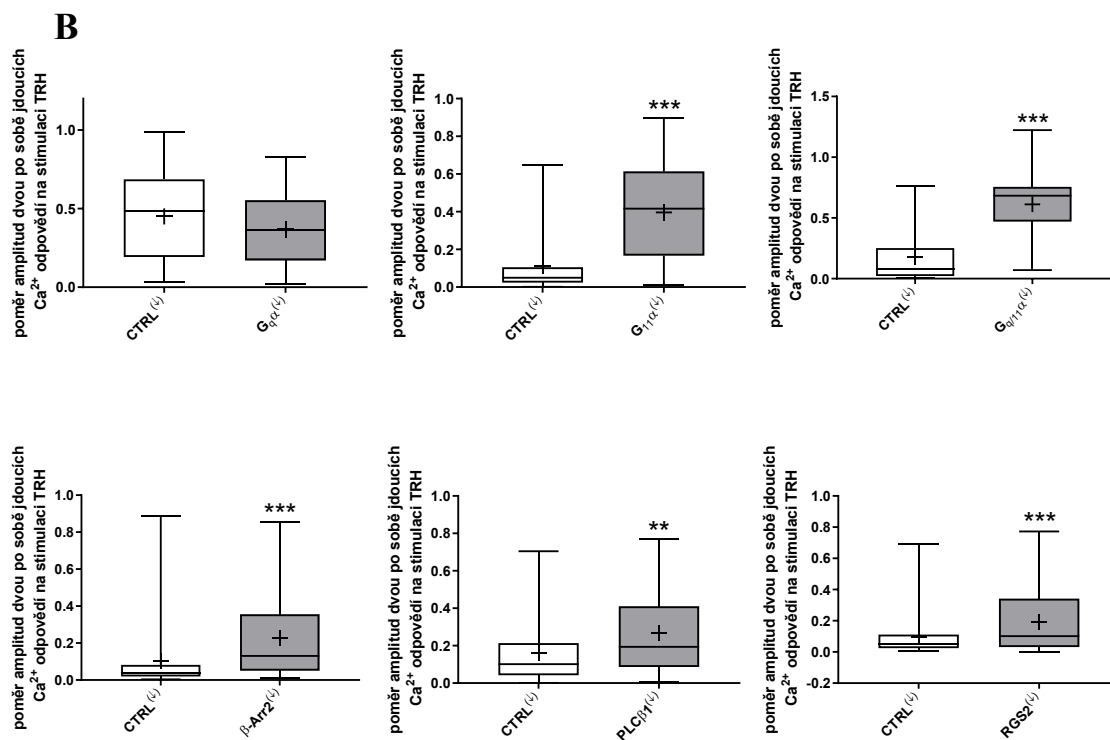


Obr. 20: Reprezentativní imunoblotty ukazující změny v genové expresi vybraných signalačních proteinů u E2 buněk po siRNA inhibici. K dosažení potlačení exprese vybraných proteinů byly buňky transfekovány konkrétními siRNA jak je popsáno v metodické části práce. Dva dny po transfekci byly buněčné homogenáty (20 μ g proteinů)

rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti vybraným proteinům. Míra exprese po inhibici byla srovnávána s expresí daného proteinu v kontrolních buňkách transfekovaných negativní siRNA (CTRL). Znázorněny jsou reprezentativní imunoblotty ze tří nezávislých pokusů.

V případě snížené exprese G_{α} došlo při ovlivnění TRH k poklesu v intracelulární koncentraci vápenatých iontů (obr. 21A, horní panel, vlevo). Naproti tomu, při umlčení $G_{11\alpha}$ došlo k nárůstu koncentrace volných vápenatých iontů v cytoplasmě buněk (obr. 21A, horní panel, uprostřed). Při současném umlčení obou zmiňovaných proteinů nebyla pozorována žádná signifikantní změna (obr. 21A, horní panel, vpravo). U námi testovaných proteinů se výrazná změna dále projevila při snížené expresi β -arrestinu2, kdy byl pozorován signifikantní nárůst intracelulárního vápníku oproti kontrolním buňkám (obr. 21A, dolní panel, vlevo). Účinek siRNA inhibice na následující odpověď na hormon se prokázal pro většinu studovaných proteinů (obr. 21B). Pouze umlčení samotné podjednotky G_{α} nemělo na míru desenzitizace TRH-R vliv. Snížená exprese ostatních sledovaných proteinů vedla vždy k signifikantnímu nárůstu velikosti druhé odpovědi na hormon oproti kontrole a tedy k potlačení desenzitizace receptoru.

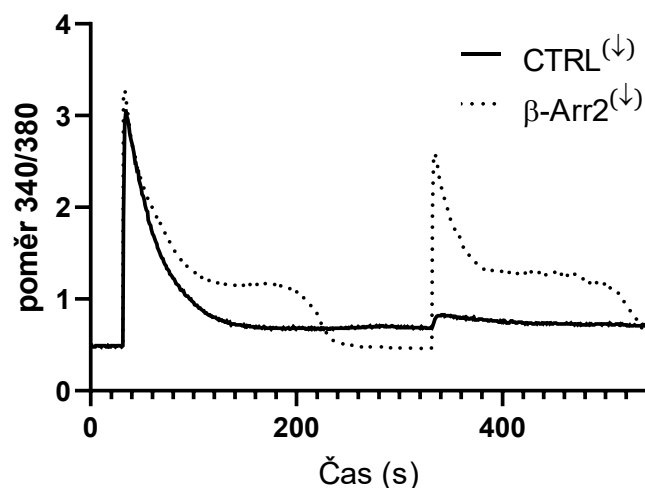




Obr. 21: Vliv potlačení exprese vybraných proteinů na hormonem vyvolanou vápníkovou odpověď u E2 buněk.

(A) Porovnání odpovědi na první aplikaci TRH (1 μ M) u kontrolních buněk (transfekovaných negativní siRNA, bílé sloupce v grafu, CTRL) a u buněk po siRNA inhibici proteinů $G_{q11\alpha}$, β -arrestinu2, $PLC\beta_1$ a $RGS2$ (šedé sloupce). (B) Vliv dvou za sebou jdoucích stimulací TRH na desenzitizaci u E2 buněčné linie. Buňky byly vystaveny působení vybraných siRNA po dobu dvou dnů a poté byly inkubovány s fluorescenční barvou Fura-2AM po dobu 1 hodiny. Během měření byl k buňkám aplikován TRH na dobu 20 sekund a po odmytí hormonu 5 minut), byly buňky vystaveny jeho další dvacetisekundové aplikaci. Změny v koncentracích vápníku byly nahrávány při vlnových délkách 340 a 380 nm a byl počítán poměr intenzit fluorescence 340/380 nm. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty poměrů intenzit fluorescence měřené z minimálně 15 buněk v každém ze třech samostatných experimentů. Krabicové grafy znázorňují poměr amplitud fluorescencí druhé ku první odpovědi na hormon. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ versus kontrolní (nestimulované) buňky. Pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na vápníkovou odpověď buněk po 20s aplikaci TRH a pro porovnání vlivu siRNA inhibice vybraných proteinů na velikost desenzitizace TRH-R po jeho aktivaci byl použit neparametrický t-test. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

Z krabicových grafů znázorněných výše je patrné, že také u této buněčné linie byly odpovědi jednotlivých buněk na stimulaci TRH velmi rozmanité. Umlčení proteinů se navíc u některých buněk projevovalo i změněným průběhem křivky, jak je ukázáno na příkladu β -arrestinu2 (obr. 22).

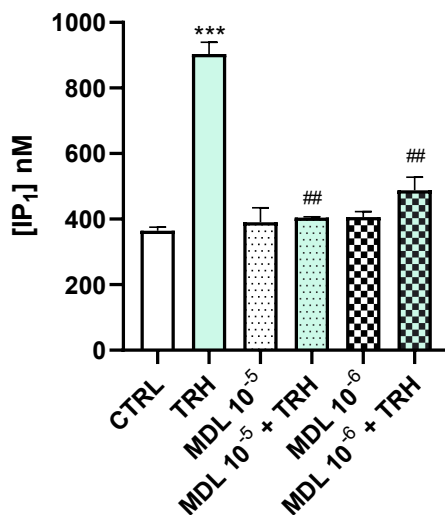


Obr. 22: Reprezentativní graf vápníkové odpovědi na stimulaci TRH u E2 buněk. Křivky kopírují změnu v intenzitě fluorescence vápníkového indikátoru Fura-2AM detekované u kontrolních buněk (plná čára) nebo u buněk s utlumenou expresí β -arrestinu2 (tečkovaná čára) po stimulaci $1 \mu\text{M}$ TRH po dobu 20 s. Nárůst v intenzitě fluorescence Fura-2AM odpovídá zvýšení hladin volného cytoplazmatického vápníku. Buňky byly po 30 sekundách od začátku experimentu podrobeny první dávce TRH ($1 \mu\text{M}$, 20 s), poté byly ponechány 5 minut v roztoku bez hormonu a následně opět vystaveny stejné dávce TRH ($1 \mu\text{M}$, 20 s). Graf znázorňuje typický průběh odpovědi buňky na aplikaci TRH, měřeno bylo vždy alespoň 15 buněk v každém ze tří nezávislých pokusů. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

6.2.3 Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a TRH na intracelulární koncentraci IP_1

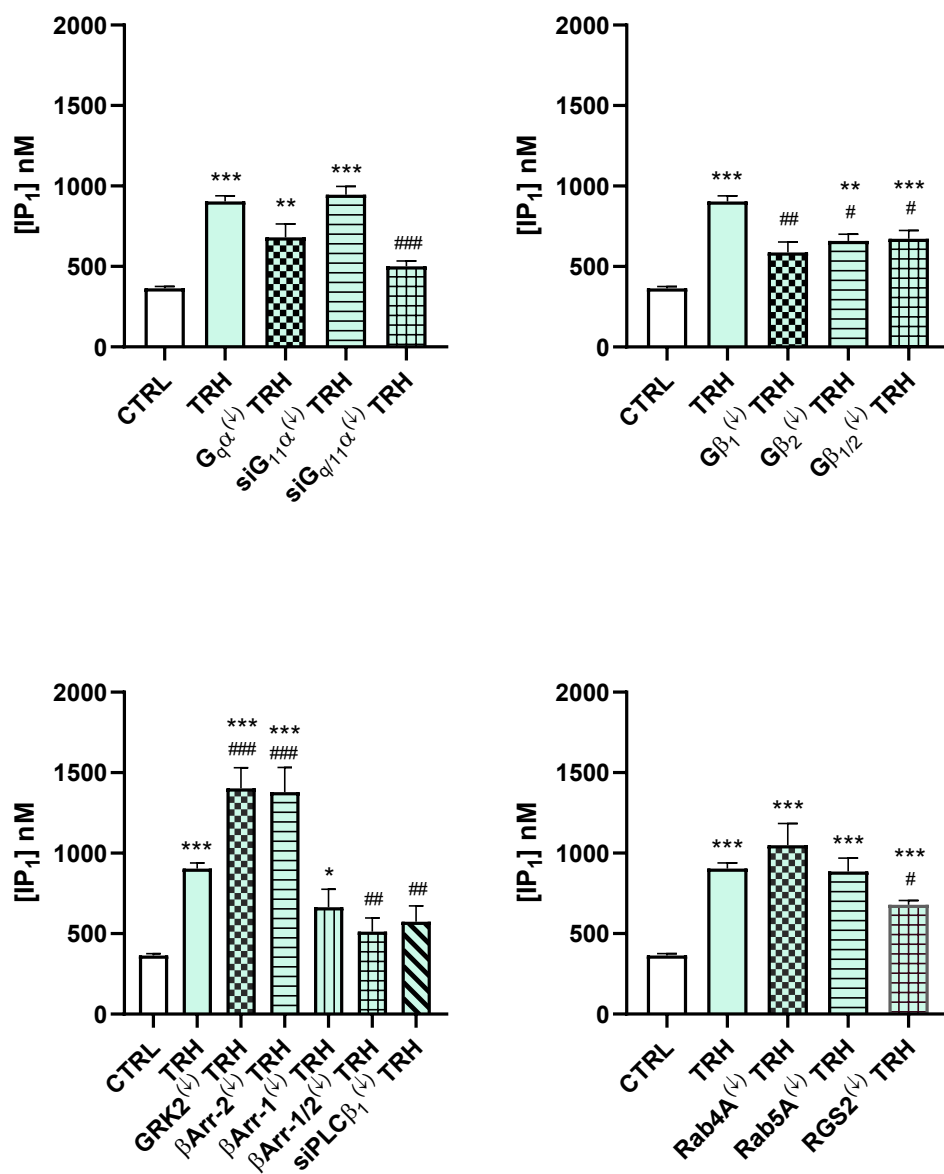
Aktivace TRH-R uvede do činnosti enzym $\text{PLC}\beta$, který způsobí zvýšení koncentrace IP_3 . Protože IP_3 má přímý vliv na množství vápenatých iontů v buněčné cytoplazmě, byl zkoumán vliv stimulace TRH a siRNA inhibice vybraných proteinů účastnících se signalizace TRH-R na tvorbu tohoto druhého posla. Měřeny byly hodnoty D-myo-inositol 1-fosfátu (IP_1), který slouží jako alternativa pro IP_3 .

Naše výsledky ukázaly, že po stimulaci TRH došlo k signifikantnímu zvýšení v koncentraci IP_1 oproti kontrole. Midazolam neměl na koncentraci IP_1 žádný vliv, pokud byl k buňkám přidán samostatně. Jestliže byl ale MDL aplikován před stimulací TRH, dokázal jeho vliv zablokovat a k nárůstu v koncentraci IP_1 nedošlo (obr. 23).



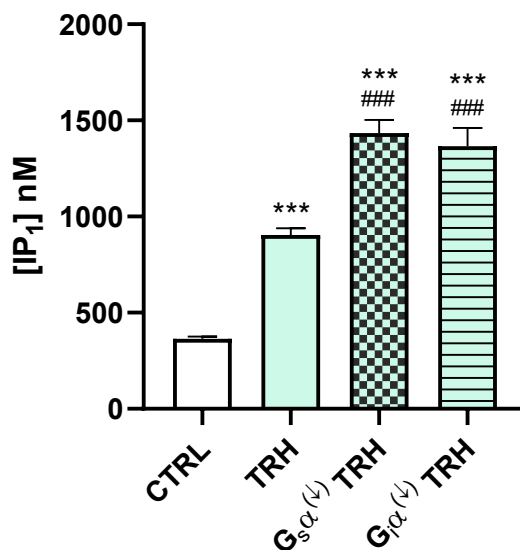
Obr. 23: Vliv agonisty (TRH) a antagonisty (MDL) TRH-R na akumulaci D-myo-inositol 1-fosfátu (IP₁) u E2 buněk. Koncentrace IP₁ byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích IP₁. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z minimálně tří nezávislých měření, ****p* < 0,001 versus kontrolní nestimulované buňky, ##*p* < 0,01 versus TRH stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Zkoumán byl vliv cíleného umlčení vybraných proteinů na produkci IP₁ u buněk stimulovaných TRH (obr. 24). Samotná inhibice neměla na produkci IP₁ žádný vliv. Ke snížení produkce IP₁ oproti příslušným kontrolním buňkám došlo zejména při současném potlačení exprese G_qα a G₁₁α proteinu a následné aplikaci TRH. Stejný efekt, avšak méně signifikantní, byl pozorován po umlčení Gβ_{1/2}, PLCβ₁, β-arrestinu1 i 2 současně a RGS2 proteinu. Naopak aplikace TRH k buňkám se sníženou expresí GRK2 a β-arrestinu2 měla za následek zvýšení v intracelulární koncentraci IP₁ oproti kontrole.



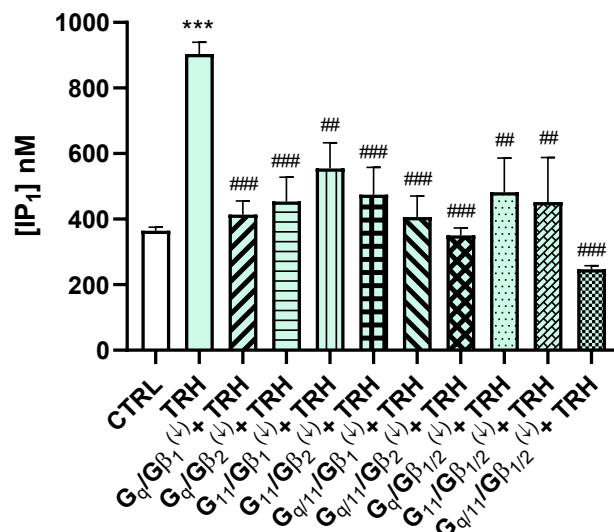
Obr. 24: Vliv TRH na intracelulární koncentraci IP₁ při umlčení vybraných signálních proteinů u E2 buněk. Koncentrace IP₁ byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích IP₁. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z minimálně tří nezávislých měření, ***p < 0,001 versus kontrolní buňky, #p < 0,05, ###p < 0,001 versus TRH stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Jak bylo uvedeno výše, aktivace TRH-R může kromě signalizace prostřednictvím G α 11 α vést ke spuštění signálních drah spážením s jinými G proteiny, zejména G β 5 α a G β 1 α . Proto byl zkoumán vliv umlčení těchto dvou G proteinů na schopnost buněk akumulovat IP₁ po stimulaci TRH-R. Koncentrace IP₁ byla signifikantně zvýšena oproti kontrole jak při snížené expresi G β 5 α , tak G β 1 α podjednotky G proteinů (obr. 25).



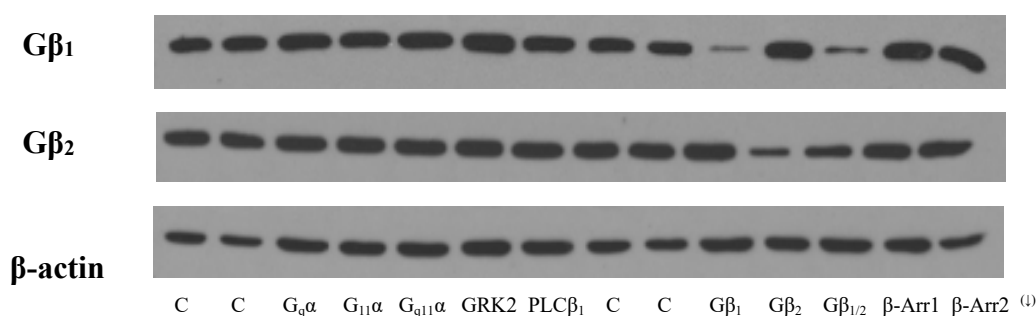
Obr. 25: Vliv TRH na akumulaci D-myo-inositol 1-fosfátu (IP₁) při snížené expresi G_sα a G_iα u E2 buněk. Koncentrace IP₁ byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích IP₁. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z minimálně tří nezávislých měření, ****p* < 0,001 versus kontrolní buňky, #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01, ###*p* < 0,001 versus TRH stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Zaměřili jsme se dále na podrobnější studium vlivu jednotlivých G proteinů na intracelulární koncentraci IP₁. Vždy bylo umlčeno několik G proteinů zároveň. Současné potlačení vybraných G_α a G_β proteinů vždy způsobilo pokles v produkci IP₁ (obr. 26). Největší pokles v koncentraci IP₁ byl pozorován při umlčení všech čtyřech studovaných G proteinů (G_{q/11α} s G_{β1/2}) a následně při potlačení zároveň G_qα s G_{β1} podjednotkou, G_{q/11α} s G_{β1} podjednotkou a G_{q/11α} s G_{β2} podjednotkou G proteinu.



Obr. 26: Vliv TRH na akumulaci D-myo-inositol 1-fosfátu (IP₁) při snížené expresi vybraných signálních proteinů u E2 buněk. Koncentrace IP₁ byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích IP₁. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z minimálně tří nezávislých měření, ****p* < 0,001 versus kontrolní buňky, #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01, ####*p* < 0,001 versus TRH stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

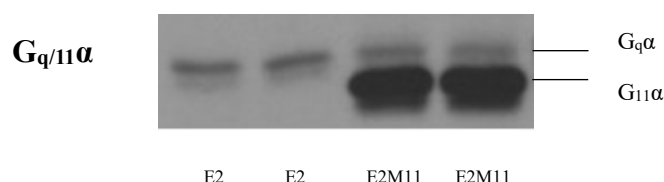
Abychom zjistili, zda inhibice určitého proteinu neovlivňuje také expresi dalších proteinů, změřili jsme expresi Gβ₁ a Gβ₂ podjednotek po potlačení různých molekul účastnících se signalizace začínající aktivací TRH-R. Z obr. 27 je patrné, že pouze inhibice Gβ₁ a/nebo Gβ₂ měla vliv na expresi Gβ₁ nebo Gβ₂, ostatní námi použité siRNA cílené proti jiným proteinům expresi Gβ proteinů neovlivnily.



Obr. 27: Analýza exprese Gβ₁ a Gβ₂ po inhibici jednotlivých proteinů účastnících se signalizace prostřednictvím TRH-R. E2 buňky byly inkubovány v přítomnosti siRNA cílených na jednotlivé vybrané proteiny, buněčné homogenáty (20 μg proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti Gβ₁ a Gβ₂. Znárodněny jsou reprezentativní imunoblotty. ⁽¹⁾ siRNA inhibice

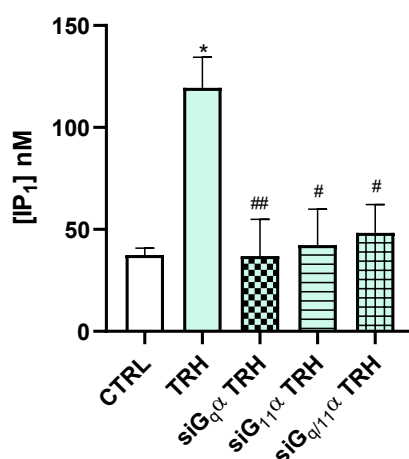
6.2.3.1 Analýza hladin $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ proteinů u E2 buněčné linie

Protože každá z podjednotek $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ měla u E2 buněk rozdílný vliv na výlev Ca^{2+} z intracelulárních zásobáren (viz obr. 21A) a také na produkci IP_1 (viz obr. 24), zajímalo nás, zda je rozdíl i v množství těchto G proteinů v rámci této buněčné linie. Pomocí ureové elektroforózy bylo zjištěno, že v E2 buněčné linii je exprimováno větší množství $G_{q\alpha}$ v porovnání s $G_{11\alpha}$ proteinem (obr. 28).

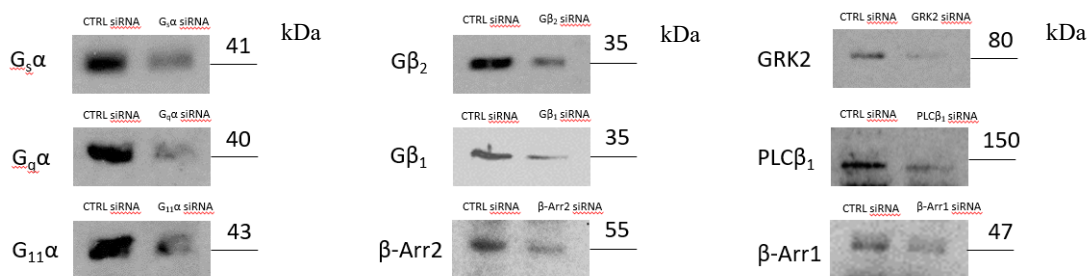


Obr. 28: Analýza hladin $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ proteinů pomocí ureové elektroforózy u E2 buněčné linie. Buněčné homogenáty (45 μ g proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti $G_{q/11\alpha}$. Znárodně je reprezentativní imunoblot ze tří nezávislých pokusů. Jako pozitivní kontrola nám posloužily E2M11 buňky, které mají exogenně exprimovaný $G_{11\alpha}$ protein.

Také u linie GH1 byla měřena intracelulární koncentrace volného IP_1 . U buněk, které byly ovlivněny TRH došlo k signifikantnímu nárůstu v produkci IP_1 oproti buňkám kontrolním (obr. 29). Pokud byly buňky nejprve vystaveny siRNA inhibici $G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, nebo obou těchto proteinů zároveň, byl po aplikaci TRH pozorován pokles v koncentraci IP_1 až na úroveň kontroly. Poklesy hladin vybraných proteinů po siRNA inhibici u GH1 linie byly také ověřeny imunoblotem (obr. 30).



Obr. 29: Vliv TRH na akumulaci D-myo-inositol 1-fosfátu (IP_1) při snížené expresi $G_{q/11\alpha}$ proteinů u GH1 buněk. Koncentrace IP_1 byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích IP_1 . Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, * $p < 0,05$ versus kontrolní buňky, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ versus TRH stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.



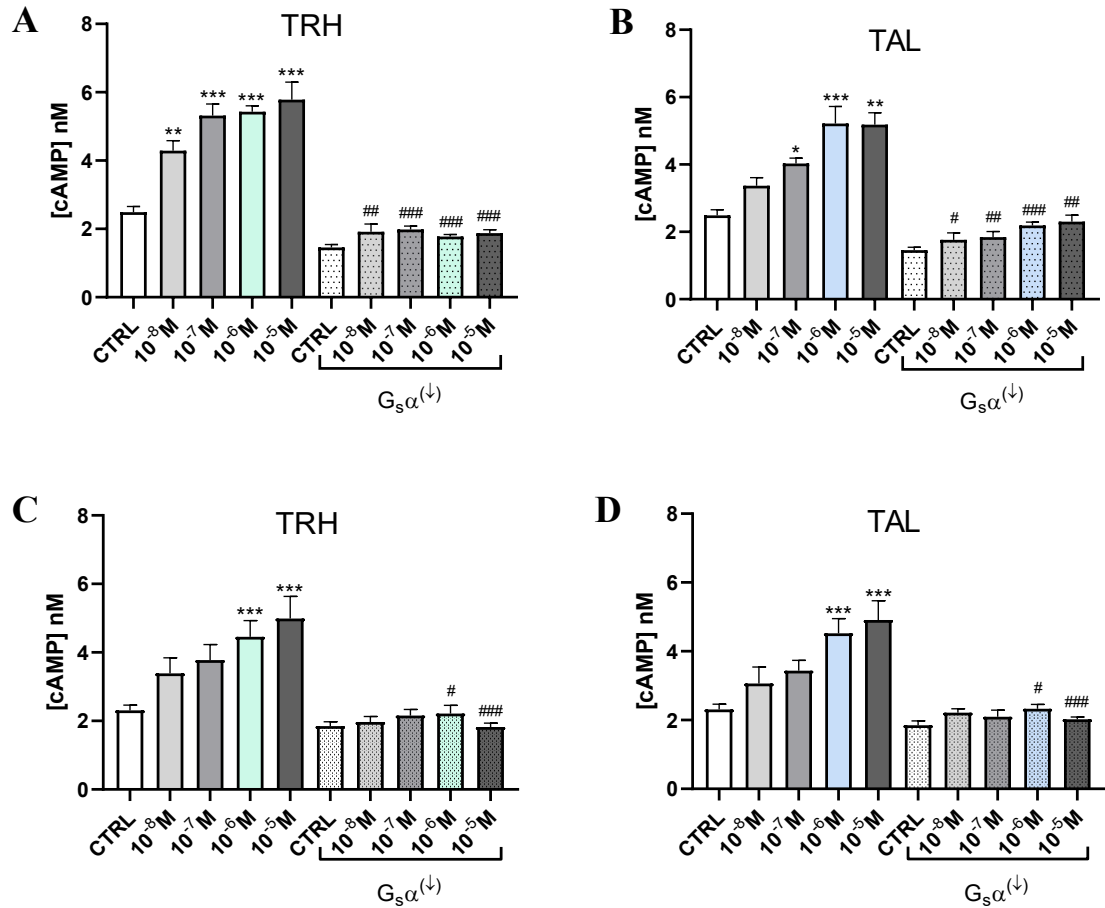
Obr. 30: Reprezentativní imunoblotty ukazující změny v genové expresi vybraných signalizačních proteinů u GH1 buněčné linie po siRNA inhibici. K dosažení potlačení exprese vybraných proteinů byly buňky transfekovány konkrétními siRNA, jak je popsáno v metodické části práce. Dva dny po transfekci byly buněčné homogenáty (20 μ g proteinů) rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti $G_s\alpha$, $G_{q/11}\alpha$, $G\beta_{1/2}$, β -Arr1/2, $PLC\beta_1$ a $GRK2$. Míra exprese po inhibici byla srovnávána s expresí daného proteinu v kontrolních buňkách transfekovaných negativní siRNA (CTRL). Znázorněny jsou reprezentativní imunoblotty ze tří nezávislých pokusů.

6.2.4 Vliv siRNA inhibice vybraných proteinů a ligandů TRH-R na intracelulární koncentraci cAMP

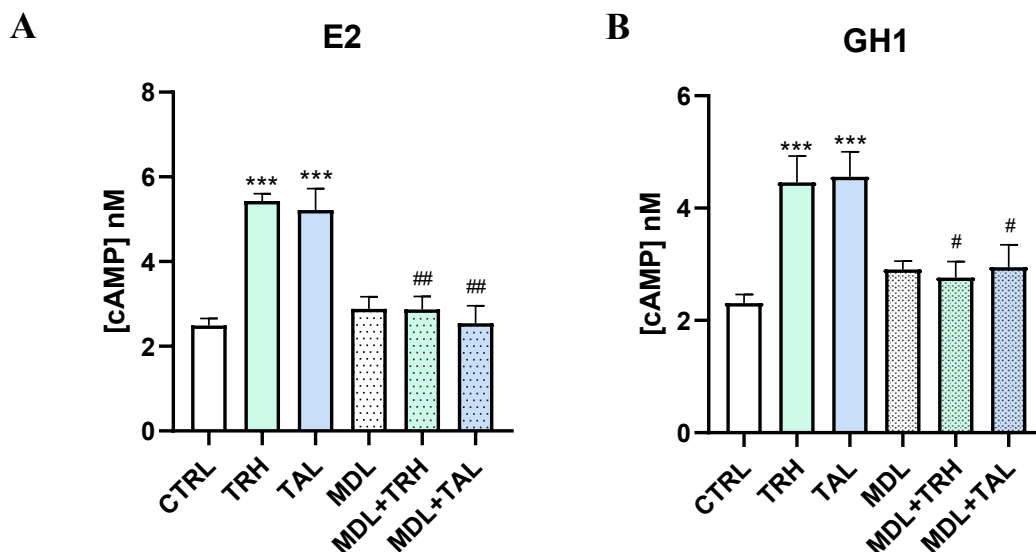
Základní proces, který aktivuje AC a vede k produkci cAMP, vychází od stimulovaného receptoru spáženého s $G_s\alpha$ podjednotkou heterotrimerického G proteinu. TRH-R může za jistých okolností pravděpodobně také ovlivňovat množství cAMP v buňce. Proto jsme se rozhodli sledovat vliv dvou ligandů TRH-R, TRH a TAL, na intracelulární koncentraci cAMP v buněčných liniích E2 (obr. 31A, B) a GH1 (obr. 31C, D). Z našich výsledků je patrné, že jak TRH (obr. 31A, C), tak TAL (obr. 31B, D) měly na množství cAMP vliv, a to u obou buněčných liniích. Stimulací TRH-R prostřednictvím těchto ligandů došlo k vyšší produkci cAMP oproti kontrole. Se zvyšující se koncentrací ligandů byl dokonce pozorován další nárůst v této produkci.

Na obrázku lze dále sledovat účinek siRNA inhibice $G_s\alpha$ na koncentraci cAMP. Pokud byla umlčena $G_s\alpha$ podjednotka, produkce cAMP se po ovlivnění buněk ligandy významně snížila, v případě E2 buněk pro všechny testované koncentrace. Na obr. 30 jsou znázorněny poklesy v expresi proteinů po siRNA inhibici použitých v následujících experimentech.

V dalších experimentech jsme pracovali s 1 μ M koncentrací ligandů. Aplikace antagonisty TRH-R, MDL, o koncentraci 10 μ M, neměla žádný vliv na koncentraci cAMP, ale byla schopna zablokovat efekt obou ligandů u obou buněčných linií (obr. 32A, B).



Obr. 31: Vliv různých koncentrací TRH a TAL a inhibice $G_s\alpha$ podjednotky na intracelulární koncentraci cAMP u E2 (A, B) a GHI (C, D) buněčných linií. Buňky byly inkubovány v přítomnosti kontrolní siRNA nebo siRNA proti $G_s\alpha$ podjednotce a následně ovlivněny vzrůstajícími koncentracemi ligandů po dobu 30 minut. Koncentrace cAMP byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích cAMP. Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus TRH/TAL stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

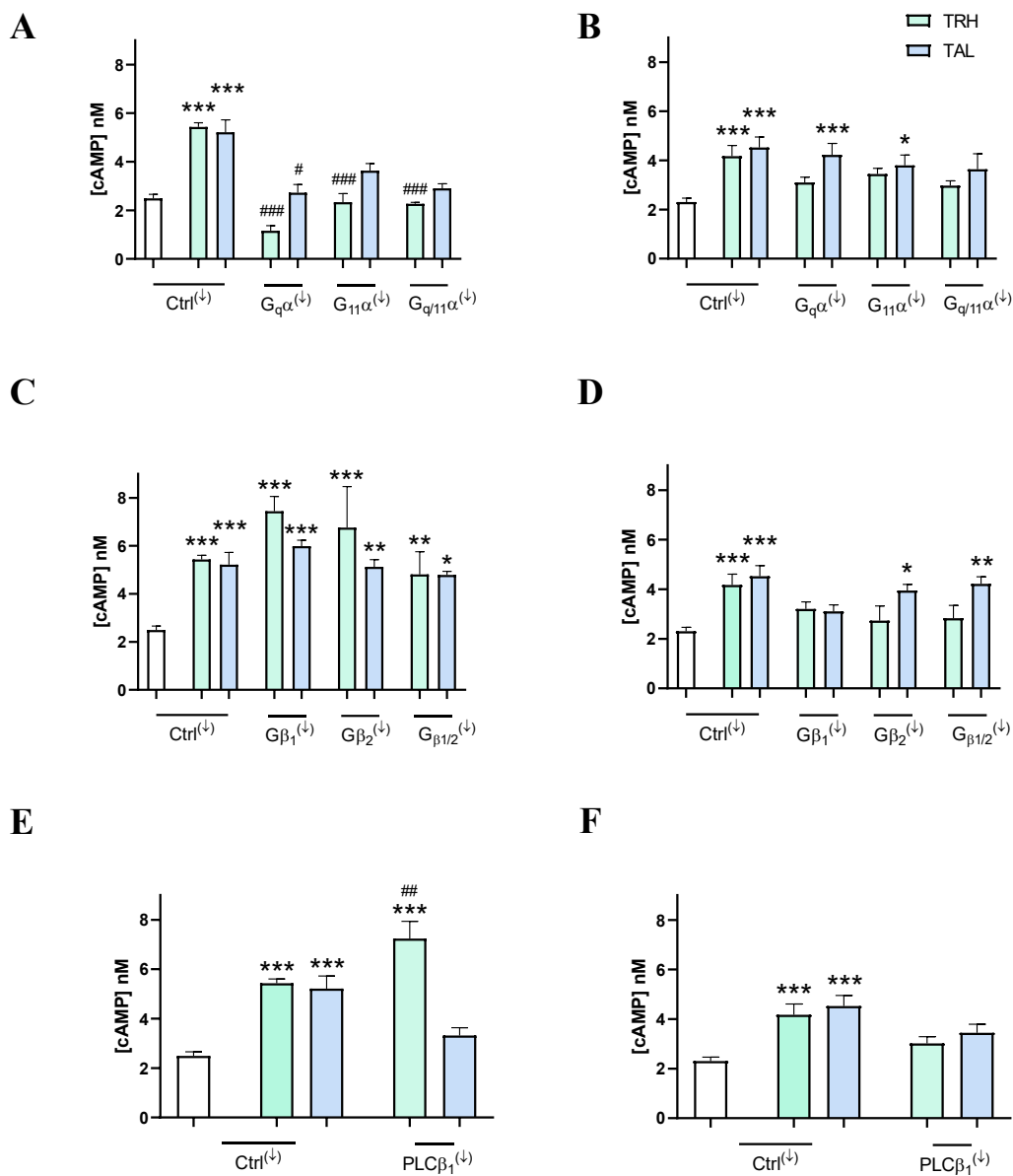


Obr. 32: Vliv TRH, TAL a MDL na intracelulární koncentraci cAMP u E2 a GH1 buněčných linií. Buňky byly ovlivněny TRH nebo TAL, nebo kombinací s antagonistou MDL po dobu 30 minut. Koncentrace cAMP byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích cAMP. Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ versus TRH/TAL stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

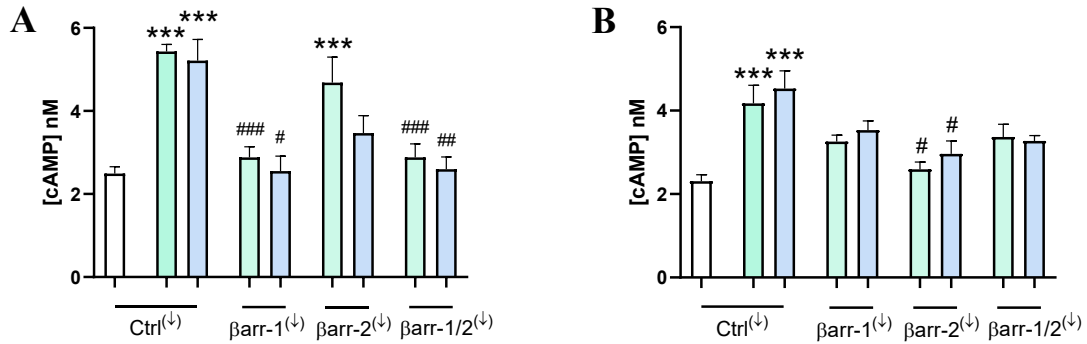
Abychom zjistili zda, a případně které, proteiny účastníci se signalizace začínající aktivací TRH-R mohou hrát roli v aktivaci AC a tedy produkci cAMP, cíleně jsme snížili jejich expresi pomocí siRNA inhibice (obr. 33A-F). Stimulace TRH-R prostřednictvím TRH nebo TAL u E2 buněk vedla k poklesu v produkci cAMP s větším vlivem TRH, pokud jsme snížili expresi $G_{q11\alpha}$ proteinů (obr. 33A). Aplikace TRH a TAL u GH1 buněk neměla vliv na produkci cAMP, pokud byla snížena exprese $G_{q11\alpha}$ proteinů (obr. 33B).

Cílený pokles hladin $G\beta$ proteinů nezpůsobil žádné změny v produkci cAMP u E2 linie (obr. 33C), ani u GH1 linie (obr. 33D) po stimulaci ligandy. V případě, že byla snížena exprese $PLC\beta_1$, došlo k nárůstu v hladinách cAMP po aplikaci TRH u E2 buněčné linie (obr. 33E). V případě GH1 linie neměl pokles v expresi $PLC\beta_1$ na produkci cAMP žádný vliv (obr. 33F).

Velký rozdíl v produkci cAMP mezi oběma buněčnými liniemi byl pozorován pokud jsme cíleně snížili expresi jednotlivých typů β -arrestinů (β -Arr, obr. 34A, B). Zatímco v případě E2 buněčné linie vedla aplikace TRH i TAL k poklesu v produkci cAMP u buněk se sníženými hladinami β -Arr1 nebo β -Arr1 i β -Arr2 zároveň (obr. 34A), u buněčné linie GH1 byl pozorován pokles v hladinách cAMP po aplikaci TRH a TAL k buňkám se sníženou expresí β -Arr2 (obr. 34B).



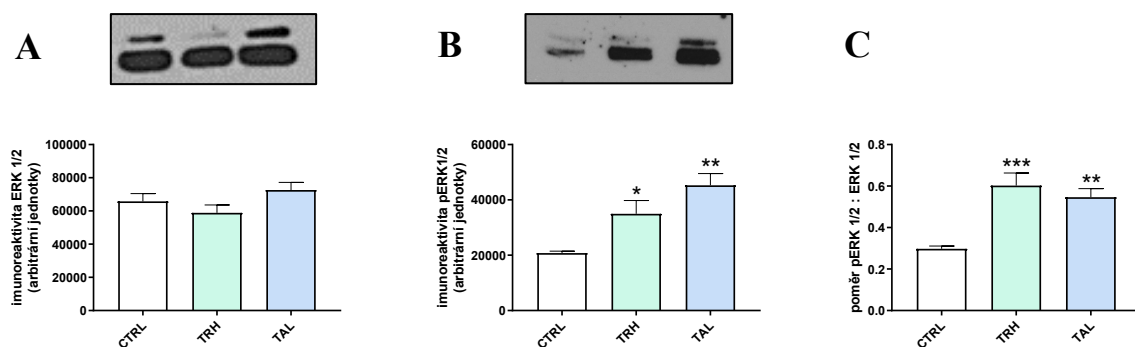
Obr. 33: Vliv TRH a TAL na intracelulární koncentraci cAMP při umlčení vybraných signálních proteinů u E2 a GH1 buněčných linií. Buňky byly inkubovány v přítomnosti kontrolní siRNA nebo siRNA proti *Gα* (A, B), *Gβ* (C, D) nebo *PLCβ* (E, F) a následně ovlivněny ligandy po dobu 30 minut. Koncentrace cAMP byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích cAMP. Data jsou vynesena jako průměr ± SEM z minimálně tří nezávislých měření, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 versus kontrolní buňky, #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01, ####*p* < 0,001 versus TRH/TAL stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.



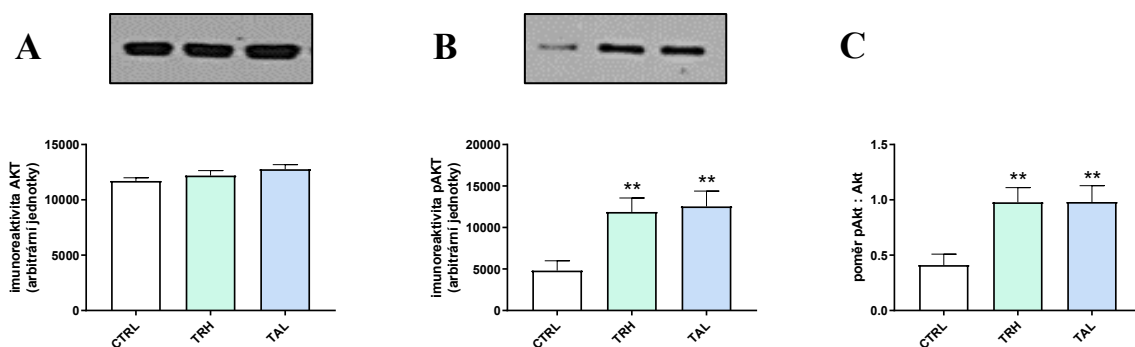
Obr. 34: Vliv TRH a TAL na intracelulární koncentraci cAMP při umlčení vybraných signálních proteinů u E2 a GH1 buněčných linií. Buňky byly inkubovány v přítomnosti kontrolní siRNA nebo siRNA proti β -arrestinu1 a β -arrestinu2 a následně ovlivněny ligandy po dobu 30 minut. Koncentrace cAMP byly vypočteny z kalibrační křivky o známých koncentracích cAMP. Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky, # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ versus TRH/TAL stimulované buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

6.2.5 Vliv ligandů TRH-R na expresi ERK1/2 a Akt

Ve snaze podhalit mechanismus, který by pomohl objasnit vliv ligandů TRH-R na signalizační dráhu směřující od β -arrestinů dále, zaměřili jsme se na expresi dvou enzymů, MAPK ERK1/2 a proteinkinázy Akt1/2/3 a také jejich fosforylovaných forem (obr. 35 a 36). Stimulace TRH a TAL neměla žádný vliv na expresi ERK1/2 (obr. 35A) ani Akt1/2/3 (obr. 36) u GH1 buněk, zatímco exprese fosforylovaných forem obou enzymů byla po stimulaci ligandy u těchto buněk signifikantně zvýšena (obr. 35B a 36B). Výsledky jsou vyjádřeny také jako poměr fosforylované formy enzymu ku její nefosforylované formě (obr. 35C a 36C).



Obr. 35: Vliv TRH a TAL na expresi (p)ERK1/2. GH1 buňky byly po dobu 30 minut inkubovány v přítomnosti 1 μ M TRH nebo TAL. Buněčné homogenáty (20 μ g proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti ERK (A) a jeho fosforylované formě (B). Nad grafy jsou znázorněny reprezentativní výřezy z imunoblotu. Sledován byl také poměr fosforylované formy ku nefosforylované formě ERK1/2. Míra exprese byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ a normalizována na množství proteinů získaných barvením Ponceau S. Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

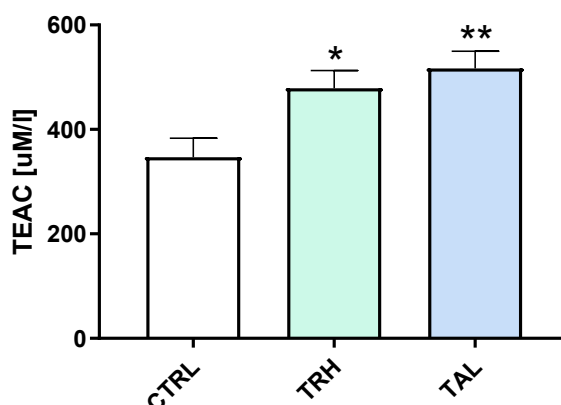


Obr. 36: Vliv TRH a TAL na expresi (p)AKT1/2/3. GH1 buňky byly po dobu 30 minut inkubovány v přítomnosti 1 μ M TRH nebo TAL. Buněčné homogenáty (20 μ g proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti Akt1/2/3 (A) a jeho fosforylované formě (B). Nad grafy jsou znázorněny reprezentativní výřezy z imunoblotu. Sledován byl také poměr fosforylované formy ku nefosforylované formě Akt1/2/3. Míra exprese byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ a normalizována na celkové množství proteinů detekované barvením Ponceau S. Data jsou vynesena jako průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření, ** $p < 0,01$ versus kontrolní buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

6.3 Cíl 3: Vliv aktivace TRH receptoru na redoxní rovnováhu, stav mitochondrií, cytoprotekci

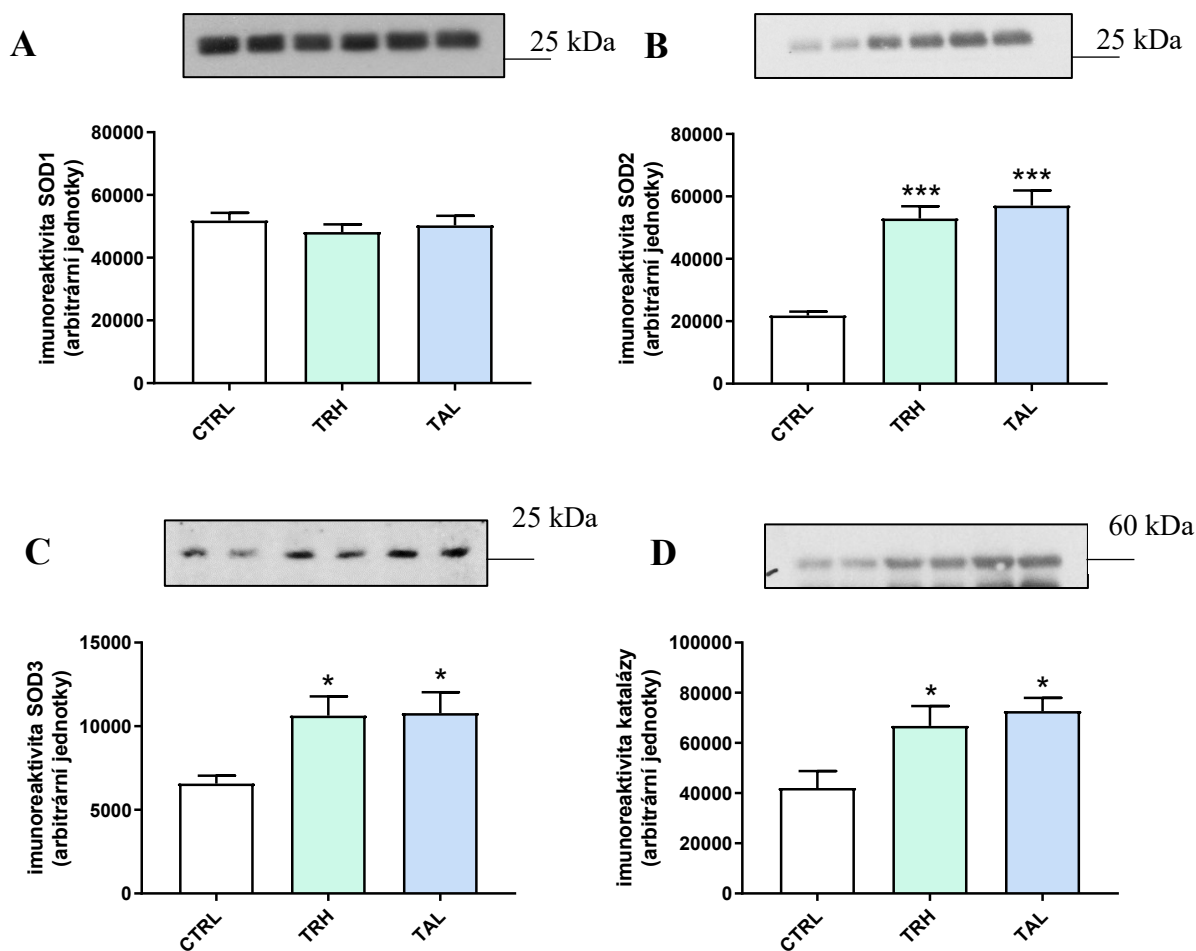
6.3.1 Celková antioxidační kapacita

Zabývali jsme se vlivem TRH a TAL (oba v koncentraci 1 μM) na celkovou antioxidační kapacitu u GH1 buněk (obr. 37). Po působení obou ligandů došlo k signifikantnímu zvýšení celkové antioxidační kapacity oproti kontrole. V případě TRH se jednalo o nárůst o 38 %, v případě TAL dokonce o téměř 49 % oproti kontrole.



*Obr. 37: Vliv TRH a TAL na celkovou antioxidační kapacitu u GH1 buněk. Buněčné lysáty kontrolních nebo ligandy ovlivněných buněk (TRH nebo TAL, koncentrace 1 μM) byly použity k detekci schopnosti antioxidantů ve vzorku zabránit oxidaci ABTS na ABTS+ navozenou metmyoglobinem. Intenzita této oxidace byla porovnávána s oxidací inhibovanou Troloxem (TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM ze čtyř nezávislých měření. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus kontrolní buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.*

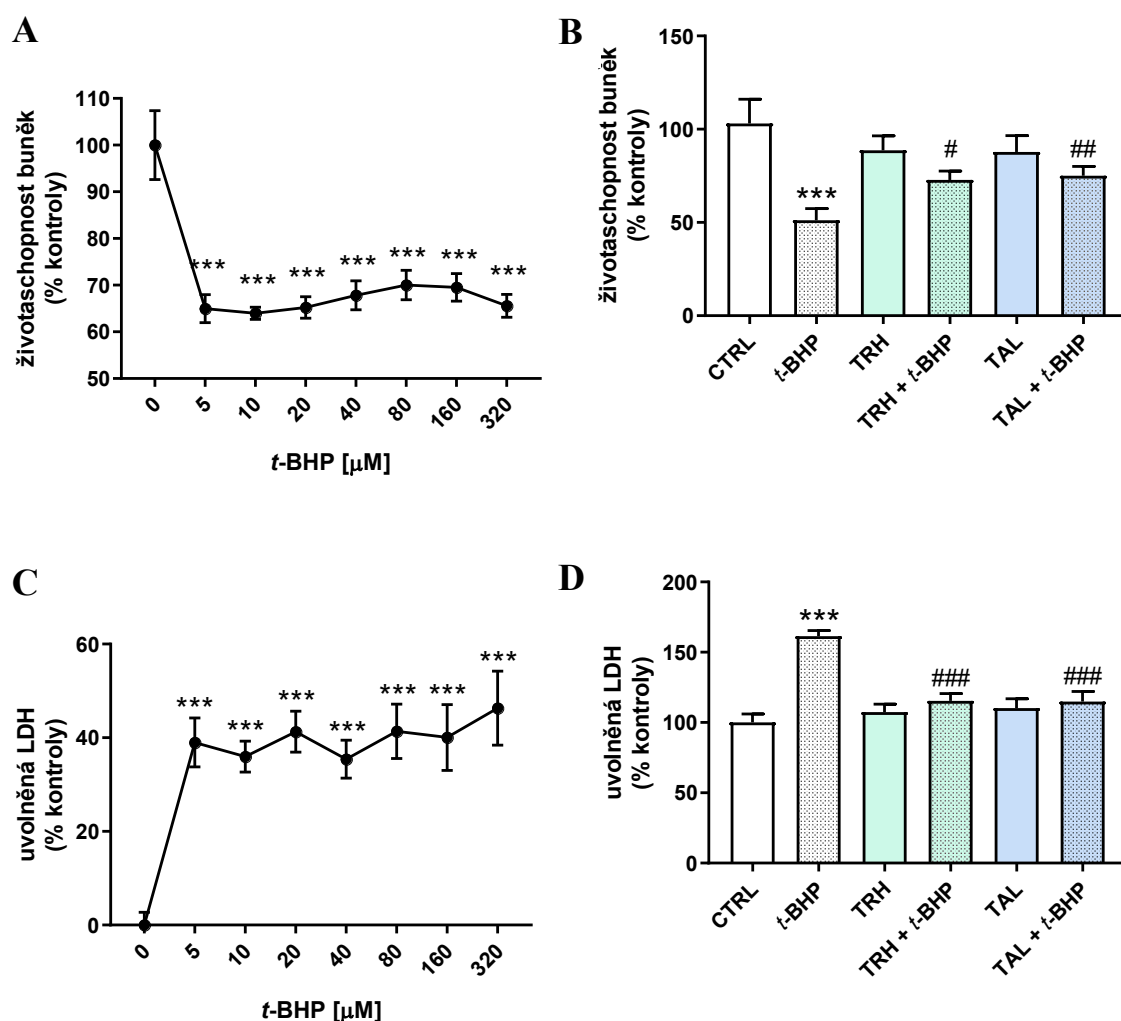
Pozorovány byly také změny v expresi vybraných antioxidačních enzymů, které udržují hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) v buňce na takové úrovni, aby nebyly pro buňku toxické. Ovlivnění buněk 1 μM TRH nebo TAL vedlo k markantnímu nárůstu v expresi SOD2, SOD3 i katalázy v porovnání s kontrolou, naproti tomu exprese SOD1 zůstala po stimulaci ligandy nezměněna (obr. 38).



Obr. 38: Vliv TRH a TAL na hladinu antioxidantních enzymů. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti 1 μM TRH a 1 μM TAL, buněčné homogenáty (20 μg proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti superoxidodismutáze SOD1-3 (A, B, C), a kataláze (D). Úroveň exprese byla měřena pomocí ImageJ a normalizována na množství proteinů pomocí Ponceau S. Znáznorněny jsou reprezentativní imunoblotty (vzorky nanášený v duplikátu za sebou) a grafy, které zobrazují relativní hladiny zmíněných enzymů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM ze tří nezávislých pokusů. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus kontrolní buňky, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Dále jsme zkoumali účinek obou agonistů TRH-R na oxidační stres vyvolaný *t*-BHP. Nejprve jsme testovali citlivost GH1 buněk na různé koncentrace *t*-BHP pomocí testu viability (MTT, obr. 39A) a cytotoxicity (LDH, obr. 39C). *t*-BHP byl použit v rozmezí koncentrací 5 μM – 320 μM , přičemž všechny použité koncentrace vyvolaly stejný pokles v životaschopnosti buněk (přibližně na 60 – 70 % živých buněk v porovnání s buňkami kontrolními). Ve všech ostatních experimentech byla použita koncentrace 20 μM *t*-BHP, která vyvolala přibližně 40% pokles v životnosti buněk (obr. 39A a B). Jak je patrné z obr. 39B, ani TRH, ani TAL neměly vliv na životaschopnost GH1 buněk. Pokud však byly ligandy použity v kombinaci s 20 μM *t*-BHP, došlo k zvrácení účinku *t*-BHP a významnému nárůstu životnosti buněk (zhruba o 20 %, obr. 39B).

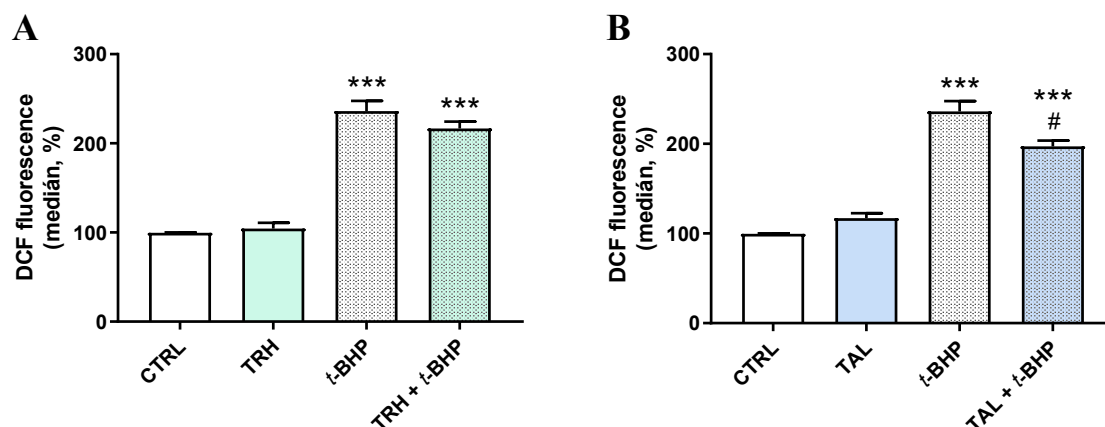
Výsledky LDH testu také odhalily jisté cytoprotektivní účinky TRH a TAL, kdy oba ligandy významně snížily *t*-BHP navozený výlev LDH (obr. 39D).



Obr. 39: Vliv *t*-BHP, TRH a TAL na buněčné přežívání a buněčnou cytotoxicitu. GH1 buňky byly inkubovány se vzrůstajícími koncentracemi *t*-BHP (A, C) nebo inkubovány v přítomnosti jednoho z ligandů TRH-R (TRH, TAL, 1 μ M koncentrace) a následně s 20 μ M *t*-BHP (B, D). Buněčné přežívání bylo měřeno pomocí MTT testu (A, B), ve kterém dochází k redukci žlutého MTT na fialový formazán, který je následně pomocí DMSO uvolněn z buněk a rozpuštěn. Absorbance byla měřena fotometricky při 540 nm. V případě LDH testu byl spektrofotometricky měřen výlev LDH z poškozených buněk při absorbanci 490 nm (C, D). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření. *** $p < 0,05$ versus kontrola, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus *t*-BHP, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Cytoprotektivní účinky agonistů TRH-R na oxidační stres indukovaný *t*-BHP byly dále studovány sledováním hladin ROS v GH1 buňkách pomocí průtokové cytometrie a barvení sondou H₂DCFDA. Tato měření prokázala, že samotná stimulace TRH nebo TAL nemá na hladiny ROS v buňkách žádný vliv. Pokud však byly ligandy přidány k buňkám, u kterých byl prostřednictvím

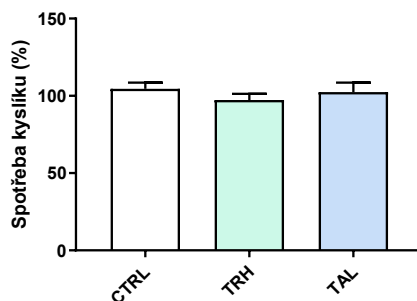
t-BHP vyvolán oxidační stres, produkce ROS indukovaná *t*-BHP byla mírně snížena (obr. 40). Potlačení účinku *t*-BHP pomocí TRH bylo pouze asi o 9 % (obr. 40A), zatímco TAL snížil produkci ROS indukovanou *t*-BHP téměř o 17 % (obr. 40B).



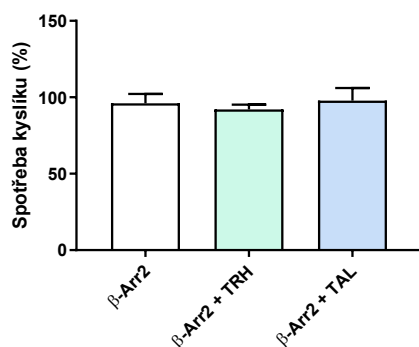
Obr. 40: Vliv *t*-BHP, TRH a TAL na intracelulární hladiny ROS. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti jednoho z ligandů TRH-R (TRH, TAL, 1 μ M koncentrace) a následně s 20 μ M *t*-BHP. Hladiny ROS byly stanoveny s použitím sondy H₂DCFH-DA a průtokové cytometrie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM z minimálně tří nezávislých měření. ****p* < 0,001 versus kontrola, #*p* < 0,05 versus *t*-BHP, one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

6.3.2 Vliv TRH a TAL na energetický metabolismus

Protože mitochondrie jsou známy jako hlavní generátory ROS, v rámci výzkumu vlivu hormonů na energetický metabolismus jsme se věnovali hodnocení účinků TRH a TAL na funkci mitochondrií u GH1 buněk. Stanovení spotřeby kyslíku pomocí MitoXpress kitu neodhalilo žádnou změnu u těchto buněk po ovlivnění ligandy v porovnání s buňkami kontrolními (obr. 41). Ani umlčení β -arrestinu2 a následná aplikace ligandů neměla na spotřebu kyslíku vliv (obr. 42).

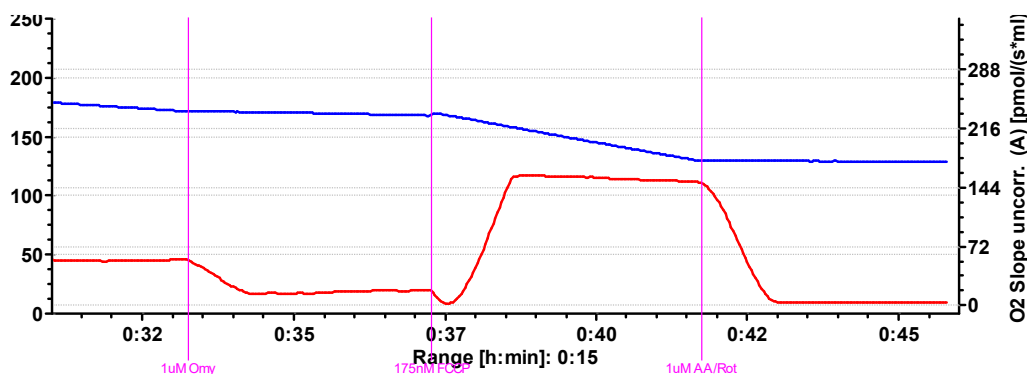


Obr. 41: Vliv TRH a TAL na spotřebu kyslíku. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti ligandů (1 μ M TRH nebo TAL). Spotřeba kyslíku byla měřena stanovením MitoXpress Xtra oxygen consumption assay. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM alespoň ze tří nezávislých měření.

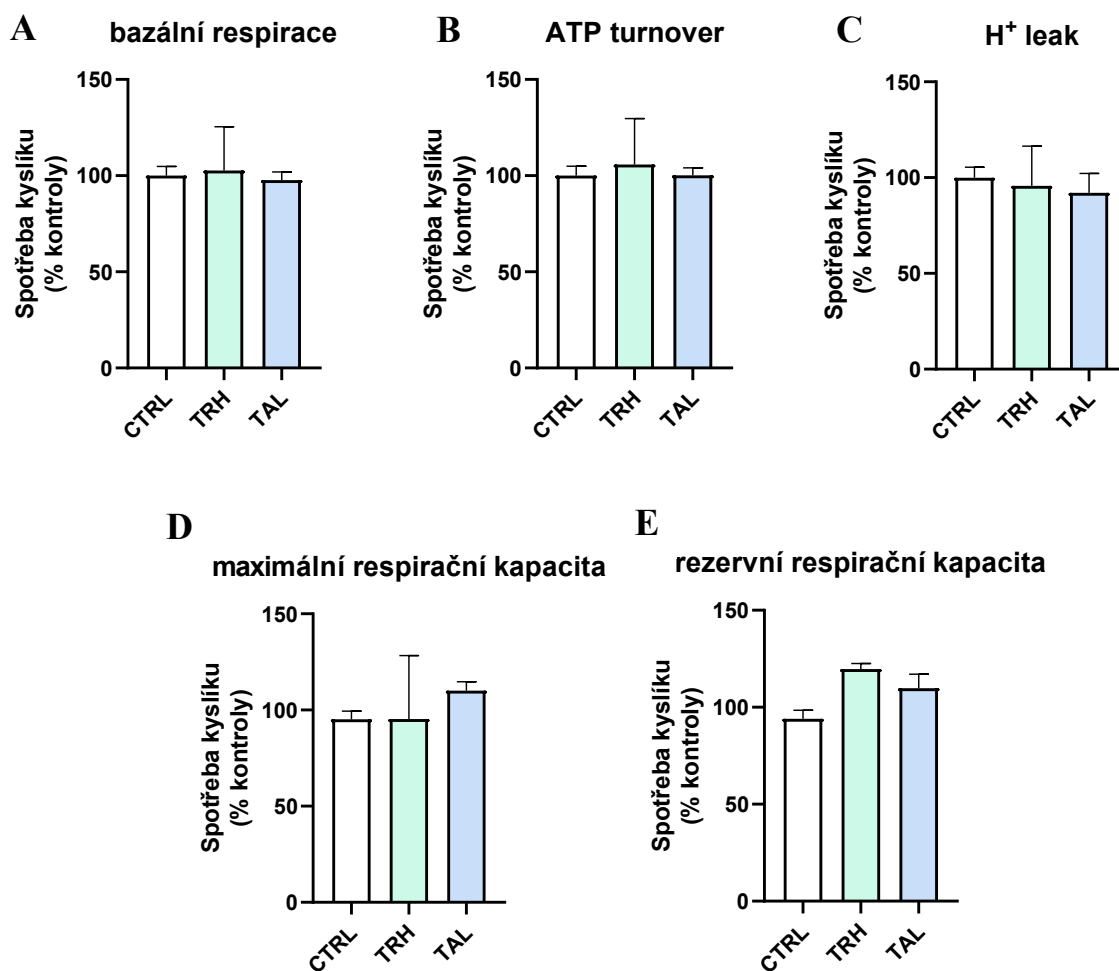


Obr. 42: Vliv inhibice β -arrestinu2, TRH a TAL na spotřebu kyslíku. Kontrolní GHI buňky nebo buňky se sníženou expresí β -arrestinu2 byly inkubovány v přítomnosti ligandů (1 μ M TRH nebo TAL). Spotřeba kyslíku byla měřena stanovením MitoXpress Xtra oxygen consumption assay. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM alespoň ze tří nezávislých měření.

Obr. 44 ukazuje vliv TRH a TAL v koncentraci 1 μ M na mitochondriální respiraci. Prostřednictvím oxygrafu byly stanovovány následující parametry respirace: bazální respirace (výchozí respirace upravená o respiraci po aplikaci antimycinu A/rotenonu); ATP turnover vyjadřující spotřebu kyslíku po zablokování ATP syntázy (výchozí respirace upravená o respiraci po aplikaci oligomycinu); H^+ leak znázorňující rozdíl v respiraci po aplikaci oligomycinu a respiraci po aplikaci antimycinu A/rotenonu; maximální respirační kapacita představující maximální tok elektronů v elektrontransportním řetězci (respirace po stimulaci FCCP upravená o respiraci po aplikaci antimycinu A/rotenonu) a rezervní respirační kapacita (respirace po stimulaci FCCP upravená o výchozí respiraci; respirace, co mohou mitochondrie použít, ale běžně nevyužijí). Ani jeden z agonistů nezpůsobil výraznější změnu v žádném ze sledovaných parametrů mitochondriální respirace (obr. 44A-E). Na obr. 43 je znázorněn typický průběh oxygrafického měření.

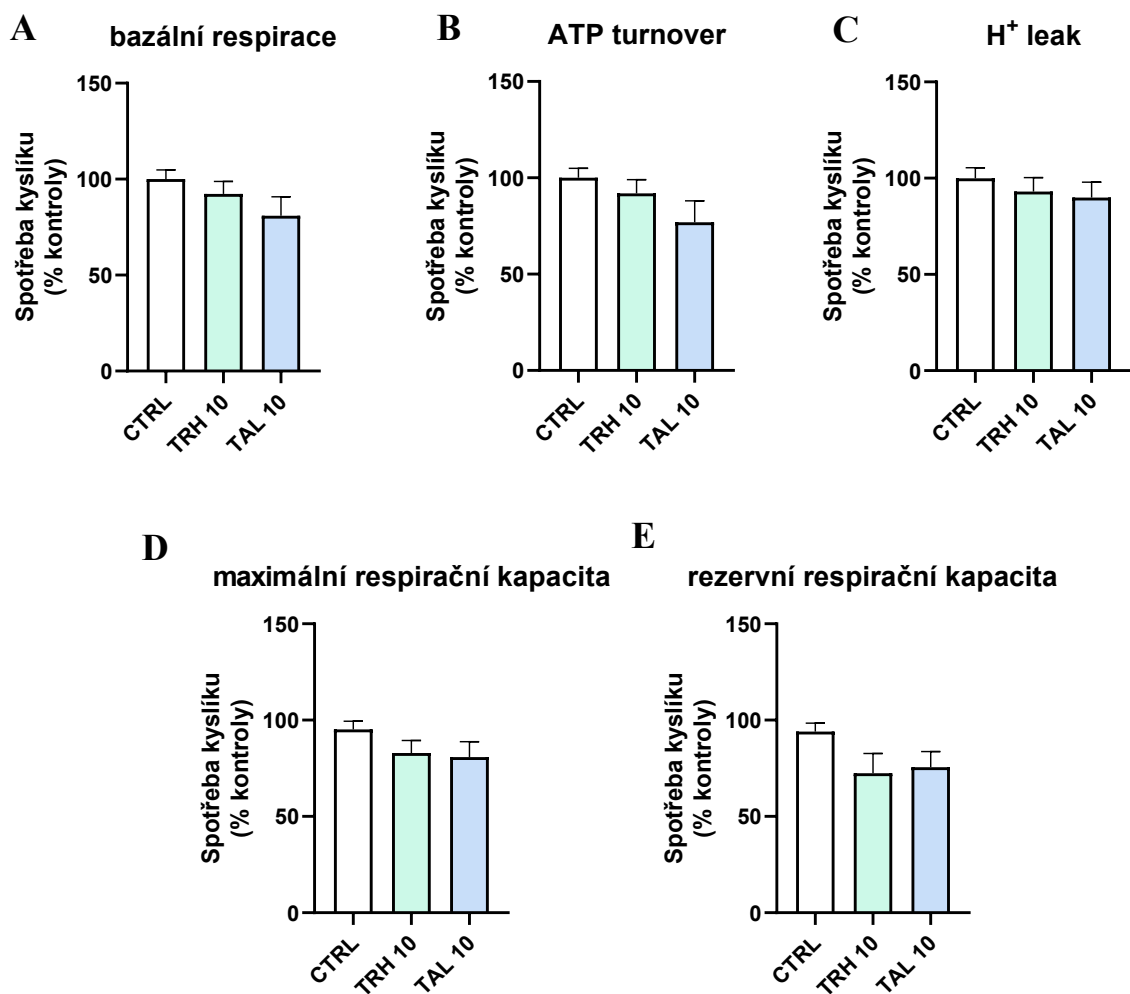


Obr. 43: Typický průběh oxygrafického měření. Křivka znázorňující spotřebu kyslíku GHI buňkami po stimulaci 1 μ M TRH. Omy, oligomycin; FCCP, karbonylkyanid *p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon; AA, antimycin A; Rot, rotenon.

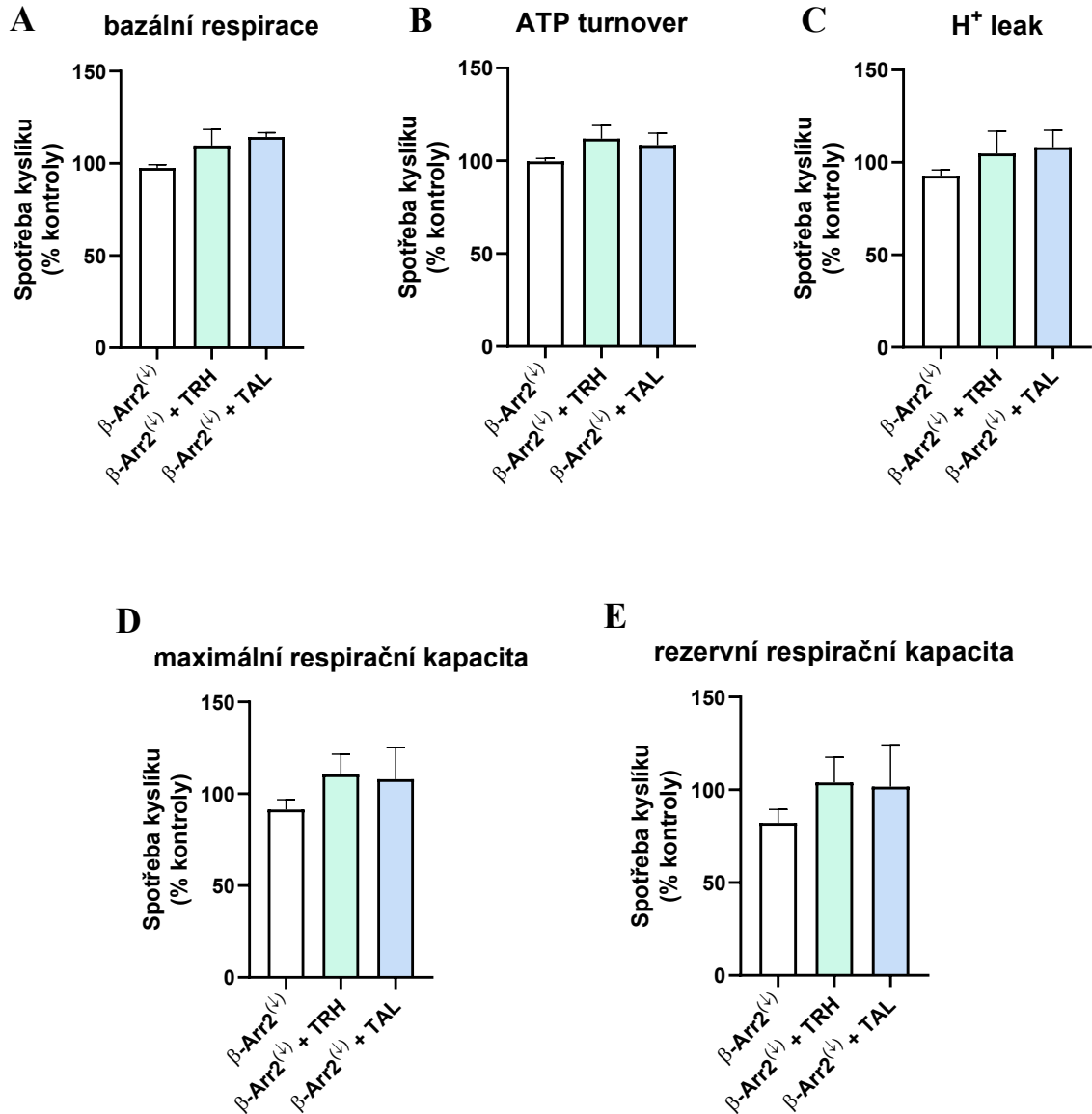


Obr. 44: Vliv TRH a TAL na jednotlivé parametry mitochondriální respirace. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti ligandů (TRH, TAL, koncentrace 1 μM). Mitochondriální respirace byla měřena přístrojem Oxygraph-2k. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM alespoň ze tří nezávislých měření.

Parametry mitochondriální respirace byly měřeny také po stimulaci GH1 buněk TRH a TAL o koncentraci 10 μM (obr. 45A-E) a po snížení hladin β -arrestinu2 s následnou stimulací TRH a TAL v koncentraci 1 μM (obr. 46A-E). Ani v těchto případech se neprokázal žádný výrazný efekt použitých ligandů na procesy mitochondriální respirace.

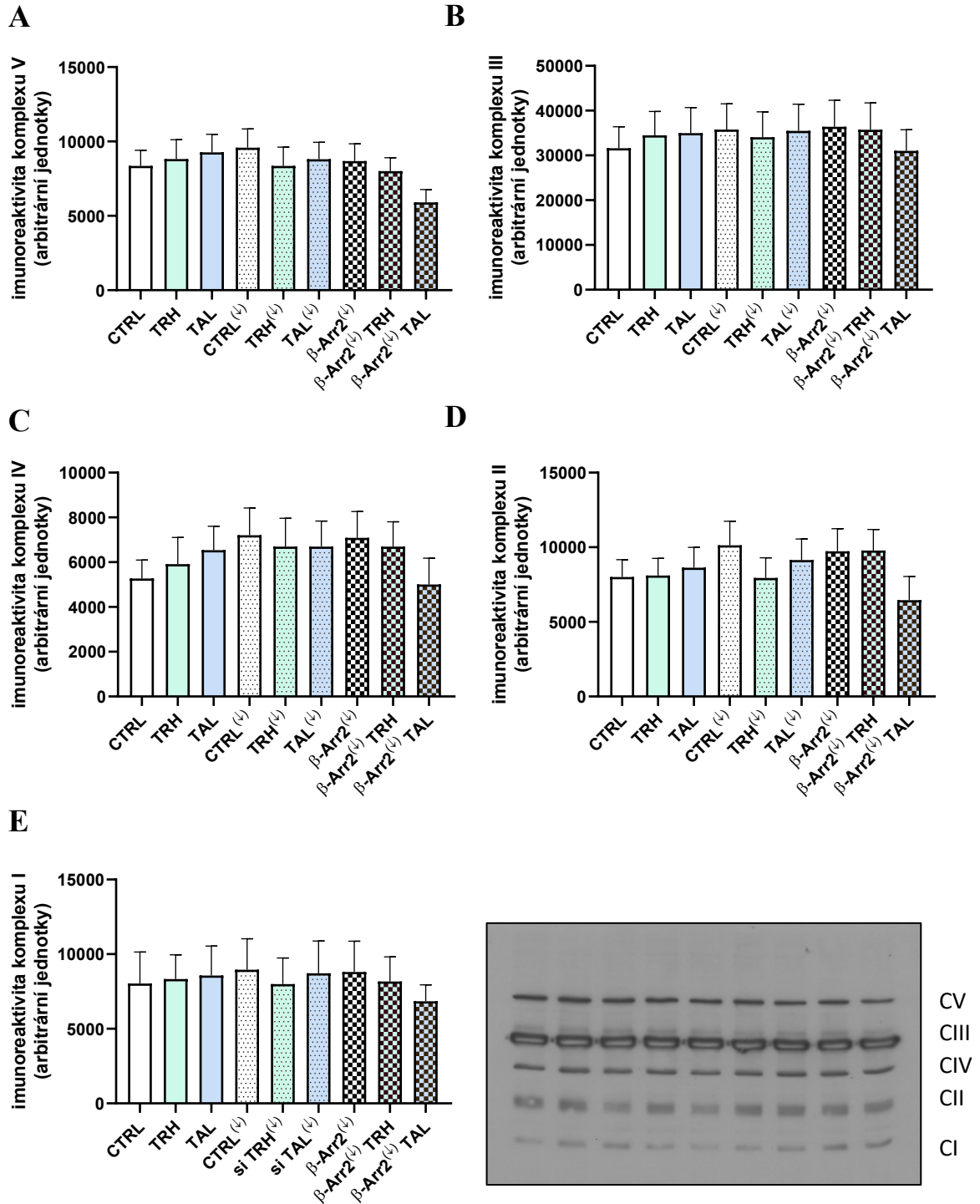


Obr. 45: Vliv vysoké koncentrace TRH a TAL na jednotlivé parametry mitochondriální respirace. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti ligandů (TRH, TAL, koncentrace 10 μ M). Mitochondriální respirace byla měřena přístrojem Oxygraph-2k. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM alespoň ze tří nezávislých měření.



Obr. 46: Vliv inhibice β -arrestinu2 na jednotlivé parametry mitochondriální respirace. GH1 buňky se sníženou expresí β -arrestinu2 byly inkubovány v přítomnosti ligandů (1 μ M TRH nebo TAL). Mitochondriální respirace byla měřena přístrojem Oxygraph-2k. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SEM alespoň ze tří nezávislých měření.

Nakonec jsme sledovali expresi jednotlivých enzymových komplexů oxidační fosforylace po ovlivnění TRH a TAL (oba v koncentraci 1 μ M) a také po inhibici β -arrestinu2 (obr. 47). Stejně jako v případě oxygrafických měření, nebyly detekovány žádné výrazné rozdíly v jednotlivých mitochondriálních enzimech ani pomocí imunoblotu.



Obr. 47: Vliv TRH, TAL a inhibice β -arrestinu2 na expresi enzymů oxidativní fosforylace u GH1 buněk. GH1 buňky byly inkubovány v přítomnosti $1 \mu\text{M}$ TRH a $1 \mu\text{M}$ TAL, buněčné homogenáty ($20 \mu\text{g}$ proteinů) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a pomocí imunoblotu označeny specifickými protilátkami proti komplexu V (CV, A), komplexu III (CIII, B), komplexu IV (CIV, C), komplexu II (CII, D) a komplexu I (CI, E). Úroveň exprese byla měřena pomocí ImageJ a normalizována na celkové množství proteinů detekované pomocí Ponceau S. Znárodněn je reprezentativní imunoblot a grafy, které zobrazují relativní hladiny zmíněných enzymů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM ze šesti nezávislých pokusů.

6.4 Cíl 4: Role β -arrestinu2 v TRH receptorem řízené signalizaci: Vliv inhibice β -arrestinu2 na signalizaci malých GTPáz a MAP kináz

Ve studii zabývající se vlivem β -arrestinu2 a ligandů TRH-R (TRH nebo TAL, koncentrace 1 μ M) na fosforylaci proteinů souvisejících se signalizací monomerních G proteinů a MAP kinázovou signalizací u GH1 buněk byly porovnávány soubory dat ze šesti experimentálních skupin. Seznam porovnávaných skupin je znázorněn v tabulce 12 spolu s detekovanými počty odlišně fosforylovaných proteinů a jednotlivých fosforylačních míst mezi skupinami.

Tab. 12: Počty rozdílně fosforylovaných proteinů a fosforylačních míst v rámci porovnávaných skupin

| Porovnávané skupiny | Počet odlišně fosforylovaných proteinů | Počet změněných fosforylačních míst |
|---------------------|--|-------------------------------------|
| Arr/C | 238 | 603 |
| TRH/C | 113 | 232 |
| Arr-TRH/Arr | 129 | 239 |
| TAL/C | 151 | 321 |
| Arr-TAL/Arr | 155 | 303 |

C, kontrolní buňky; Arr, buňky se sníženými hladinami β -arrestinu2; TRH, buňky po stimulaci 1 μ M TRH po dobu 30 minut; Arr-TRH; buňky se sníženými hladinami β -arrestinu2 stimulované 1 μ M TRH po dobu 30 minut; TAL, buňky po stimulaci 1 μ M TAL po dobu 30 minut; Arr-TAL; buňky se sníženými hladinami β -arrestinu2 stimulované 1 μ M TAL po dobu 30 minut.

Porovnáním změn nalezených po srovnání mezi TRH/C a Arr-TRH/Arr bylo zjištěno, že 30 změn ve fosforylaci u 22 fosfoproteinů bylo stejným směrem a 29 změn ve fosforylaci u 21 fosfoproteinů směrem opačným. Porovnáním změn nalezených po srovnání mezi TAL/C a Arr-TAL/Arr bylo zjištěno, že 36 změn ve fosforylaci u 21 fosfoproteinů bylo stejným směrem a 44 změn ve fosforylaci u 35 fosfoproteinů směrem opačným.

V následujících kapitolách budou představovány konkrétní změny ve fosforylaci proteinů v závislosti na své příslušnosti k jednotlivým skupinám monomerních G proteinů. Nejvíce změn ve fosforylaci proteinů po inhibici β -arrestinu a/nebo ovlivnění TRH/TAL bylo zjištěno u rodin Ras a Rho/Rac/Cdc42 monomerních G proteinů.

6.4.1 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ras

Změny ve fosforylaci proteinů zapojených do signálních transdukci monomerních G proteinů rodiny Ras a dráhy PI3K/Akt/mTOR jsou znázorněny na obr. 48. Jednotlivé změny pozorované ve funkčních doménách nebo interakčních místech s jinými proteiny jsou shrnuté v tabulce 13. Po aktivaci receptorů prostřednictvím TRH i TAL došlo ke snížení ve fosforylaci

Ser94 v molekule B-Raf, zatímco potlačení exprese β -arrestinu2 nemělo na toto fosforylační místo žádný vliv. TRH a TAL se naopak výrazně odlišují co se týče vlivu na fosforylaci efektorů mTOR komplexu. Zatímco aplikace TRH vedla k poklesu ve fosforylaci Ser1389 v TSC2 a Ser603 v Rps6kc1 a dále ke zvýšení fosforylace Ser300 v Cdk4, stimulace TAL ovlivnila pouze pokles fosforylace na Ser450 v molekule Ulk1. Působení TRH navíc způsobilo nárůst ve fosforylaci Thr857 a naopak pokles fosforylace Ser859 u proteinu Rptor, působení TAL vyvolalo pouze mírné snížení (zhruba trojnásobné) ve fosforylaci na Ser859. V rámci katalytické podjednotky AMPK, Prkaa1, došlo po ovlivnění TRH (více než třináctinásobně) i TAL (šestinásobně) k poklesu ve fosforylaci na Ser486.

Potlačení exprese β -arrestinu2 mělo výrazný vliv na signální dráhu Src/EGFR/Ras/PI3K/Akt a na efektoru Akt kinázy. Například u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 byl pozorován více než desetinásobný nárůst ve fosforylaci Src kinázy na Ser75 a zvýšená fosforylace byla detekována také na Ser1165 u epidermálního růstového faktoru (EGFR). Naproti tomu, u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 a následnou stimulací TRH nebo TAL došlo ke snížení ve fosforylaci Ser75 u Src kinázy, ale pouze TAL byl schopný v těchto buňkách snížit fosforylaci na Ser1165 u EGFR. Po potlačení exprese β -arrestinu2 byla zvýšená fosforylace na Ser181 u proteinkinázy PAK4 a velký nárůst ve fosforylaci byl pozorován také u Akt1 kinázy na Ser124 (169,7x), Ser126 (155,8x) a Ser129 (155,8x) a u kaseinkinázy 2 β (Csnk2 β) na Ser154. Zatímco stimulace TRH neměla na fosforylaci Akt1 ani Csnk2 β žádný vliv, po aplikaci TAL byl pozorován pokles ve fosforylaci Akt1 na Ser124 a Ser126 a současně pokles ve fosforylaci Ser158 u Csnk2 β . Aplikace TRH i TAL po předchozím potlačení exprese β -arrestinu2 vedla u Akt1 k poklesu ve fosforylaci Ser126, TRH navíc snížil fosforylaci také u Ser124, kdežto TAL na Ser122 u této kinázy. Také u efektorů Akt1 kinázy byly pozorovány jisté rozdíly ve fosforylacích po aplikaci TRH a TAL. Zatímco u buněk s potlačenou expresí β -arrestinu2 vyvolal TRH snížení fosforylace na Ser541 u Map3k9, TAL indukoval pokles ve fosforylaci na Ser1027 a Ser1031 u Map3k5. Rozdíly ve fosforylacích po siRNA inhibici β -arrestinu2 a následné aplikaci ligandů byly detekovány také v případě TSC1, TSC2 a proteinů tvořících mTOR komplex. U TSC1 vyvolaly oba ligandy pokles ve fosforylaci Ser561 a Ser565, TAL navíc indukoval fosforylaci u Ser1097 v TSC1, kdežto TRH způsobil pokles ve fosforylaci Ser1389 u TSC2. Oba ligandy shodně vedly k poklesu ve fosforylaci Ser26 u lyzozomálního adaptorového proteinu Lamtor1, Ser94 u malé GTPázy Rragc a Thr857 u proteinu Rptor.

Stimulace TRH a TAL u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 indukovala fosforylaci u presenilinu 1 (Psen1), který přímo interaguje s dalším efektoem signální transdukce Ras/PI3K/Akt, kateninem. Změny ve fosforylaci tohoto proteinu byly detekovány na Ser366, Ser368, Thr371 a Ser372.

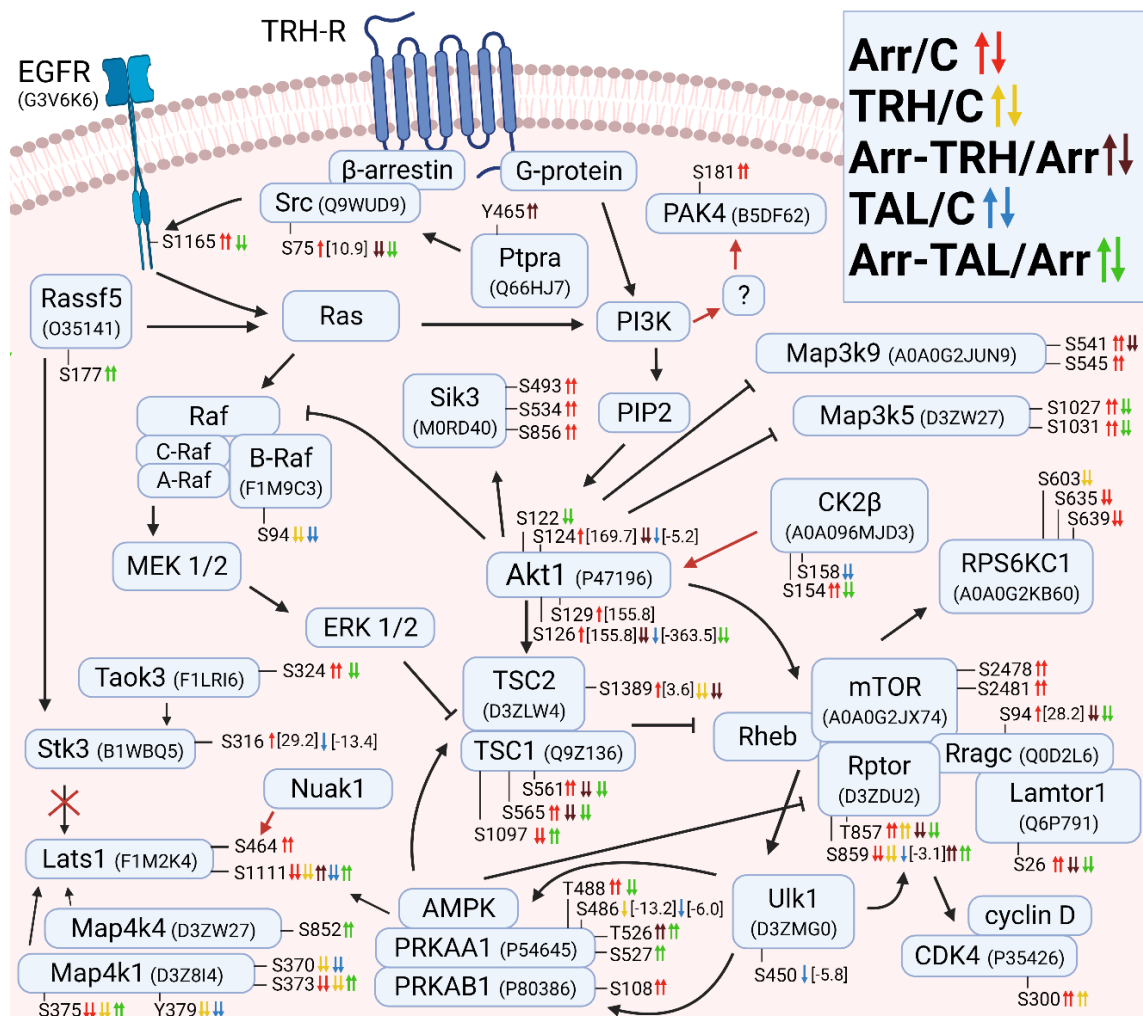
Změny ve fosforylaci některých aminokyselinových zbytků byly detekované u buněk po potlačení β -arrestinu2 také u katalytické a regulační podjednotky AMPK. Po snížení hladin

β -arrestinu2 došlo k nárůstu fosforylace na Thr488 u katalytické podjednotky AMPK, Prkaa1, a u regulační podjednotky, Prkab1, na Ser108. Následná aplikace TRH vyvolala nárůst ve fosforylaci Thr526 u Prkaa1. Stejně tak aplikace TAL iniciovala zvýšení fosforylace na Thr526, navíc ale po stimulaci tímto ligandem došlo ke zvýšení fosforylace na Ser527 a naopak k poklesu ve fosforylaci na Thr488 u Prkaa1.

U proteinu Lats1 byly pozorovány změny ve fosforylaci na dvou serinových místech, jednak na Ser464, kde došlo u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 k nárůstu fosforylace a jednak na Ser1111. U druhého zmíněného fosforylačního místa, Ser1111, byl detekován pokles ve fosforylaci po aplikaci TRH nebo TAL a nebo po snížení exprese β -arrestinu2. Pokud ale byly buňky současně vystavené snížení exprese β -arrestinu2 a stimulaci TRH/TAL, došlo naopak k nárůstu fosforylace na Ser1111. Co se týče kinázy Stk3, která je známá pro svou roli ve fosforylaci Lats, snížení hladin β -arrestinu2 zvýšilo (více než 29x) fosforylaci na Ser316. Stimulace TAL naproti tomu vedla k poklesu (13x) ve fosforylaci Ser316.

Tab. 13: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|---|
| Src kináza | Ser75; Q9WUD9 | zvýšení aktivity Src kinázy |
| PAK4 kináza | Ser181; B5DF62 | oblast zodpovědná za vazbu 14-3-3 proteinů |
| kináza Akt1 | Ser124, Ser126, Ser129; P47196 | předpokládaná role v regulaci konformačních stavů Akt |
| CK2 β | Ser154; A0A096MJD3 | spojeno s mitózou |
| Prkab1 | Ser108; P80386 | stabilizace interakcí mezi jednotlivými doménami AMPK |
| Prkaa1 | Thr488, Thr526, Ser527; P54645 | regulace aktivity AMPK |



Obr. 48: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Ras a dráze PI3K/Akt/mTOR. V bíledmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé proteiny, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GH1 buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce), respektive kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny, přičemž červené šipky a červené křížky představují již potvrzené interakce mezi fosforylačním místem a fosforylujícím efektořem nebo proteinem navazujícím dále v signalizaci. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Song et al., 2018; Martelli et al., 2010; Schoneborn et al., 2018; Meng et al., 2016; Young et al., 2021; Lai et al., 2016; Zhao et al., 2015; Sanders et al., 2019; Alsaqati et al., 2020; Goel et al., 2018; Won et al., 2019; Kucerova et al., 2016; Sanchez et al., 2012; Mihaylova a Shaw, 2011; Fang et al., 2020; Spencer, 2007; Pan et al., 2011; Girardi et al., 2014; Di Maira et al., 2005; Steinberg a Carling, 2019; Humbert et al., 2010; Chan et al., 2005, Annunziata et al., 2020; Cuesta et al., 2021; Beck et al., 2014.

Změny ve fosforylaci proteinů zapojených do signální transdukce Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/ERK jsou znázorněny na obr. 49. Změny lokalizované ve funkčních doménách nebo interakčních místech s jinými proteiny jsou shrnuté v tabulce 14. Ačkoli jsme nedetekovali žádné změny ve fosforylaci adaptorového proteinu Grb2, u jeho vazebných partnerů Gab1 a Sos1 k jistým fosforylačním změnám došlo. V případě Gab1 byl pozorován pokles ve fosforylaci na Ser438 po aplikaci TRH. V případě Sos1 byl počet ovlivněných fosforylačních míst rozsáhlejší, neboť samotné potlačení exprese β -arrestinu2 mělo zásadní vliv na fosforylaci sedmi fosforylačních míst (pokles na Ser1078 a Ser1082, nárůst na Thr1249, Ser1251, Thr1255, Ser1318 a Ser1319). Aktivace receptorů pomocí TRH neindukovala žádnou změnu ve fosforylaci Sos1, naproti tomu stimulace TAL měla za následek mírný pokles ve fosforylaci na Ser1078 a Ser1082 (oba shodně 5,6x). Snížení exprese β -arrestinu2 a následná stimulace TRH nebo TAL vedla v případě obou ligandů ke shodnému účinku, a to ke zvýšení fosforylace na Ser1078 a Ser1082 a k poklesu fosforylace na Thr1255. Pouze TAL navíc ještě indukoval fosforylaci na Ser1319 u Sos1.

Snížení hladin β -arrestinu2 mělo vliv také na proteiny asociované s Ras, jako je neurofibromin 1 (Nf1), afadin (Afdn), Rassf5 nebo Dab2ip. V případě Nf1 pokles v expresi β -arrestinu2 indukoval fosforylaci na Ser821, Ser824, Thr2432 a Ser2488, v případě Afdn došlo ke zvýšení ve fosforylaci na Ser1114 (15x), Ser1179 (33,6x), Ser1180 (33,6x), Ser1189 (33,6x) a Ser1779 (5,6x). Stimulace TAL po předchozí siRNA inhibici β -arrestinu2 vedla ke zvýšení fosforylace na Ser177 u Rassf5 proteinu a k poklesu fosforylace na Ser719 u Dab2ip.

Signalizace od Ras vede přes Raf kinázu dále k AC6 a PKA. Jak bylo uvedeno výše, aplikace TRH i TAL shodně vedla k poklesu ve fosforylaci na Ser94 u Raf kinázy. Co se týče AC6, k poklesu fosforylace na Ser67 vedla pouze stimulace TAL. Potlačení exprese β -arrestinu2 indukovalo nárůst ve fosforylaci na Ser67 (téměř 38x) a Thr69 a následná stimulace TAL vedla k poklesu fosforylace na Thr69 u AC6. Detekovali jsme také fosforylační změny u regulačních podjednotek PKA. Zatímco po snížení exprese β -arrestinu2 došlo k nárůstu ve fosforylaci Ser83 u Prkar1a a Ser97 u Prkar2a, stimulace TAL snížila fosforylaci na Ser83 a Ser85 u Prkar2b. Stimulace TRH neměla vliv ani na AC6, ani na PKA.

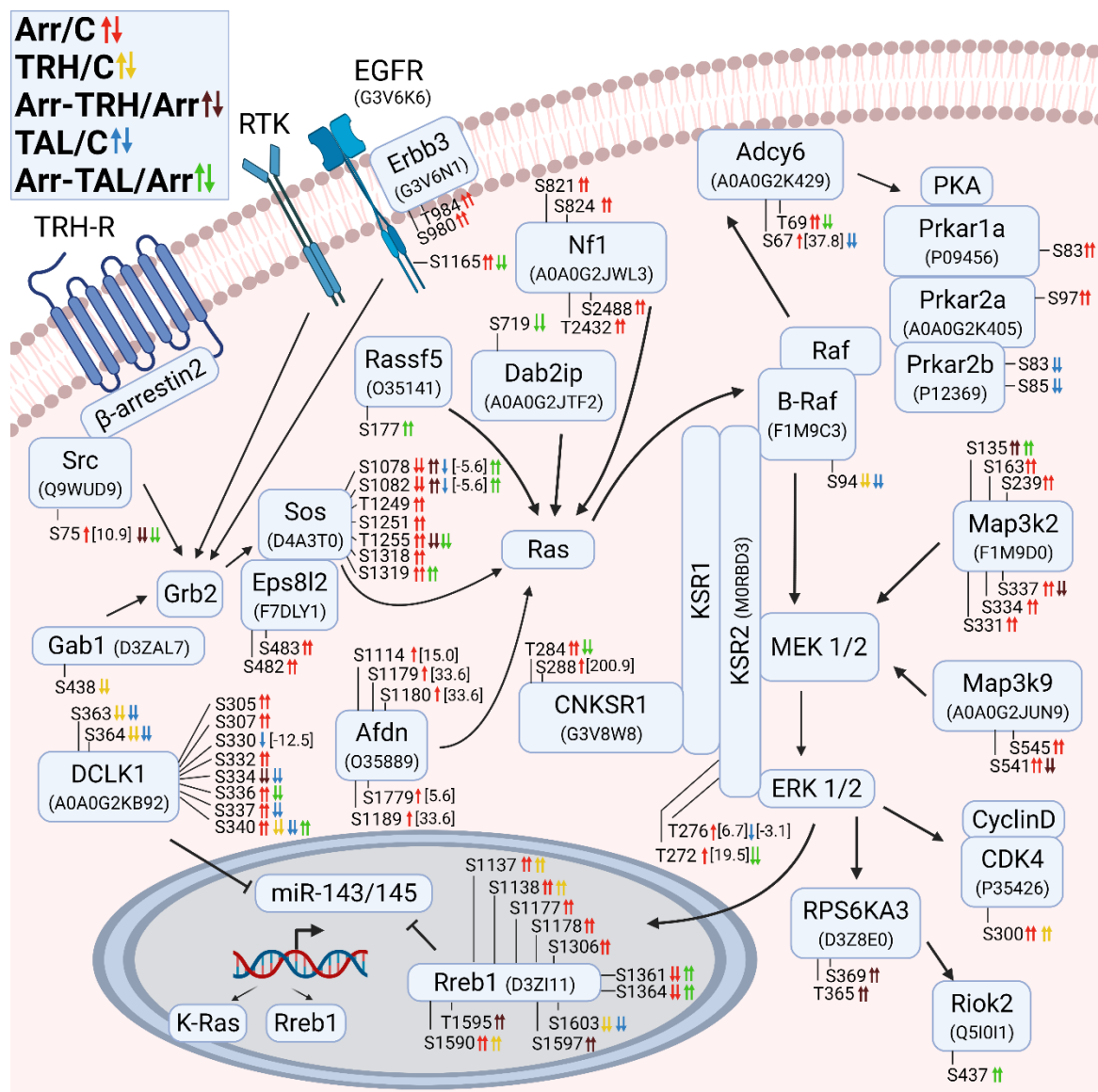
Přestože ani inhibice β -arrestinu2, ani aktivace TRH nebo TAL neindukovaly změny ve fosforylacích kináz MEK1/2 a ERK1/2, fosforylační místa některých jejich interakčních partnerů a efektorů ovlivněna byla. Při snížené expresi β -arrestinu2 byl detekován nárůst ve fosforylaci na Thr272 (19,5x) a Thr276 (6,7x) u kinázového supresoru Ras 2, KSR2, a naopak pokles na Thr276 (více než 3x) po stimulaci TAL a na Thr272 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 a s následnou stimulací TAL. U proteinu interagujícího s KSR1, CNKSR1, došlo po inhibici β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci na Thr284 a Ser288 (více než 200x) a ke snížení fosforylace na Thr284 po inhibici β -arrestinu2 a následné aplikaci TAL. Změny ve fosforylaci MAP kináz Map3k2 a Map3k9, které mohou modulovat funkci MEK1/2, byly také nejvíce detekovány

ve vzorcích se sníženou expresí β -arrestinu2. Za těchto podmínek se zvýšila fosforylace na Ser163, Ser239, Ser331, Ser334 a Ser337 u Map3k2 a na Ser541 a Ser545 u Map3k9. Následná aplikace TRH nebo TAL vedla ke zvýšení fosforylace Ser135 u Map3k2 a stimulace TRH k poklesu ve fosforylaci na Ser337 u Map3k2 a Ser541 u Map3k9 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2.

Aktivace ERK1/2 řídí fosforylaci mnoha substrátů. V naší studii došlo k ovlivnění fosforylace u proteinů Rps6ka3, Rreb1 nebo Cdk4. V rámci kinázy Rps6ka3 byla detekována zvýšená fosforylace na Thr365 a Ser369 po inhibici β -arrestinu2 a následné aplikaci TRH. Substrátem této kinázy je například kináza Riok2, u které byl identifikován nárůst ve fosforylaci na Ser437 po snížení exprese β -arrestinu2 a následné stimulaci TAL. U buněk, kde byla snížena hladina β -arrestinu2, a nebo stimulovaných TRH, došlo k nárůstu fosforylace na Ser300 u kinázy Cdk4. U dalšího substrátu ERK1/2, transkripčního faktoru Rreb1, bylo odhaleno nejvíce fosforylačních změn. Na Ser1177, Ser1178 a Ser1306 vedlo snížení exprese β -arrestinu2 ke zvýšení ve fosforylaci, zvýšení fosforylace bylo detekováno také na Ser1137, Ser1138 a Ser1590 u buněk se sníženou úrovní exprese β -arrestinu2 nebo po stimulaci TRH. Naopak ke snížení fosforylace došlo na Ser1603 po aplikaci jak TRH, tak TAL, a na Thr1595 a Ser1597 po snížení hladin β -arrestinu2 a následné stimulaci TRH. Na Ser1361 a Ser1364 vedl pokles v expresi β -arrestinu2 ke snížení fosforylace a naopak pokles v expresi β -arrestinu2 s následnou stimulací TAL ke zvýšení ve fosforylaci těchto dvou fosforylačních míst.

Tab. 14: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|---|
| Gab1 | Ser438; D3ZAL7 | nachází se v blízkosti Met-vazebné domény |
| Sos1 | Ser1078, Ser1082, Thr1249, Ser1251, Thr1255, Ser1318, Ser1319; D4A3T0 | lokalizováno v doméně pro vazbu Grb2 |
| Dclk1 | Ser305, Ser307, Ser330, Ser332, Ser334, Thr336, Ser337, Ser340; A0A0G2KB92 | zodpovědné za aktivitu Dclk1 |



Obr. 49: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Ras a dráze Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/ERK. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé proteiny, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GH1 buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Namba et al., 2015; Young et al., 2021; Won et al., 2019; Llaverro et al., 2021; Sureban et al., 2013; Deng et al., 2020; Goel et al., 2018; Cerezo et al., 2021; Llaverro et al., 2019; Lavoie et al., 2018; Bok et al., 2020; Kent et al., 2013.

Změny ve fosforylaci byly zjištěny také u kinázy Delc1. Potlačení exprese β -arrestinu2 indukovalo nárůst ve fosforylaci na Ser305, Ser307, Ser332, Ser336, Ser337, Ser340. Naopak aktivace receptorů prostřednictvím TRH i TAL měla za následek pokles fosforylace na Ser340, Ser363 a Ser364. Stimulace TAL dále vedla k mírnému snížení fosforylace na Ser330 (12,5x) a poklesu ve fosforylaci na Ser334 a Ser337. Ke snížení fosforylace na Ser334 došlo také po stimulaci TRH u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Stimulace TAL po potlačení exprese β -arrestinu2 naopak vedla ke snížení fosforylace na Ser336 a zvýšení fosforylace na Ser340.

6.4.2 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rho

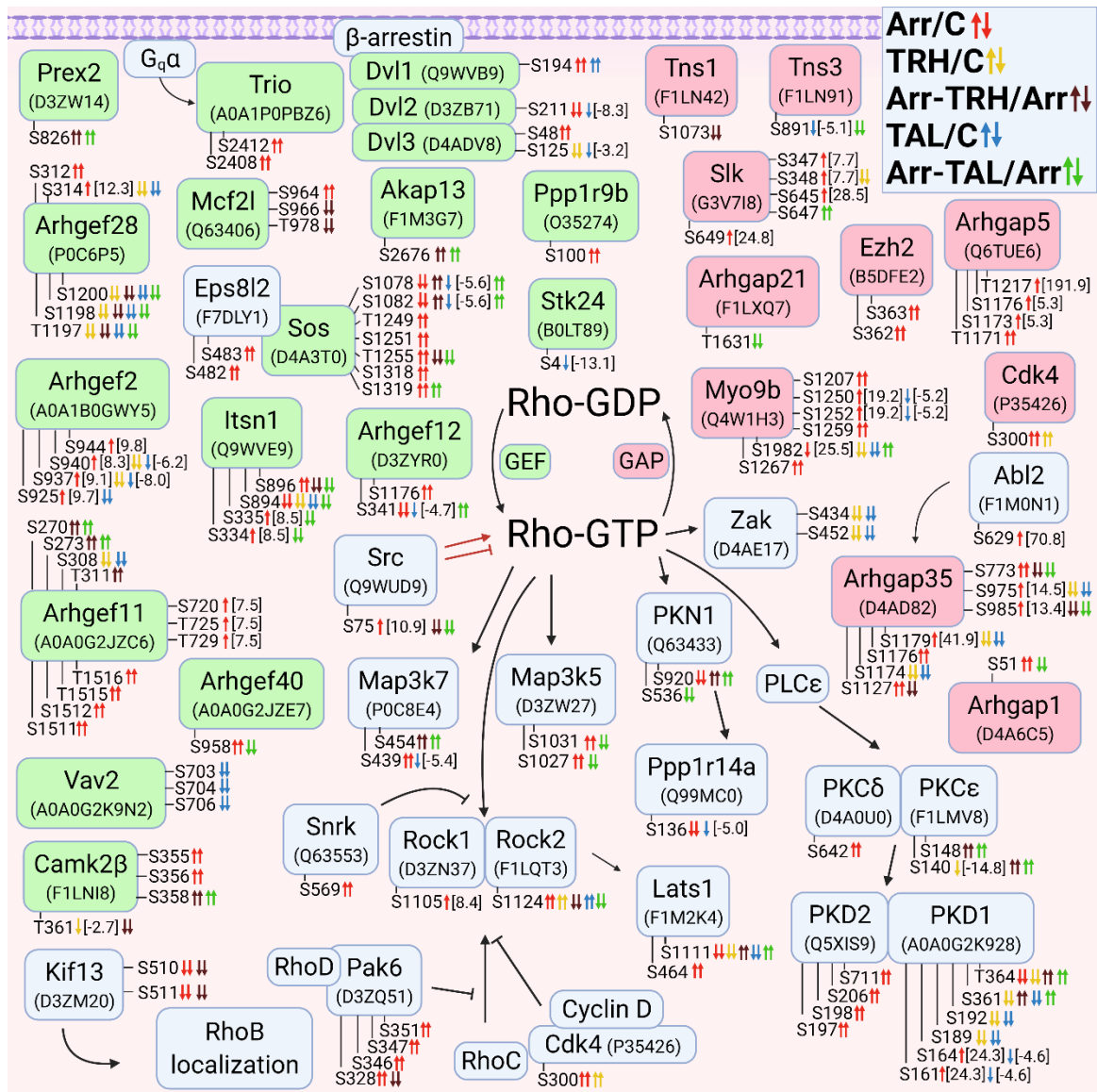
Další třídou malých GTPáz ovlivněných sníženou expresí β -arrestinu2 a stimulací TRH/TAL jsou Rho/Rac/Cdc42 GTPázy. V následujících třech podkapitolách jsou pro přehlednost jednotlivé proteiny rozděleny podle své příslušnosti k Rho GTPázám (6.4.2), Rac GTPázám (6.4.3) nebo Cdc42 GTPázám (6.4.4). Ke změnám ve fosforylaci v rámci této rodiny docházelo jak u GEF faktorů (zeleně zbarvené), tak u proteinů s GAP aktivitou (červeně zbarvené) a také u různých efektorů těchto GTPáz (bleděmodře zbarvené). Více fosforylačních změn bylo evidováno u GEF faktorů v porovnání s GAP proteiny. Ve většině případů docházelo k nárůstu ve fosforylaci GEF a GAP po snížení hladin β -arrestinu2 a k poklesu ve fosforylaci po stimulaci TRH a TAL. Změny pozorované ve funkčních doménách nebo v místech pro interakci s jinými proteiny jsou znázorněny v tabulce 15.

U proteinu Arhgef2 se zvýšila fosforylace na Ser925 (9,7x), Ser937 (9,1x), Ser940 (8,3x) a Ser944 (9,8x) po siRNA inhibici β -arrestinu2 a naopak po stimulaci receptorů prostřednictvím TAL fosforylace na Ser925, Ser937 (8x) a Ser940 (6,2x) poklesla v porovnání s kontrolou (obr. 50). Pokles ve fosforylaci na Ser937 a Ser940 byl detekován také po stimulaci TRH. Změny ve fosforylaci proteinu Arhgef11 byly naakumulovány do třech klastrů. V první oblasti bylo evidováno zvýšení fosforylace na Ser270, Ser273 a Thr311 po stimulaci TRH a TAL u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 a pokles ve fosforylaci na Ser308 po stimulaci TRH a TAL u kontrolních buněk. V dalších dvou oblastech došlo vždy ke zvýšení ve fosforylaci po snížení exprese β -arrestinu2. V druhé oblasti byl evidován více než sedminásobný nárůst v případě fosforylačních míst Ser720, Thr725 a Thr729 a ve třetí oblasti nastalo zvýšení fosforylace na Ser1511, Ser1512, Thr1515 a Thr1516. V případě proteinu Arhgef28 byly také zjištěny dvě oddělené oblasti s výskytem změn ve fosforylaci. Na fosforylačních místech Ser312 a Ser314 (12,3x) v první oblasti byla zvýšená fosforylace u buněk s potlačenou expresí β -arrestinu2 a naopak na Ser314 snížená fosforylace v případě, že buňky byly stimulovány TRH nebo TAL. Druhý klaster fosforylačních míst sestával z Thr1197, Ser1198 a Ser1200, u kterých došlo k poklesu ve fosforylaci po aplikaci TRH nebo TAL, ať už k buňkám kontrolním nebo vystaveným snížené

expresi β -arrestinu2. U dalších dvou GEF faktorů, jmenovitě Arhgef12 a Arhgef40, bylo zjištěno ovlivnění fosforylace pouze za podmínek snížené hladiny β -arrestinu2 a/nebo stimulace TAL. Také cytosolární proteiny Dvl1, Dvl2, Dvl3, Vav2 a Camk2b byly rozdílně fosforylovány působením TRH a TAL. Zatímco TAL vedl ke zvýšení fosforylace Ser194 u Dvl1, snížení fosforylace na Ser211 (8,3x) u Dvl2, Ser125 u Dvl3, Ser703, Ser704 a Ser706 u Vav2, TRH snížil fosforylaci pouze na Ser125 u Dvl3 a lehce také na Thr361 (2,7x) u Camk2b. U všech sledovaných experimentálních kombinací také došlo ke změnám ve fosforylaci u intersektinu-1 (Itsn1).

Nejvíce fosforylačních změn mezi GAP proteiny bylo evidováno u Myo9b a Arhgap35. Aplikace TRH a TAL způsobila u několika fosforylačních míst u těchto proteinů pokles ve fosforylaci, který byl pouze s jednou výjimkou (Ser1982, Myo9b, aplikace TAL) zachován i v případě předchozího snížení exprese β -arrestinu2.

Změny ve fosforylacích byly kromě GEF a GAP zjištěny také u několika efektorů Rho GTPáz a proteinů s nimi asociovanými. U některých z nich byly detekovány fosforylační změny pouze po snížení hladin β -arrestinu2 (Prkcd, Prkd2, Rock1, Snrk). Snížení hladin β -arrestinu2 nebo aplikace TRH nebo TAL vyvolalo zvýšení fosforylace na Ser1124 u proteinkinázy Rock2, naproti tomu snížení hladin β -arrestinu2 následované stimulací TRH nebo TAL způsobilo pokles ve fosforylaci tohoto fosforylačního místa. Odlišná fosforylace byla pozorována také u několika MAP kináz. Inhibice β -arrestinu2 způsobila zvýšení fosforylace na Ser1027 a Ser1031 u Map3k5, ale následná stimulace TAL tuto fosforylaci zvrátila. U kinázy Map3k7 vedla inhibice β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci Ser439, kdežto stimulace TAL fosforylaci na tomto serinu snížila (5,4x). Současné snížení exprese β -arrestinu2 s následnou stimulací TRH nebo TAL zvýšilo fosforylaci na Ser454 u Map3k7. V rámci třetí MAP kinázy, Map3k20 (Zak), došlo na Ser434 a Ser452 k poklesu ve fosforylaci po stimulaci buněk TRH nebo TAL. Kromě výše zmíněných proteinkináz Prkcd a Prkd2, byly změny ve fosforylacích pozorovány i u několika dalších. Patří mezi ně například Pkn1, Prkd1 nebo Prkce. Jak u Pkn1, tak u Prkce bylo nejvíce změn pozorováno po aktivaci receptorů TRH a TAL u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. Nejvíce odlišných fosforylací bylo detekováno u proteinkinázy Prkd1, u které se dají jednotlivá fosforylovaná místa rozdělit do třech oblastí. V první oblasti vedl pokles v expresi β -arrestinu2 ke vzrůstu ve fosforylaci na Ser161 a Ser164 (v obou 24,3x) a k poklesu fosforylace (4,6x) po stimulaci TAL. V rámci druhého klastru došlo k poklesu ve fosforylaci na Ser189 a Ser192 po stimulaci TRH nebo TAL. U fosforylačních míst v třetí oblasti, Ser361 a Thr364, byla také pozorována snížená fosforylace po stimulaci TRH a TAL nebo po inhibici β -arrestinu2. Když byly buňky ale před stimulací TRH a TAL vystaveny inhibici β -arrestinu2, došlo k nárůstu ve fosforylaci u těchto dvou fosforylačních míst.



Obr. 50: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Rho. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Rho GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Rho GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny, přičemž červené šipky představují již potvrzené interakce mezi fosforylačním místem a fosforylujícím efektořem nebo proteinem navazujícím dále v signalizaci. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Bros et al., 2019; Li et al., 2020b; Yi et al., 2016; Schlessinger et al., 2009;

Cook et al., 2014; Blangy, 2017; Gong et al., 2018; Maiwald et al., 2016; Akizu a Martínez-Balbás, 2016; Feng et al., 2014; Muller et al., 2020; Kim et al., 2000; Shimizu et al., 2008; Lartey a Bernal, 2009; Cossette et al., 2016; Fokin et al., 2016; Rangamani et al., 2016; Durkin et al., 2017; Eisler et al., 2018; Forrest et al., 2018; Kurtzeborn et al., 2019; Pedraza et al., 2019; Asih et al., 2020; Schulte a Shenoy, 2011; Clayton a Ridley, 2020; Fang et al., 2020; Toliás et al., 2011; Kovacs et al., 2009, Pan et al., 2011.

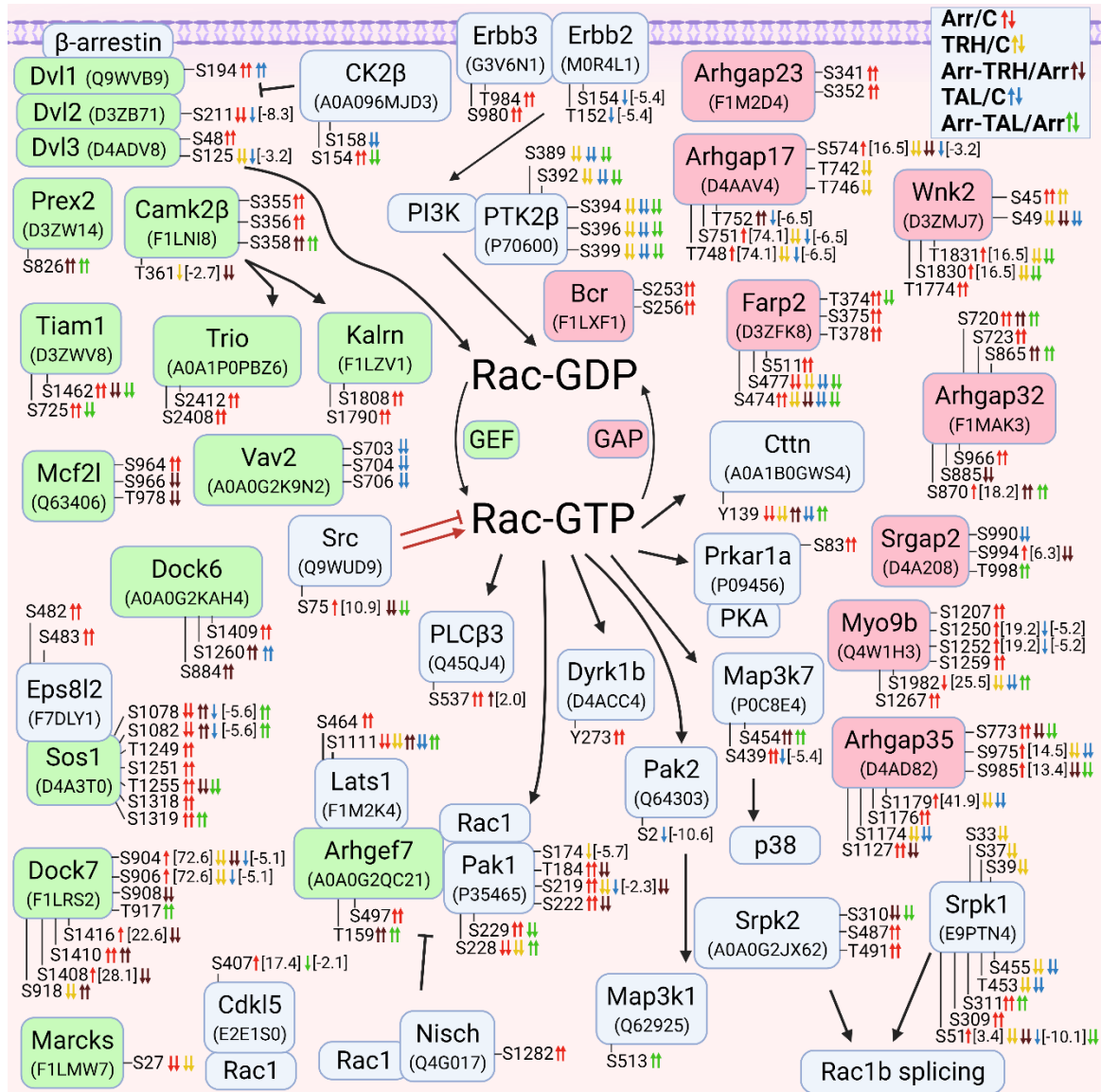
Tab. 15: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|--|
| Dvl3 | Ser48; D4ADV8 | lokalizováno v DIX doméně pro vazbu Dvl1 |
| Pkn1 | Ser920; Q63433 | regulace aktivity Pkn1 |

6.4.3 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rac

Téměř u všech GEF, GAP i ostatních efektorových proteinů souvisejících s dráhou Rac GTPáz indukovala stimulace TRH nebo TAL pokles ve fosforylaci jednotlivých fosforylačních míst (obr. 51). Některé GEF faktory účastníci se regulace Rho GTPáz hrají roli také v regulaci aktivity Rac GTPáz. Patří mezi ně například Camk2b, Dvl proteiny, Mcf2l, Prex2 nebo Vav2. Změny související s těmito proteiny byly popsány už v kapitole 6.4.2. U regulační podjednotky kaseinkinázy (Csnk2b), která reguluje funkci Dvl proteinů, byl zjištěn nárůst ve fosforylaci na Ser154 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 a pokles po následné stimulaci TAL a dále pokles na Ser158 u kontrolních buněk po stimulaci TAL. Druhý ligand, TRH, a také snížená exprese β -arrestinu2 způsobily pokles fosforylace na Ser27 u substrátu proteinkinázy C, Marcks. Oba ligandy, TRH i TAL, ovlivnily fosforylaci u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 různě u několika dalších GEF, například Dock6, Mcf2l, Prex2 a Tiam1. Nejzasazenějším proteinem ze všech GEF faktorů byl Dock7, který byl rozdílně fosforylován na osmi různých aminokyselinových zbytcích.

Stejně jako GEF faktory, také některé GAP regulují aktivitu jak Rho GTPáz, tak Rac GTPáz. Takovým příkladem je Myo9b nebo Arhgap35, u kterých jsme změny ve fosforylacích probrali v předchozí kapitole 6.4.2. U dvou dalších GAP, Arhgap17 a Farp2, byla zjištěna snížená fosforylace po stimulaci TRH a TAL u kontrolních buněk. V případě Farp2 byl tento pokles detekován i po stimulaci oběma hormony u buněk se sníženou úrovní β -arrestinu2, kdežto u Arhgap17 pouze v případě, že byly tyto buňky vystaveny stimulaci TRH, stimulace TAL neměla u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 na fosforylační stav Arhgap17 žádný vliv.



Obr. 51: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Rac. V bíledomých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačeny jednotlivé efekторы Rac GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Rac GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny, přičemž červené šipky představují již potvrzené interakce mezi fosforylačním místem a fosforylujícím efektořem nebo proteinem navazujícím dále v signalizaci. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Miyamoto et al., 2007; Lee et al., 2016; Okabe et al., 2003; Harden et al.,

2009; Schlessinger et al., 2009; Kichina et al., 2010; He et al., 2013; Kuijl et al., 2013; Lopez-Guerrero et al., 2020; Vasco, 2021; Kovacs et al., 2009; Schulte a Shenoy, 2011; Zamboni et al., 2018; Kim et al., 2000; Bryja et al., 2008; Wang et al., 2008; Moniz a Jordan, 2010; Manchanda et al., 2013; Lopez-Haber et al., 2016; Nuche-Berenguer et al., 2016; Fu, 2017; Forrest et al., 2018; Kurtzeborn et al., 2019; Mertens et al., 2003; Heo et al., 2005; Kukimoto-Niino et al., 2019; Maiwald et al., 2016; Chen et al., 2010; Welch, 2015; Feng et al., 2014; Pan et al., 2011; Offenhauser et al., 2004; Tobon et al., 2018; Arash et al., 2014; Beck et al., 2014; Yu et al., 2015; Nola et al., 2008.

Zaznamenány byly dále i změny ve fosforylaci cytoplazmatické proteinkinázy Wnk2, v rámci které byla opět jednotlivá fosforylační místa rozřazena do dvou oblastí. Do prvního klastru jsou zařazena dvě fosforylační místa, Ser45 a Ser49. V případě Ser45 byla zvýšená fosforylace u buněk ovlivněných sníženou expresí β -arrestinu2 a nebo aplikací TRH. Naproti tomu na Ser49 došlo k poklesu fosforylace po stimulaci jak TRH, tak TAL u kontrolních buněk a dále po stimulaci TRH u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Co se týče druhé oblasti, na třech fosforylačních místech, na Thr1774, Ser1830 a Thr1831, vedla inhibice β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci, zatímco stimulace TRH u kontrolních buněk a aplikace TAL k buňkám se sníženou hladinou β -arrestinu2 měla za následek pokles ve fosforylaci na Ser1830 a Thr1831. Stejně jako v případě Rho GTPáz, i v signalizaci Rac GTPáz byly detekovány proteiny, u kterých nastala změna ve fosforylaci pouze při snížení exprese β -arrestinu2. Ze skupiny GEF faktorů to byly kináza Kaln a protein Trio, mezi GAP proteiny zejména Arhgap23 a protein Bcr.

Mezi proteiny, u nichž došlo ke změnám ve fosforylaci patří také receptorové tyrozinokinázy Erbb2 a Erbb3. U Erbb3 vyvolal zvýšení ve fosforylaci na Ser980 a Thr984 pouze pokles v hladinách β -arrestinu2, zatímco v případě Erbb2 došlo k mírnému poklesu ve fosforylaci na Thr152 a Ser154 (oba shodně 5,4x) po stimulaci TAL. Další změny ve fosforylaci způsobené stimulací TAL byly odhaleny v signalizaci níže od Erbb2. U jednoho z interakčních partnerů PI3K, Ptk2b, nastal pokles ve fosforylaci po stimulaci TAL na pěti fosforylačních místech, na Ser389, Ser392, Ser394, Ser396 a Ser399. Zároveň na všech těchto serinových zbytcích došlo k poklesu ve fosforylaci i po stimulaci TRH u kontrolních buněk a po stimulaci TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. PI3K působením přes Rac GTPázu může řídit signalizaci směrem k proteinkinázám Pak1 a Pak2. V našich experimentálních podmínkách způsobila stimulace TAL pokles (10,6x) ve fosforylaci na Ser2 u kinázy Pak2. Také u kinázy Pak1 měla aplikace TAL vliv na fosforylaci, na Ser222 došlo k mírnému poklesu (2,3x) po stimulaci kontrolních buněk. Na rozdíl od Pak2, u Pak1 kinázy byl detekován pokles ve fosforylaci také po stimulaci TRH, a to na Ser174, Ser219 a Ser228. Na pěti dalších fosforylačních zbytcích (Thr184, Ser219, Ser222, Ser228 a Ser229) byly pozorovány změny ve fosforylaci způsobené inhibicí β -arrestinu2. Aplikací TRH k buňkám s nízkými hladinami β -arrestinu2 došlo k poklesu ve fosforylaci na Thr184, Ser219 a

Ser222 a po aplikaci TAL byl u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 detekován jednak pokles ve fosforylaci (Ser229) a jednak nárůst ve fosforylaci (Ser228).

K interakčním partnerům Pak1 patří například Arhgef7 a Lats1. I v případě těchto proteinů vedla inhibice β -arrestinu2 a aplikace ligandů ke změnám ve fosforylaci. Mezi efektoři Pak2 se řadí MAP kináza Map3k1, u které byl detekován nárůst ve fosforylaci na Ser513 po stimulaci TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Změny ve fosforylacích byly prokázány také u proteinkináz Srpk1 a Srpk2, které se účastní alternativního sestřihu Rac1. Zatímco na fosforylaci Srpk2 měla vliv pouze inhibice β -arrestinu2 (Ser487 a Thr491) nebo následná stimulace TRH a TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 (Ser310), fosforylace Srpk1 se dá rozdělit do několika oblastí. U první oblasti zahrnující Ser33, Ser37, Ser39 a Ser51 byla pozorována snížená fosforylace po aktivaci receptorů prostřednictvím TRH. U Ser51 navíc docházelo k poklesu ve fosforylaci po stimulaci TAL a oba ligandy také snížily fosforylaci na tomto fosforylačním místě u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Druhý klastr (Ser309 a Ser311) byl ovlivněn sníženou expresí β -arrestinu2 nebo současnou stimulací TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Pokles ve fosforylaci na Thr453 a Ser455, představující třetí fosforylační oblast, byl detekován po stimulaci TRH nebo TAL u kontrolních buněk.

6.4.4 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signální dráze monomerních G proteinů z rodiny Cdc42

V případě Cdc42 GTPáz bylo pozorováno více změn ve fosforylaci u GEF faktorů než u GAP proteinů (obr. 52). Některé Cdc42 GEF faktory slouží zároveň jako aktivátory Rac GTPáz (obr. 51) a Rho GTPáz (obr. 50), například Dock6, Dock7, Dvl1-Dvl3, Itsn1, Marcks, Mcfl2, Prex2 nebo Tiam1. Změny, ke kterým v těchto proteinech působením inhibice β -arrestinu2 a/nebo aplikací hormonů došlo, byly popsány výše. Farp2, který slouží jako GEF faktor pro Cdc42 GTPázy, je naopak GAP proteinem v případě Rac GTPáz. Nárůst ve fosforylaci Arhgef7 byl pozorován po snížení exprese β -arrestinu2 na Ser497 a po následné aplikaci TRH nebo TAL u buněk s nízkými hladinami β -arrestinu2 na Thr159. K interakčním partnerům Arhgef7 se řadí proteiny Cblb, Git1, Pak, Rac1 nebo Scribble. U E3 ubiquitin-proteinligázy Cblb vedla stimulace kontrolních buněk pomocí TRH, TAL a také snížením exprese β -arrestinu2 k poklesu ve fosforylaci na Ser476, Ser480, Ser483 a Ser484. Pokud byly TRH a TAL stimulovány buňky se sníženou expresí β -arrestinu2, došlo naopak k nárůstu ve fosforylaci ve všech zmíněných fosforylačních místech Cblb. Co se týče Git1, docházelo ke změnám ve fosforylaci ve dvou oddělených klastrech. V první oblasti zahrnující Ser376, Ser379 a Thr383 byl zaznamenán jednak nárůst ve fosforylaci u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2 a u kontrolních buněk po stimulaci TAL a jednak pokles ve fosforylaci po aplikaci TRH u kontrolních buněk a po aplikaci TRH i TAL u buněk po inhibici β -arrestinu2. Fosforylace v druhé oblasti, na Ser583, Ser587 a Tyr589, byla ovlivněna pouze inhibicí β -arrestinu2. Dalším proteinem interagujícím s Arhgef7 je scaffold protein scribble (Scrib).

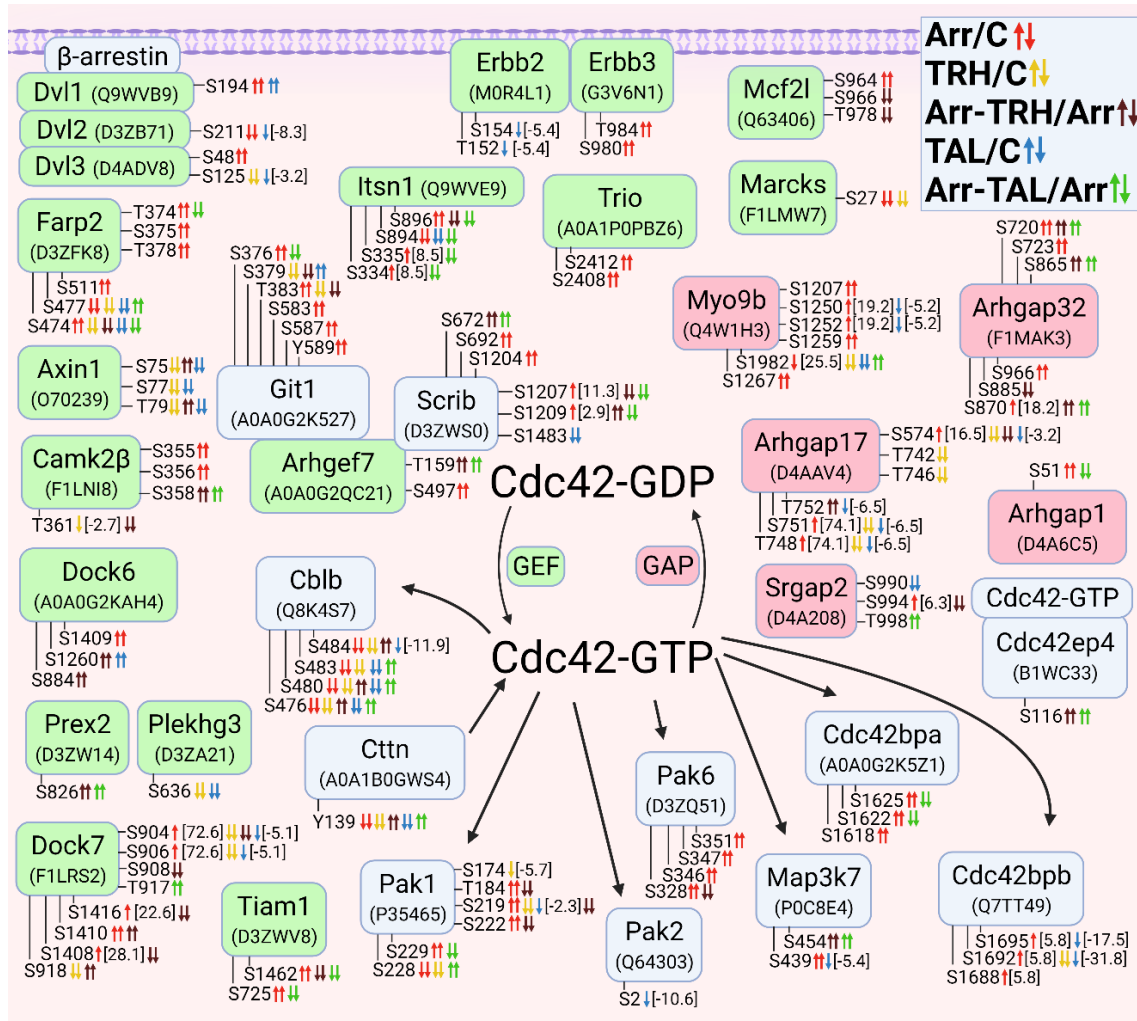
Fosforylační místa Scrib na Ser672, Ser692, Ser1204, Ser1207 a Ser1209 byla ovlivněna různě, ale pouze u buněk vystavených inhibici β -arrestinu2 nebo následné stimulaci ligandy. U serinu na pozici 1483 došlo k poklesu ve fosforylaci po ovlivnění TAL u kontrolních buněk. Dalším GEF faktorem je cytoplazmatický protein Axin1, u kterého stimulace TRH u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 vyvolala zvýšení ve fosforylaci na Ser75 a Thr79.

Co se týče GAP proteinů inaktivujících rodinu Cdc42 GTPáz, ke změnám ve fosforylaci došlo pouze u pěti z nich. Všechny se navíc účastní inaktivace také Rac nebo Rho GTPáz a tudíž byly jednotlivé změny probrány už výše v příslušných kapitolách (6.4.2 a 6.4.3).

Mezi efekторы Cdc42 GTPáz, u kterých byly zaznamenány změny ve fosforylaci, se řadí proteinkinázy Pak1, Pak2 a Pak6, MAP kináza Map3k7, proteinkinázy vázající Cdc42 (Cdc42bpa a Cdc42bpb) a efektorový protein Cdc42 (Cdc42ep4). Proteinkinázy Pak a Map3k7 jsou společné efekторы GTPáz Cdc42, Rho a Rac a změny ve fosforylacích v jejich sekvencích byly tedy také popsány výše (kapitoly 6.4.2 a 6.4.3). Jak u Cdc42bpa, tak u Cdc42bpb docházelo ke zvýšení fosforylace po inhibici exprese β -arrestinu2. Naopak snížení fosforylace bylo zaznamenáno u Cdc42bpa po stimulaci TAL u buněk se sníženou hladinou exprese β -arrestinu2 a u Cdc42bpb u kontrolních buněk po aplikaci jak TRH, tak TAL. Zvýšení ve fosforylaci na Ser116 bylo detekováno u proteinu Cdc42ep4 v buňkách se sníženou expresí β -arrestinu2 stimulovaných TRH i TAL. Všechny změny související s lokalizací do funkčních domén proteinů nebo jejich interakcemi s dalšími proteiny znázorňuje tabulka 16.

Tab. 16: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|---|
| Arhgef7 | Ser497; A0AG2QC21 | lokalizováno v plekstrin homologní doméně |
| Cblb | Ser476, Ser480; Q8K4S7 | stabilizace Cblb |



Obr. 52: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Cdc42. V bíledmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Cdc42 GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Cdc42 GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Miyamoto et al., 2007; Schlessinger et al., 2009; Kichina et al., 2010; He et al., 2013; Kovacs et al., 2009; Schulte a Shenoy, 2011; Zamboni et al., 2018; Nuche-Berenguer et al., 2016; Kurtzborn et al., 2019; Tobon et al., 2018; Yu et al., 2015; Richnau a Aspenstrom, 2001; Fortin et al., 2012; Masaki, 2012; Chen et al., 2015; Brudvig et al., 2018; Farrugia a Calvo, 2016; Rangamani et al., 2016; Kukimoto-Niino et al., 2019; Muller et al., 2020; Boissier a Huynh-Do, 2014; Nola et al., 2008; Lai et al., 2009.

6.4.5 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Arf

U skupiny Arf GTPáz bylo detekováno méně GEF faktorů s různými změnami ve fosforylaci než GAP proteinů (obr. 53). Arhgef7 je GEF faktorem Arf GTPáz, stejně jako předchozích dvou tříd, Rac a Cdc42 GTPáz. Jak bylo již zmíněno, slouží jako interakční partner pro proteiny Git1 a Scrib a jako scaffold protein pro Lats1 a Stk3. Jedním z efektorů komplexu Arhgef7-Git1 je fosfolipáza C δ 1 (PLC δ 1). Na Ser454 a Ser460 byl zaznamenán nárůst ve fosforylaci PLC δ 1 po stimulaci ligandy a také po potlačení exprese β -arrestinu2. Naproti tomu na Thr457 došlo k poklesu ve fosforylaci po inhibici β -arrestinu2, což bylo zvráceno působením TAL. Další protein s GEF aktivitou, Gbf1, byl rozdílně fosforylován ve dvou oblastech. V první oblasti, na Ser340 a Ser345, vedl pokles v expresi β -arrestinu2 k nárůstu fosforylace, stimulace TAL vedla k mírnému poklesu (4,3x) ve fosforylaci na Ser345 u kontrolních buněk a k poklesu ve fosforylaci na Ser340 u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. Stimulace TRH u kontrolních buněk naopak způsobila nárůst ve fosforylaci na Ser340 u Gbf1. Gbf1 může dále signalizovat přes Arf1, který je interakčním partnerem pro Prkd2. Fosforylace proteinkinázy Prkd2 byla ovlivněna pouze inhibicí β -arrestinu2. U dalších tří GEF faktorů, Arfgef1, Arfgef2 a Arfgef3 došlo ke změnám ve fosforylaci za různých podmínek. U Arfgef1 a Arfgef2 byla fosforylace opět soustředěna do několika klastrů. Co se týče Arfgef1, na Ser286 byla fosforylace snížena u kontrolních buněk po stimulaci TAL a u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 po stimulaci TAL i TRH. Na Ser393 a Ser394 shodně vedl pokles v expresi β -arrestinu2 k poklesu ve fosforylaci, která byla zvrácena působením TAL. Samotný TAL i TRH u buněk kontrolních zapříčinil pokles na Ser394. V další oblasti, na Ser1563 a Ser1566 byl detekován nárůst ve fosforylaci po inhibici β -arrestinu2 a u Ser1566 také po následné stimulaci TRH u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. V případě Arfgef2 byl detekován nárůst ve fosforylaci po inhibici β -arrestinu2 ve všech třech rozdílně fosforylovaných oblastech, ale pouze v první oblasti (Ser218 a Ser227) byl detekován pokles ve fosforylaci po stimulaci TRH nebo TAL. U proteinu Arfgef3 došlo k poklesu ve fosforylaci pouze na Ser387 po stimulaci TRH a TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2.

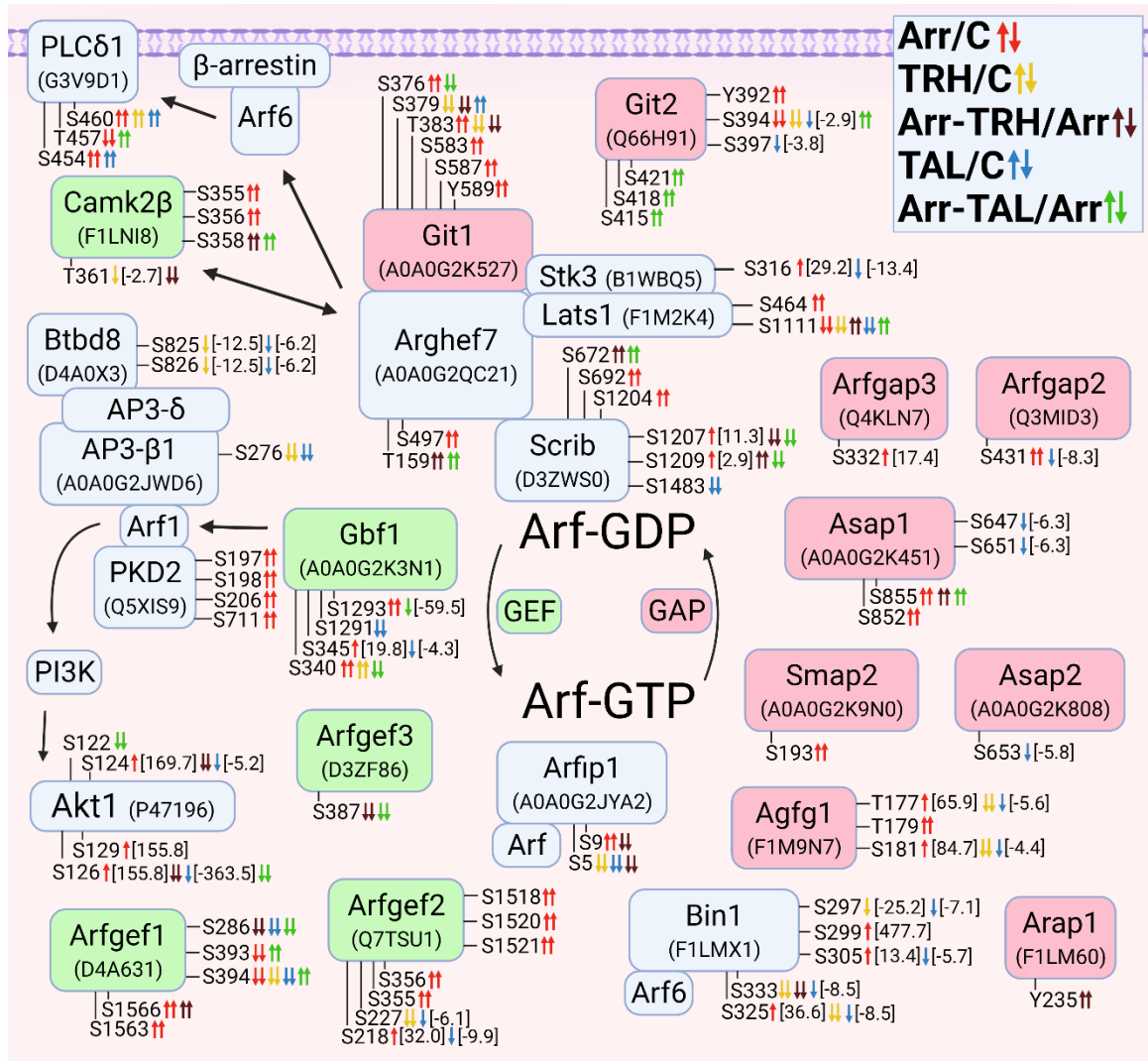
Změny ve fosforylaci u GAP proteinu Git2 se opět dají rozdělit do dvou oblastí. V první oblasti byl pozorován nárůst ve fosforylaci na Tyr392 a pokles na Ser394 po inhibici β -arrestinu2. Na Ser394 navíc docházelo k poklesu také po aktivaci receptorů prostřednictvím TRH a TAL (2,9x) a k nárůstu ve fosforylaci po stimulaci TAL u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2. Ve druhé oblasti, na Ser415, Ser418 a Ser421, se shodně zvýšila fosforylace po působení TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. U dvou proteinů, Arfgap3 a Smap2, byly změny ve fosforylaci detekovány pouze po inhibici exprese β -arrestinu2. U dalších čtyřech GAP, Agfg1, Arfgap2, Asap1 a Asap2, nastal po stimulaci TAL pokles ve fosforylaci v některých fosforylačních místech. U Agfg1 indukovala pokles ve fosforylaci také stimulace TRH. Naproti tomu v případě Arap1 a

Asap1 došlo k nárůstu ve fosforylaci po stimulaci TRH nebo TAL u buněk se sníženou fosforylací β -arrestinu2.

Změny ve fosforylaci u Arf vázajícího proteinu, Arfaptinu-1 (Arfp1), nastaly pouze v jeho N-koncové oblasti. Na Ser5 byla snižená fosforylace po působení TRH nebo TAL u kontrolních buněk a TRH u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2. Na Ser9 byl nárůst ve fosforylaci u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 zvrácen působením TRH. U proteinu Bin1 docházelo ke změnám ve fosforylaci působením TRH i TAL a také inhibicí β -arrestinu2. Aktivace receptorů ligandy TRH a TAL, ať už u buněk kontrolních nebo po inhibici β -arrestinu2, vedla k poklesu ve fosforylaci, naproti tomu pokles v expresi β -arrestinu2 vyvolal nárůst ve fosforylaci v molekule Bin1. Tabulka 17 znázorňuje změny proteinů detekované ve funkčních oblastech nebo v místech pro vazbu s jinými proteiny.

Tab. 17: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|--|--|
| Git2 | Tyr392, Ser415; Q66H91 | vazba paxilinu, vazba 14-3-3 proteinů |



Obr. 53: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Arf. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekty Arf GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Arf GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranaté závorce) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β-arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Eiseler et al., 2016; Schürman et al., 2020; Monetta et al., 2007; Sztul et al., 2019; Nola et al., 2008; Zhou et al., 2016.

6.4.6 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Rab

Rab GTPázy patří mezi klíčové proteiny účastníci se regulace vezikulárního transportu. Vezikulární transport začíná na membráně, kde je vznik časného endozomu (EE) řízen proteiny podrodiny Rab5. Rab5 interaguje se širokým spektrem proteinů, z nichž mnoho z nich bylo výrazně ovlivněno inhibicí β -arrestinu2 (obr. 54). U efektorových proteinů Rabep1 a Rabep2 došlo po inhibici β -arrestinu2 k rozdílným změnám ve fosforylaci. Zatímco snížení exprese β -arrestinu2 u Rabep1 způsobilo mírný nárůst ve fosforylaci na Ser407 (5,1x) a pokles ve fosforylaci Ser408, u Rabep2 vedlo k nárůstu fosforylace na Ser176 a Ser180 (oba shodně 13x). U regulačního proteinu pro Rab5, Gapvd1, došlo u všech změněných fosforylačních míst také ke zvýšení ve fosforylaci. Naopak v případě intersektinu-2 (Itsn2), další důležité molekuly v procesech endocytózy, vyvolala inhibice β -arrestinu2 pokles ve fosforylaci na Ser231 a Ser908. Dále u PLC β_3 , jejímž substrátem je Rabep1, vyvolalo snížení hladin β -arrestinu2 zvýšení fosforylace na Ser537. Stimulace TAL měla za následek mírný pokles (3,4x) ve fosforylaci na Ser176 a Ser180 u proteinu Rabep2 a na Ser407 (5,1x) také u proteinu Rabep1, na Ser908 (3x) u Itsn2 a na Ser450 (5,8x) u kinázy Ulk1. U Gapvd1 se snížila fosforylace na Ser788 po stimulaci TRH u kontrolních buněk a na Ser971 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Snížená exprese β -arrestinu2 a následná stimulace TAL naopak vedla ke zvýšení fosforylace na Ser903 a Ser908 v molekule Itsn2.

Změny ve fosforylaci byly detekovány také u dvou efektorových proteinů Rab GTPáz, rabenosynu a nischarinu. V případě nischarinu, který je interakčním partnerem Rab4, Rab9 a Rab14 v časných endozomech, byla zjištěna zvýšená fosforylace na Ser1282 u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. Rabenosyn, interakční partner Rab4 a Rab5, byl odlišně fosforylován po působení TAL u kontrolních buněk i buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. K nárůstu fosforylace na serinových zbytcích v sekvenci rabenosynu došlo u buněk po inhibici exprese β -arrestinu2, následná stimulace TRH u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 zapříčinila jak zvýšení, tak snížení ve fosforylaci.

Časný endozom může být recyklován zpět k plazmatické membráně prostřednictvím tzv. recyklačního endozomu (RE). Hlavními komponentami recyklační dráhy jsou Rab11, Rab14 a Rab35 GTPázy. V naší studii jsme zaznamenali změnu ve fosforylaci v několika GEF faktorech a GAP proteinech Rab proteinů zapojených v recyklační dráze. Fosforylace Dennd6a, GEF faktoru pro Rab14 protein, byla zvýšena na Ser13 a Ser16 u buněk s poklesem v expresi β -arrestinu2, což bylo v případě Ser16 zvráceno stimulací TAL. Ke změně ve fosforylaci došlo také ve třech proteinech interagujících s Rab35 GTPázou, jednomu GEF faktoru a dvou GAP proteinech. U Dennd1a, GEF faktoru pro Rab35, byl detekován lehký nárůst ve fosforylaci na Ser521 (4,1x) po inhibici β -arrestinu2 a naopak pokles po stimulaci TAL. Také v sekvenci GAP proteinu Tbc1d10a mělo potlačení exprese β -arrestinu2 za následek lehké zvýšení fosforylace

na Ser45 (5,7x) a aplikace TRH nebo TAL zapříčinila její pokles. Co se týče druhého GAP proteinu, Tbc1d10b, došlo ke změně ve fosforylaci na osmi fosforylačních místech, přičemž největší vliv měla aplikace TAL, ať už k buňkám kontrolním nebo k buňkám se sníženou expresí β -arrestinu2. Dalším členem recyklační dráhy je Rab11 protein. V rámci regulace jeho funkce byly identifikovány dva proteiny s GAP aktivitou, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci za různých podmínek. U proteinu Rabgap1 vedl pokles v expresi β -arrestinu2 nebo stimulace kontrolních buněk TRH a TAL k poklesu ve fosforylaci na Ser988 a Thr992, přičemž aplikace TAL způsobila u obou fosforylačních míst nárůst ve fosforylaci u buněk se sníženou hladinou β -arrestinu2. U druhého proteinu, Tbc1d9b, způsobila stimulace TRH pokles ve fosforylaci na Ser1084 a stimulace TAL u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 nárůst ve fosforylaci na Ser1089. Mezi efektoři Rab11 se řadí Rab11fip proteiny. V případě obou detekovaných proteinů, Rab11fip1 a Rab11fip5, vyvolala stimulace buněk TRH a TAL pokles ve fosforylaci, zatímco inhibice β -arrestinu2 měla vliv na fosforylaci jen u Rab11fip1.

Rab7 řídí transport z časných endozomů do pozdních endozomů a lysozomů. U jednoho z jeho interakčních partnerů, Pdzd8, byly identifikovány dvě oblasti se změnami ve fosforylaci. V první oblasti vedla stimulace TAL k poklesu (6,1x) ve fosforylaci na Ser495 a inhibice β -arrestinu2 naopak zvýšila fosforylaci na fosforylačních místech Ser520 a Ser537. Na fosforylační místa v druhé oblasti, Thr972, Ser973 a Ser978, měla vliv zejména stimulace TAL, a to jak u kontrolních buněk, tak u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2.

U další GTPázy, Rab12, účastníci se zejména regulace autofagických procesů, byla zjištěna zvýšená fosforylace na Ser20 a Ser24 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. Rab12 reguluje například proteinový komplex mTORC1, jeden z hlavních senzorů hladin živin, energetických zdrojů a redoxního stavu buňky. Změny ve fosforylaci mTORC1 a jeho interagujících partnerů byly popsány už výše (obr. 48). Všechny změny detekované ve funkčních doménách proteinů nebo v místech pro interakci s jinými proteiny jsou znázorněny v tabulce 18.

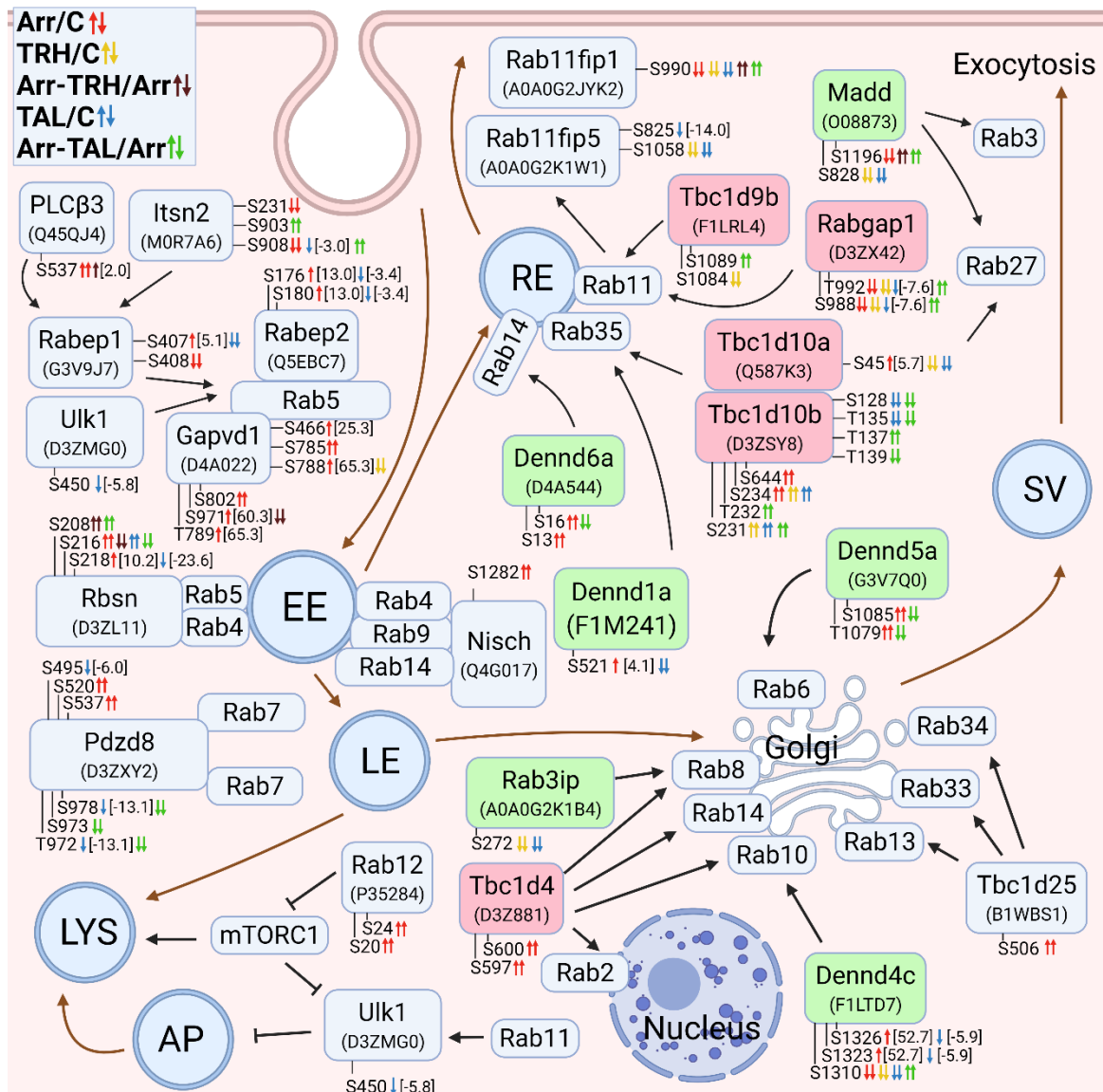
Endocytární, lysozomální a sekreční dráhy se protínají v Golgiho aparátu. Některé Rab proteiny jsou aktivní právě v této části endomembránového systému. V naší studii bylo detekováno několik interakčních partnerů Rab proteinů souvisejících s Golgiho aparátem, u kterých došlo ke změně ve fosforylaci. U Rab3ip, GEF faktoru pro Rab8 protein, způsobila aplikace TRH a TAL pokles ve fosforylaci na Ser272. V případě GEF faktoru pro Rab10, Dennd4c, byl pozorován pokles ve fosforylaci na Ser1310 u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 a nebo u buněk stimulovaných ligandy. Naproti tomu, na Ser1323 a Ser1326 vedla inhibice β -arrestinu2 k více než padesátinásobnému nárůstu ve fosforylaci, aplikace TAL naopak způsobila mírný pokles fosforylace (5,9x). Změna ve fosforylaci byla zjištěna také u proteinu Dennd5a, který moduluje aktivitu Rab6 proteinu. Po inhibici β -arrestinu2 došlo ke zvýšení ve fosforylaci na Thr1079 a Ser1085, po stimulaci buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 ligandem TAL naopak k jejímu poklesu. U dvou dalších proteinů regulujících různé Rab v rámci Golgiho aparátu, Tbc1d4

a Tbc1d25, byl pozorován nárůst ve fosforylaci na serinových zbytcích u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2.

Od *trans*-Golgiho aparátu směrem k plazmatické membráně vede sekreční dráha. Mezi Rab proteiny, které se účastní váčkového transportu a fúze s membránou se řadí zejména Rab3 a Rab27. Stimulace buněk TRH i TAL vyvolala snížení ve fosforylaci na Ser828 u proteinu Madd, GEF faktoru pro Rab3 i Rab27 protein. Snížení exprese β -arrestinu2 způsobilo pokles fosforylace na Ser1196 v sekvenci Madd, následná aplikace ligandů tento pokles zvrátila.

Tab. 18: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|--|
| Rabep1 | Ser407, Thr408; G3V9J7 | Rabaptin doména |
| PLC β 3 | Ser537; Q45QJ4 | lokalizováno v X-Y linkeru blízko C-terminální domény |
| Rbsn | Ser208, Ser216, Ser218; D3ZL11 | lokalizováno ve FYVE-finger doméně, která je zodpovědná za rekrutment do Rab5 endozomů |
| Nisch | Ser1282; Q4G017 | lokalizováno v C-terminální doméně zodpovědné za interakci s Rab proteiny |
| Pdzd8 | Thr972, Ser973, Ser978; D3ZXY2 | oblast zodpovědná za interakci GTP-Rab7 s pozdními endozomy |
| Dennd5a | Thr1079, Ser1085; G3V7Q0 | lokalizace proteinů do Golgiho aparátu |



Obr. 54: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Rab. V bíledmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Rab GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GH1 buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Rab GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranatých závorkách) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Spearman, 2018; Nassari et al., 2020; Ghelfi et al., 2018; Villarroel-Campos et al., 2016; Morgan et al., 2019; Matsui a Fukuda, 2013; Eathiraj et al., 2005; Nielsen et al., 2000; Takahashi et al., 2019; Kiral et al., 2018; Monetta et al.,

2007; Elbaz-Alon et al., 2020; Ceresa, 2006; Hermle et al., 2018; Lohr, 2014; Xiaofeng, 2018; Escobar-Henriques a Anton, 2020; Kuijl et al., 2013; Gallo et al., 2014; Chaineau et al., 2013; Li et al., 2018. EE, časný endozom (early endosome); LE, pozdní endozom (late endosome); RE, recyklační endozom; SV, sekreční váček; LYS, lysozom; AP, autofagozom.

6.4.7 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ral

Změny ve fosforylaci byly pozorovány také u několika proteinů zapojených v signalizaci Ral GTPáz (obr. 55). Jedním z nejvíce ovlivněných proteinů je GEF faktor pro Ral, Ralgps2, v jehož sekvenci došlo ke změně ve fosforylaci na sedmi fosforylačních místech. Zatímco u Ser293, Ser296 (2,1x), Ser308 (2,1x) a Ser315 vedlo snížení hladin β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci, na Ser316, Thr326 a Ser329 naopak způsobilo pokles ve fosforylaci. Stimulace TRH (6,3x) a TAL (3,6x) lehce snížila fosforylaci na Ser316, TAL navíc vedl k poklesu i na Ser296 (3x) a Ser308 (3x). Aplikace TRH k buňkám se sníženou expresí β -arrestinu2 vyvolala pokles ve fosforylaci na Ser293 a Ser316. Pokud byl k buňkám se sníženou expresí β -arrestinu2 aplikován TAL, způsobilo to pokles ve fosforylaci na Ser293 a Ser315 a nárůst na Ser308 v sekvenci Ralgps2.

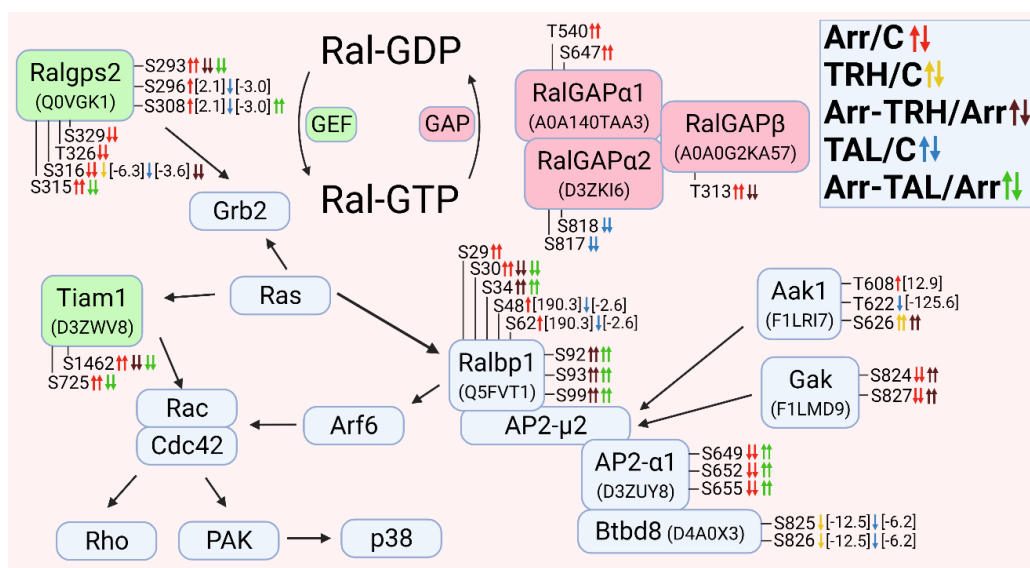
U inaktivačního faktoru Ral GTPáz, RalGAP, došlo ke změnám ve fosforylaci jak na katalytických (RalGAPa1 a RalGAPa2), tak regulačních (RalGAPb) podjednotkách. Zatímco v případě RalGAPa1 a RalGAPb byly změny pozorovány pouze u buněk po inhibici β -arrestinu2 a nebo následné stimulaci TRH, u RalGAPa2 měla na fosforylaci vliv stimulace TAL u kontrolních buněk.

Dalším proteinem s výraznými změnami ve fosforylaci je Ralbp1. V jeho případě lze změny na jednotlivých fosforylačních místech opět spojit do několika oblastí. V první oblasti byl detekován nárůst fosforylace na Ser29 a Ser30 po snížení hladin β -arrestinu2, následná stimulace TRH nebo TAL vedla k poklesu fosforylace na Ser30 a nárůstu na Ser34. U druhé oblasti opět vedl pokles v expresi β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci, a to na Ser48 a Ser62, na těchto fosforylačních místech vedla stimulace kontrolních buněk pomocí TAL k mírnému poklesu (2,6x) ve fosforylaci. U třetí oblasti, na Ser92, Ser93 a Ser99, byl pozorován nárůst ve fosforylaci u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 po stimulaci TRH i TAL.

Změny ve fosforylaci byly zaznamenány u dvou interakčních partnerů podjednotky μ 2 adaptorového komplexu AP2, u kináz Aak1 a Gak. V případě Aak1 vedla inhibice β -arrestinu2 ke zvýšení fosforylace (téměř 13x) na Thr608, stimulace TAL způsobila pokles ve fosforylaci na Thr622 (125,6x) a stimulace TRH ať už buněk kontrolních nebo buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 ke zvýšení ve fosforylaci na Ser626. Co se týče Gak, na Ser824 a Ser827 došlo k poklesu ve fosforylaci po inhibici β -arrestinu2, následná aplikace TRH k těmto buňkám pokles zvrátila. Všechny změny ve fosforylaci proteinů lokalizované do jejich funkčních domén nebo míst pro interakci s dalšími proteiny jsou shrnuté v tabulce 19.

Tab. 19: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|---|
| Ralgps2 | Ser329; Q0VGK1 | lokalizováno v sekvenci zodpovědné za vazbu Grb2 a regulaci Ralgps1 |
| Ralbp1 | Ser29, Ser30, Ser34, Ser48, Ser62, Ser92, Ser93, Ser99; Q5FVT1 | lokalizováno do N-terminální domény, místa pro vazbu mnoha proteinů |



Obr. 55: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Ral. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Ral GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Ral GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranatých závorkách) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Ricotta et al., 2002; Jullien-Flores et al., 2000; Fillatre et al., 2012; Personnic et al., 2014; Schoppe et al., 2021; Piccini et al. 2017; D'Aloia et al., 2018; Cuesta et al., 2021.

6.4.8 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze monomerních G proteinů z rodiny Ran

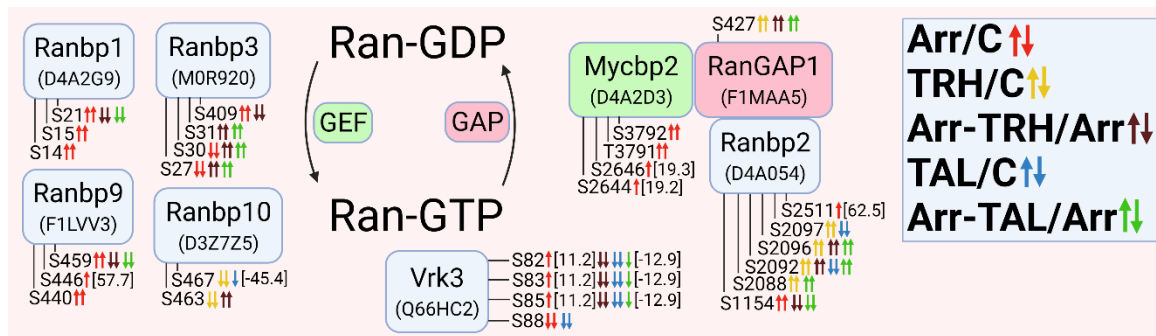
Další skupinou malých GTPáz jsou Ran GTPázy. I v rámci této rodiny bylo identifikováno několik proteinů, u kterých došlo vlivem β -arrestinu2 a nebo TRH a TAL ke změnám ve fosforylaci (obr. 56). Například v sekvenci GEF faktoru pro Ran protein, E3 ubiquitin ligáze Mycbp2, zapříčinilo snížení exprese β -arrestinu2 zvýšení fosforylace u čtyř aminokyselin, u Ser2644, Ser2646, Thr3791 a Ser3792. Spolu s RanGAP1 vzájemně regulují svou aktivitu. Ve struktuře RanGAP1 byly pozorovány změny ve fosforylaci na Ser427. Aktivace receptorů u kontrolních buněk pomocí TRH a pomocí TRH i TAL u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 způsobila zvýšení fosforylace u tohoto fosforylačního místa.

Ke změnám ve fosforylaci došlo také u Ran vazebných proteinů Ranbp1, Ranbp2, Ranbp3, Ranbp9 a Ranbp10. Nejvíce změn bylo pozorováno v sekvenci Ranbp2. Zvýšení fosforylace po stimulaci TRH bylo detekováno u kontrolních buněk na Ser2088, Ser2092, Ser2096 a Ser2097. Aplikace TAL měla naopak za následek pokles fosforylace na Ser2092 a Ser2097. Inhibice β -arrestinu2 způsobila zvýšení fosforylace na Ser1154 a Ser2511 (62,5x), následná stimulace TRH i TAL vedla k poklesu ve fosforylaci na Ser1154 a k nárůstu ve fosforylaci na Ser2092 a Ser2096 u Ranbp2. Z ostatních Ran vázajících proteinů byl pouze u Ranbp10 pozorován vliv stimulace TRH a TAL na fosforylaci u kontrolních buněk. U ostatních Ran vázajících proteinů, Ranbp1, Ranbp3 a Ranbp9, byly změny ve fosforylaci způsobené sníženou expresí β -arrestinu2 zvráceny následnou stimulací TRH nebo TAL.

Dalším interakčním partnerem Ran GTPáz je Vrk3 kináza. V její sekvenci vyvolala inhibice β -arrestinu2 mírný vzestup fluorescence na Ser82, Ser83 s Ser85 (všechny shodně 11,2x), zatímco stimulace TAL u kontrolních buněk a TRH i TAL u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 znamenala pokles ve fosforylaci těchto fosforylačních míst. Na Ser88 tohoto proteinu došlo k poklesu ve fosforylaci po stimulaci TAL a nebo po inhibici β -arrestinu2. Změny ve fosforylaci proteinů souvisejících s jejich enzymatickou aktivitou nebo s interakcí s jinými proteiny znázorňuje tabulka 20.

Tab. 20: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|----------------|---|--|
| RanGAP1 | Ser427; F1MAA5 | lokalizace do komplexu jaderného póru |
| Ranbp2 | Ser2511, Ser2088, Ser2092, Ser2096, Ser2097; D4A054 | oblast mezi Ran-vazebnými doménami 2 a 3 |

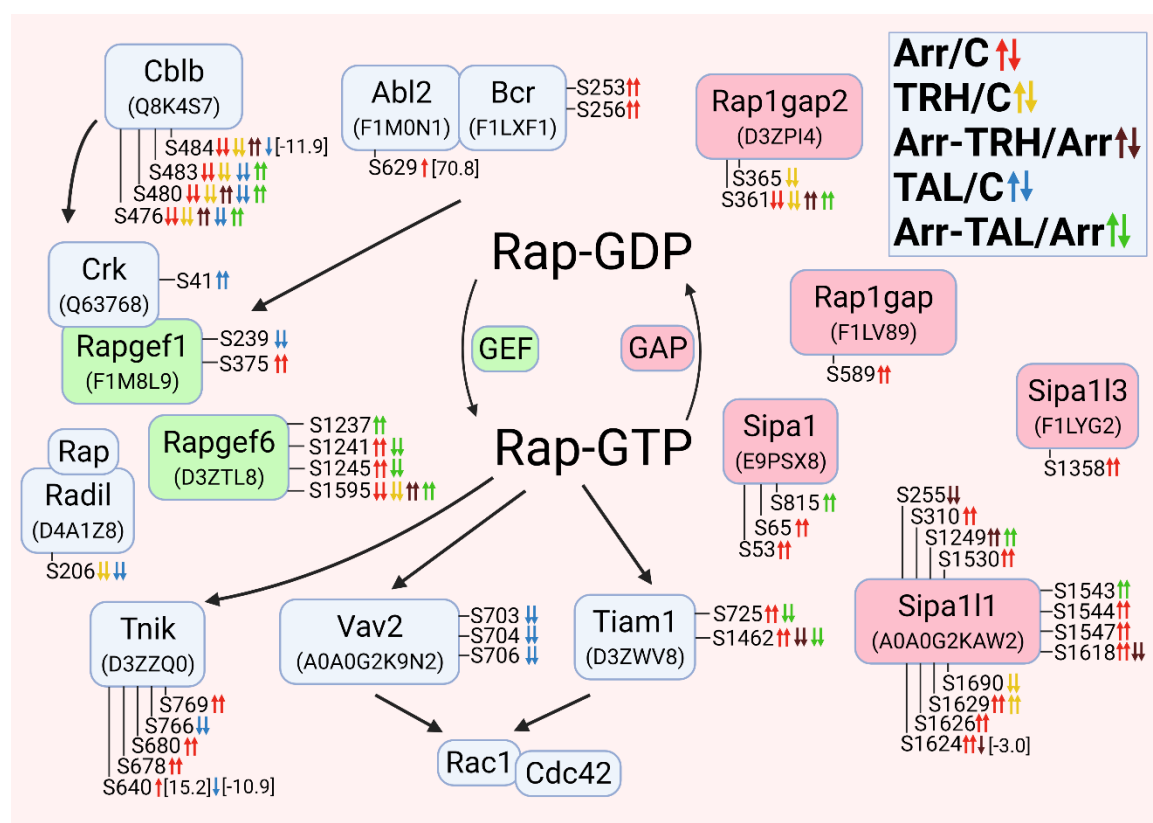


Obr. 56: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Ran. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Ran GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GH1 buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Ran GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranatých závorkách) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Bischoff et al., 1994; He et al., 2021; Dorr et al., 2015; Sanz-Garcia et al., 2008.

6.4.9 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signální dráze monomerních G proteinů z rodiny Rap

Rap GTPázy sdílejí velkou podobnost ve struktuře s Ras GTPázami. Také v rámci signalizace této skupiny GTPáz došlo ke změnám ve fosforylaci některých jejich interakčních partnerů (obr. 57). Změny byly zaznamenány u dvou GEF faktorů Rap GTPáz, Rapgef1 a Rapgef6, a u pěti GAP proteinů. V sekvenci Rapgef1 způsobila stimulace TAL pokles ve fosforylaci na Ser239 a snížení exprese β -arrestinu2 nárůst na Ser375. K interakčním partnerům Rapgef1 patří adaptorový protein Crk, u kterého bylo pozorováno zvýšení ve fosforylaci na Ser41 po aplikaci TAL ke kontrolním buňkám. Interakci mezi Rapgef1 a Crk regulují E3 ubiquitin ligáza Cblb a komplex proteinů Abl2 a Bcr. U Cblb proteinu došlo k poklesu fosforylace po snížení exprese β -arrestinu2 a nebo stimulaci kontrolních buněk TRH a TAL na Ser476, Ser480, Ser483 a Ser484. Pokud byly buňky nejprve vystaveny snížení exprese β -arrestinu2 a následně stimulovány TRH nebo TAL, vyvolalo to nárůst ve fosforylaci u zmíněných fosforylačních míst. Fosforylace komplexu Abl2 a Bcr byla zvýšena u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. Na fosforylaci

Rapgef6 měla vliv zejména inhibice β -arrestinu2 a také následná stimulace těchto buněk pomocí TAL.



Obr. 57: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci monomerních G proteinů z rodiny Rap. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé efekторы Rap GTPáz, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Zelenými rámečky jsou vyznačeny GEF faktory a červenými rámečky GAP proteiny Rap GTPáz. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranatých závorkách) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Chen et al., 2018; Smolen et al., 2007; Sequera et al., 2018; Baker et al., 2016; Schultess et al., 2005; Radha et al., 2011; Park et al., 2005.

Snížení exprese β -arrestinu2 nebo stimulace kontrolních buněk TRH vedla k poklesu ve fosforylaci na Ser361 u proteinu Rap1gap2. Naproti tomu, pokud byly aplikovány ligandy

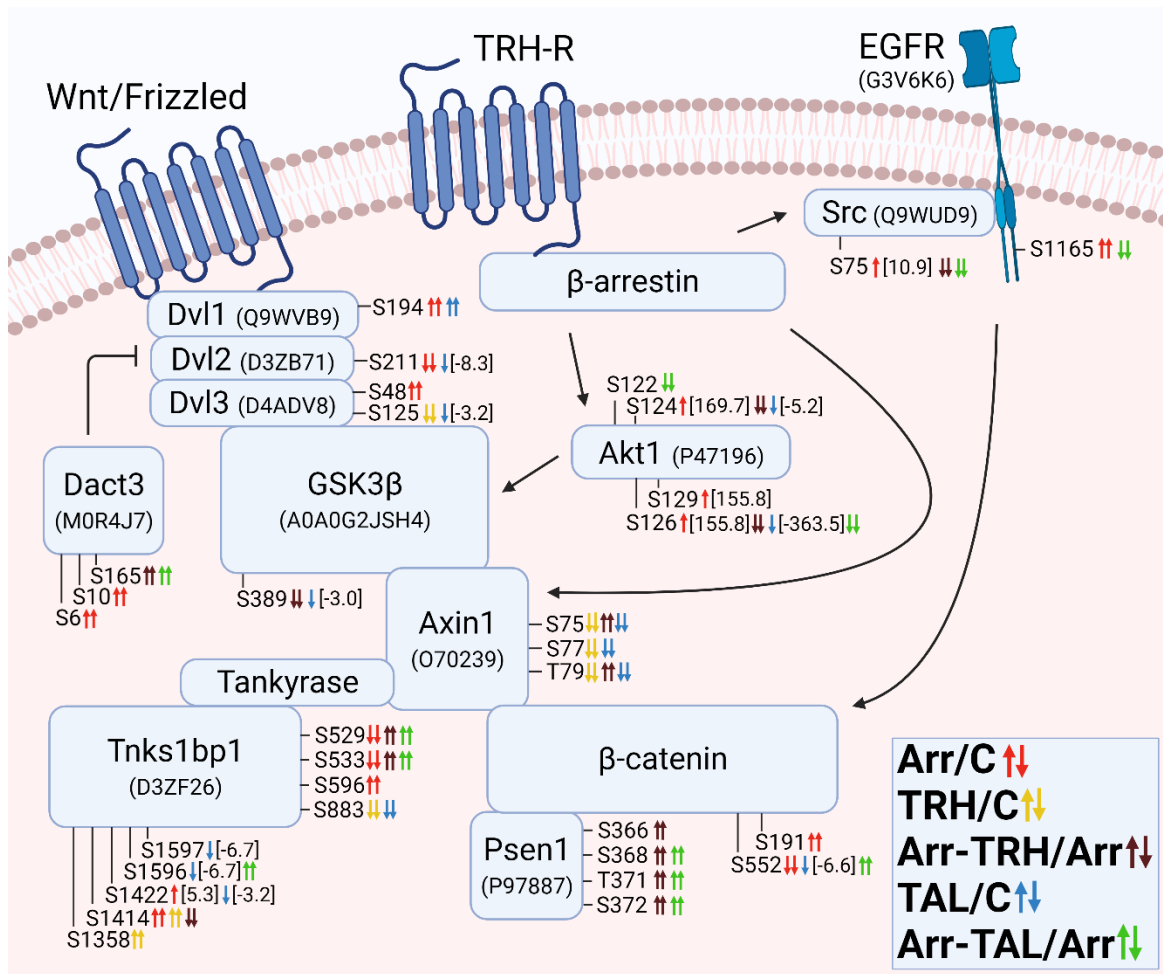
k buňkám se sníženou expresí β -arrestinu2, došlo k nárůstu fosforylace na Ser361. Na Ser365 vyvolala pokles ve fosforylaci pouze stimulace TRH. Fosforylace dalších dvou proteinů s GAP aktivitou vůči Rap, Rap1gap a Sip113, byla ovlivněna jen po inhibici exprese β -arrestinu2. U proteinů Sip1 a Sip111 byly významné změny ve fosforylaci pozorovány také zejména po snížení hladin β -arrestinu2 a nebo po následné stimulaci ligandy, pouze u zbytků Ser1629 a Ser1690 v sekvenci Sip111 byla fosforylace ovlivněna také aplikací TRH ke kontrolním buňkám.

Změny ve fosforylaci byly pozorovány také u několika efektorů Rap GTPáz. U kinázy Tnk1 vedl pokles v expresi β -arrestinu2 k nárůstu ve fosforylaci na Ser640, Ser678, Ser680 a Ser769. Aktivace TRH-R prostřednictvím TAL způsobila pokles ve fosforylaci na Ser640 a Ser766. Pokles ve fosforylaci na Ser206 v sekvenci Rap interakčního proteinu Rad1 vyvolala aplikace TRH nebo TAL ke kontrolním buňkám.

6.4.10 Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizační dráze β -kateninu

Z našich výsledků se ukázalo, že aktivace TRH-R může hrát roli i ve fosforylaci proteinů účastnících se signalizační dráhy β -kateninu (obr. 58). Od komplexu GPCR a β -arrestinu2 může docházet k regulaci β -kateninu buďto přes interakci s EGFR a Src, nebo interakci s axinem a GSK3 β . Fosforylace komplexu EGFR (Ser1165) a Src (Ser75) byla ovlivněna snížením exprese β -arrestinu2 a nebo následnou stimulací těchto buněk ligandy TRH nebo TAL. Naproti tomu, nejvíce změn ve fosforylaci komplexu axinu (Ser75, Ser77 a Thr79) a GSK3 β (Ser389) vyvolala stimulace kontrolních buněk prostřednictvím TRH nebo TAL, případně stimulace buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 pomocí TRH. Rozsáhlé změny ve fosforylaci byly pozorovány také u vazebného proteinu tankyrázy (Tnks1bp1), enzymu, který interaguje s axinem.

V rámci struktury β -kateninu došlo k nárůstu ve fosforylaci na Ser191 a k jejímu poklesu na Ser552 u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2. Na Ser552 navíc stimulace TAL způsobila mírný pokles ve fosforylaci u kontrolních buněk a naopak nárůst ve fosforylaci u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2. β -Katenin tvoří komplex s Psen1, u kterého vyvolala stimulace buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 pomocí TRH i TAL nárůst ve fosforylaci na Ser366, Ser368, Thr371 a Ser372. Wnt stimulovaná signální dráha je důležitá zejména pro svou významnou roli v embryonálním vývoji, proto je také velmi důkladně regulována. U proteinu Dact3, negativního regulátoru Wnt signální dráhy, vedl pokles v expresi β -arrestinu2 ke zvýšení fosforylace na Ser6 a Ser10. Fosforylace na Ser165 byla také zvýšena u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2, po následné stimulaci pomocí TRH a TAL. Změny lokalizované do funkčních oblastí nebo oblastí pro interakci s dalšími proteiny jsou shrnuty v tabulce 21.



Obr. 58: Změny ve fosforylaci proteinů zapojených v signalizaci β -kateninu. V bleděmodrých rámečcích jsou názvem genu a ID proteinu podle databáze UniProt vyznačené jednotlivé proteiny, u kterých byly zjištěny změny ve fosforylaci u kontrolních GHI buněk nebo u buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a/nebo po stimulaci TRH nebo TAL. Fosforylované aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými zkratkami (S, serin; T, threonin; Y, tyrozin) a pořadím v aminokyselinové sekvenci. Jedna nebo dvě malé barevné šipky vedle těchto fosforylačních míst značí kvantitativní (fold change uvedeno v hranatých závorkách) nebo kvalitativní změnu; směr šipky značí, zda došlo k nárůstu nebo poklesu ve fosforylaci. Arr/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2, červené šipky; TRH/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TRH (žluté šipky); TAL/C, porovnání změn v rámci kontrolních buněk a buněk po stimulaci TAL (modré šipky); Arr-TRH/Arr, porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TRH (hnědé šipky); Arr-TAL/Arr porovnání změn v rámci buněk po siRNA inhibici β -arrestinu2 a stimulaci TAL (zelené šipky). Stimulační nebo inhibiční účinek je vyjádřen šipkami mezi jednotlivými proteiny. Asociace a interakce mezi jednotlivými proteiny byly vyznačeny podle následujících prací: Kovacs et al., 2009; Rosano et al., 2009; Sastre-Perona et al., 2016; Mariotti et al., 2017; Lee et al., 2010; Jiang et al., 2008; Eisemann et al., 2016; Fang et al., 2007; Murayama et al., 1998.

Tab. 21: Změny ve fosforylaci proteinů detekované ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny

| Název proteinu | Fosforylované místo; identifikační číslo v databázi Uniprot pro organismus <i>Rattus norvegicus</i> | Lokalizace nebo funkce |
|------------------|--|--|
| Axin | Ser75, Ser77, Thr79; O70239 | interakce s tankyrázou |
| β -katenin | Ser191, Ser552; A0A0G2JT93 | stabilizace β -kateninu a modulace buněčných procesů |
| Psen-1 | Ser366, Ser368, Thr371, Ser372; P97887 | interakce Psen-1 s β -kateninem |

7. Diskuze

Cílem této disertační práce bylo rozšířit znalosti o zapojení jednotlivých signálních molekul v signalizaci řízené TRH-R. Nejprve jsme se zaměřili na vliv jednotlivých interakčních partnerů TRH-R na pohyblivost tohoto receptoru v plazmatické membráně. Poté jsme zkoumali vliv vybraných signálních molekul na funkční stav TRH-R, na jeho schopnost měnit po aktivaci intracelulární hladiny IP_3 a Ca^{2+} , nebo dokonce ovlivňovat koncentraci cAMP. Dále jsme se také zabývali studiem vlivu signalizace TRH-R na hladiny ROS a na energetický metabolismus buněk. A v neposlední řadě jsme zjišťovali úlohu β -arrestinu v signalizaci vedoucí od aktivovaného TRH-R k malým GTPázám a MAP kinázám.

V první části práce jsme se věnovali studiu vlivu jednotlivých interakčních partnerů TRH-R na jeho pohyblivost v plazmatické membráně. Za tímto účelem byla pomocí linie HEK293 buněk vytvořena buněčná linie TRY-1, stabilně exprimující TRH-R s navázaným žlutým fluorescenčním proteinem na intracelulárním C-konci. HEK293 je běžně používaná buněčná linie pro studium genové exprese, neboť je snadno kultivovatelná a transfekovatelná (Geisse a Fux, 2009; Lin *et al.*, 2014). Také námi použitý způsob transfekce je široce využívaný a vysoce účinný (Rahimi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2016). Připojení YFP na C-terminální konec GPCR bez vlivu na jeho funkci byl prokázán například pro receptor stimulující folikuly (Mazurkiewicz *et al.*, 2015). Stejným způsobem byl také v naší laboratoři vytvořen plně funkční μ -OR (Melkes *et al.*, 2016). TRY-1 linie byla vybrána na základě důkladné mikroskopické analýzy, kde byla sledována zejména exprese a lokalizace TRH-R-YFP v plazmatické membráně. Exprese TRH-R v buňkách TRY-1 byla v porovnání s jeho expresí v buněčné linii E2M11, kde je TRH-R také exprimován exogenně, nižší, a to jak na úrovni cDNA, tak na proteinové úrovni. V porovnání s GH1 linií, kde je TRH-R exprimován endogenně, byla naopak u TRY-1 buněčné linie detekována poněkud vyšší exprese TRH-R. Plná funkčnost receptoru v TRY-1 linii byla potvrzena jednak schopností TRH-R-YFP internalizovat a jednak měřením cytoplazmatické koncentrace Ca^{2+} po stimulaci receptoru ligandem.

Pomocí metody FRAP jsme studovali mobilitu TRH-R v plazmatické membráně TRY-1 buněk. Laterální mobilita umožňuje interakce mezi různými proteiny v membráně, čímž dochází k modulaci buněčné signalizace. Správná mobilita jednotlivých membránových komponent je tedy velmi důležitá a zásadní pro správnou funkci buněk a řádnou buněčnou signalizaci. Z literatury je známo, že laterální mobilita GPCRs může být ovlivněna různými způsoby. Například bylo prokázáno, že laterální mobilitu GPCRs mohou různě ovlivňovat různé ligandy (Melkes *et al.*, 2016). Také změny v lipidické části membrány (Brejchova *et al.*, 2015) nebo aktinový cytoskelet (Ganguly *et al.*, 2008) mohou vést ke změnám v pohyblivosti receptoru v membráně. Dynamiku receptoru v membráně může dále modulovat například dimerizace receptorů nebo jejich interakce s efektorovými molekulami (Carayon *et al.*, 2014). Dosud je známa pouze jedna práce zaměřující

se na zkoumání pohyblivosti TRH-R v membráně buněk (Brejchova *et al.*, 2015). Tato práce popisuje laterální difúzi TRH-R v souvislosti se změnou fluidity membrány (Brejchova *et al.*, 2015). Dosud však nebyla publikována žádná práce zabývající se vlivem jednotlivých signalizačních partnerů TRH-R na jeho mobilitu v plazmatické membráně. V naší studii jsme ukázali, že po stimulaci TRH-R pomocí TRH dochází k výraznému poklesu v laterální difúzi receptoru. Tento pokles byl plně zvrácen aplikací antagonisty TRH-R, midazolamu. Pokles v mobilitě receptoru v membráně po stimulaci ligandem byl již dříve pozorován také v případě jiných receptorů, například u receptoru pro estrogen (Stenoien *et al.*, 2001) nebo u glukokortikoidního receptoru (Schaaf a Cidlowski, 2003). V této práci také zjistili, že mobilita receptoru závisí pravděpodobně na afinitě každého ligandu, čím vyšší je jeho afinita, tím je více snížena pohyblivost receptoru (Schaaf a Cidlowski, 2003). Podle farmakologických stránek iuphar.org (International Union of basic and clinical PHARmacology) je hodnota pK_i , která vyjadřuje vazebnou afinitu, pro TRH rovna 7,4 a pK_i hodnota pro MDL 5,5. Naše pozorování, že MDL neměl na pohyblivost receptoru žádný vliv a TRH tuto schopnost u TRH-R výrazně snížil, je tedy v souladu s prací Schaafa a kol. Zjistili jsme také, že inhibice TRH-R pomocí antagonisty omezila pohyb frakce receptorů, které se účastní difúzní výměny v membráně. Samotný TRH neměl na velikost mobilní frakce žádný vliv, jeho současné podání spolu s MDL bylo schopno efekt MDL zablockovat. Experimentálně a pomocí počítačových simulací bylo zjištěno, že vazebná místa pro TRH a MDL se částečně překrývají (Lu *et al.*, 2004). Je tedy otázkou, zda by kompetice o vazebné místo mohla alespoň částečně vysvětlit námi získané výsledky.

V další části práce jsme se zabývali vlivem jednotlivých proteinů účastnících se TRH-R řízené $G_{q/11}$ signalizační dráhy na pohyblivost TRH-R v membráně. Za tímto účelem byla snížena exprese jednotlivých vybraných proteinů pomocí siRNA inhibice. Soustředili jsme se zejména na základní interakční partnery TRH-R, G proteiny, ale také na enzymy mající roli jak v signalizaci, tak v downregulaci TRH-R. Co se týče účinku různých signálních molekul na mobilitu GPCRů, v nedávno publikované práci například Markova a kol. prokázali vliv β -arrestinu1 a β -arrestinu2 na laterální mobilitu μ -OR (Markova *et al.*, 2021). Naopak je také známo, že mobilita GPCR může mít vliv na mobilitu jiných interakčních partnerů, zejména G proteinů (Lober *et al.*, 2006). Naším cílem bylo zjistit možný vliv jednotlivých vybraných proteinů na laterální mobilitu TRH-R v plazmatické membráně. Získané výsledky odhalily, že snížení exprese $G_{q/11}\alpha$, $G\beta_{1/2}$, β -Arr2 a $PLC\beta_1$ způsobilo významný pokles v hodnotě difúzního koeficientu. Ve většině případů navíc aplikace TRH vedla k dalšímu poklesu v laterální mobilitě TRH-R. Z těchto výsledků se dá usuzovat, že vazba ligandu je mnohem silnějším regulačním faktorem pro laterální difúzi TRH-R v membráně než pokles v expresi některých jeho signálních partnerů.

Dalším zajímavým účinkem potlačení exprese $G_{q/11}\alpha$, $G\beta_{1/2}$, β -Arr1 a $G_i\alpha-1$ bylo snížení mobilní frakce TRH-R. Pokles v hodnotě mobilní frakce znamená, že část molekul TRH-R byla nějakým způsobem znehybněna, například vazbou s dalšími membránovými proteiny nebo

cytoskeletárním aparátem. Nejzajímavějším zjištěním této studie bylo, že po stimulaci TRH došlo k nejmarkantnějšímu poklesu v mobilní frakci právě v případě, kdy byla snížena exprese $G_{i\alpha-1}$ podjednotky. Dalo by se tedy spekulovat, že právě tato podjednotka G proteinů je, mimo klasické $G_{q/11\alpha}$, nějakým způsobem zapojena v signalizaci TRH-R. V této studii jsme použili TRH o koncentraci 10 μM . Jedná se o celkem vysokou koncentraci, nicméně byla použita i v předchozích experimentech v naší laboratoři (Drastichova *et al.*, 2012b), ale byla použita i jinými autory (Jantas *et al.*, 2009; Jaworska-Feil *et al.*, 2010; Brejchova *et al.*, 2015). Je možné, že poměrně vysoká koncentrace ligandu by mohla zapříčinit poněkud neočekávané výsledky. Toto vysvětlení je ale jen spekulativní a vyžaduje si další zkoumání.

Tato disertační práce se ve své druhé části zabývala vlivem jednotlivých vybraných signálních partnerů TRH-R na jeho funkční stav, především na jeho schopnost uvolňovat po aktivaci ligandem Ca^{2+} z intracelulárních zásobáren do cytozolu nebo modulovat intracelulární koncentraci dalších druhých poslů. K monitorování hladin volného cytoplazmatického Ca^{2+} jsme využili barvení pomocí fluorescenční sondy Fura-2AM, které bylo použito v souvislosti se zjišťováním účinku TRH na intracelulární koncentraci Ca^{2+} také například u bovinních buněk sekretujících prolaktin (Akerman *et al.*, 1991). Už dříve bylo zjištěno, že nejen koncentrace ligandu, ale také množství receptorů a G proteinů výrazně ovlivňuje desenzitizaci TRH-R (Ostasov *et al.*, 2008; Novotny *et al.*, 1999). Nás zajímalo, zda i hladiny dalších interakčních partnerů TRH-R mohou mít na proces desenzitizace vliv. Při použití TRY-1 buněčné linie jsme získali řadu kontroverzních výsledků. Stimulací buněk ligandem TRH po dobu 10 sekund došlo při umlčení exprese $G_{11\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$, $G\beta_1$, $G\beta_{1/2}$, $\beta\text{-Arr}1$ a $\text{PLC}\beta_1$ k nárůstu v intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů. Naopak pokles v koncentraci Ca^{2+} byl detekován po inhibici $G\beta_2$, $\beta\text{-Arr}2$ nebo $G_s\alpha$. Po třicetisekundové stimulaci buněk prostřednictvím TRH byl pozorován pokles ve výlevu Ca^{2+} iontů do cytozolu po snížení hladin $G_q\alpha$, $\beta\text{-Arr}2$ nebo $G_s\alpha$. Nárůst v koncentraci Ca^{2+} iontů naopak způsobila inhibice $\beta\text{-Arr}1/2$ a $\text{PLC}\beta_1$. Také v případě pozorování desenzitizace receptoru po aplikaci druhé dávky TRH docházelo k poněkud překvapivým výsledkům. Některé námi detekované změny v koncentraci volného Ca^{2+} v cytozolu a rozdíly v desenzitizaci TRH-R po inhibici vybraných proteinů se těžko vysvětlují, můžeme však usuzovat, že umělé zvýšení exprese TRH-R v HEK293 buňkách pravděpodobně ovlivňuje zapojení dalších interakčních partnerů v signalizaci řízené tímto receptorem. Z literatury je také zřejmé, že připojení velkého fluorescenčního proteinu k molekule receptoru může mít vliv na jeho funkčnost (Meyer a Fromherz, 1999; Lalonde *et al.*, 2003). V našem případě byl YFP připojen právě na intracelulární C-konec, který je důležitý pro interakci receptoru s dalšími signalizačními komponentami. Námi vytvořený receptor byl sice schopný výlevu Ca^{2+} po stimulaci TRH, připojení YFP by mohlo ale vést k zapojení jiných signalizačních mechanismů vedoucích od aktivovaného TRH-R. Toto vysvětlení navíc podporují poněkud odlišné výsledky získané z měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} u E2 buněčné linie, která je, stejně jako TRY-1 linie, odvozená od HEK293 buněk. Metoda

siRNA inhibice spojená s vizualizací Ca^{2+} byla dříve použita například u HeLa buněk (Lang *et al.*, 2011). Snížení genové exprese pomocí siRNA inhibice může mít ale jisté limitace. Jak je zřejmé z imunoblotů, míra exprese jednotlivých proteinů po inhibici námi použitých siRNA byla výrazně snížena, ale každá buňka mohla být transfekována různě silně. Z toho důvodu mohla být odpověď každé buňky zkreslena právě tím, do jaké míry daná buňka ten určitý gen exprimovala.

Protože metoda měření vápníkových odpovědí po aplikaci ligandu nepřinesla příliš uspokojivé výsledky, zaměřili jsme se na procesy nacházející se v signalizaci TRH-R o krok dříve, tedy na hladiny volného IP_3 . Měření jsme provedli na buněčné linii E2, u které výlev vápníku z intracelulárních zásobáren po siRNA inhibici vybraných proteinů více odpovídal předpokládaným změnám. Námi použitá metoda (IP-One-Gq kit a HTRF stanovující množství IP_1) je už dlouho považována za vhodnou pro stanovení aktivity $\text{PLC}\beta$, a tedy produkce IP_3 (Trinquet *et al.*, 2006). Podle předpokladu, stimulace buněk pomocí TRH výrazně zvýšila produkci IP_3 a efekt hormonu byl zablokován působením MDL, což je plně v souladu s tím, že MDL funguje jako kompetitivní antagonist na TRH-R (Lu *et al.*, 2004). Protože nás zajímalo, které proteiny mají na hladiny IP_3 v buňkách největší vliv, opět jsme využili techniku siRNA inhibice. Tato metoda byla už dříve použita ke studiu vlivu různých typů GRK (Jones *et al.*, 2007) a fosfatáz (Gehret a Hinkle, 2013) na procesy fosforylace a defosforylace TRH-R. V našem případě vedla inhibice GRK2, která je pravděpodobně hlavní kinázou fosforylující TRH-R (Jones *et al.*, 2007), k nárůstu v produkci IP_3 , což je v souladu s předchozími studiemi a s tím, že TRH-R byl za těchto podmínek daleko pomaleji desenzitizován. Stejně tak i inhibice β -arrestinu2 vedla k nárůstu v intracelulární koncentraci IP_3 . Naproti tomu, pokud byla snížena exprese β -arrestinu1 nebo obou typů β -arrestinů najednou, došlo k významnému poklesu v produkci IP_3 . Dalo by se z toho tedy spekulovat, že TRH-R využívá k desenzitizaci zejména β -arrestin2, nicméně také β -arrestin1 se zdá být zapojen v signalizačních procesech vedoucích od TRH-R. Odlišná úloha β -arrestinů v GPCR řízené signalizaci byla potvrzena například pro μ -OR (Markova *et al.*, 2021). Je tedy možné, že také TRH-R využívá oba arrestiny rozdílně. Zajímavým výsledkem dále bylo, že pokud jsme použili siRNA proti $G_{q\alpha}$, produkce IP_3 byla po stimulaci TRH mírně snížena, pokud ale byla snížena exprese $G_{11\alpha}$, nedošlo k žádné změně v produkci IP_3 po aplikaci TRH. Rozdělením buněčných homogenátů pomocí ureové elektroforézy bylo zjištěno, že E2 buňky obsahují relativně vysokou hladinu $G_{q\alpha}$ oproti $G_{11\alpha}$, čímž by se daly vysvětlit námi získané výsledky, neboť pokud jsme cíleně snížili expresi proteinu, který je v buňkách zastoupen v nízkých hladinách, nezpůsobí to takové změny jako když je snížena exprese vysoce zastoupeného proteinu.

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda aktivace TRH-R může spouštět signalizaci přes $G_{s\alpha}$ protein a které další proteiny by se potenciálně mohly účastnit regulace této dráhy. Prokázali jsme, že stimulace dvou typů buněk (E2 a GH1 linie) pomocí TRH nebo TAL vedla k nárůstu v intracelulární koncentraci cAMP způsobem závislým na koncentraci ligandu. Cílený pokles $G_{s\alpha}$ podjednotky pomocí siRNA inhibice v těchto buňkách způsobil pokles v množství cAMP až

na úroveň kontrolních buněk. Je tedy zřejmé, že tato podjednotka G proteinů má svou roli v TRH-R řízené signalizaci, jak už bylo předesláno dříve (Gautvik et al., 1977; Paulssen et al., 1992a; Kineman et al., 1996; Johansen et al., 2001). Abychom zjistili, které proteiny by se mohly účastnit regulace AC po aktivaci TRH-R, použili jsme opět metodu siRNA inhibice. Nejvýraznější rozdíl v účincích TRH a TAL mezi oběma liniemi byl detekován při potlačení exprese β -arrestinu1 a β -arrestinu2. Zatímco u E2 linie došlo k významnému poklesu v produkci cAMP po stimulaci TRH nebo TAL pokud byla snížena exprese β -arrestinu1 nebo obou typů β -arrestinu zároveň, u GH1 linie byl zjištěn pokles v produkci cAMP, pokud byla cíleně potlačena exprese β -arrestinu2. Marková a kol. zjistili, že β -arrestin1 a β -arrestin2 odlišně regulují aktivitu AC (Marková et al., 2021). Dalo by se tedy v souladu s tím usuzovat, že zřejmě každá buněčná linie používá jiné signalizační dráhy k regulaci funkce AC, v širším smyslu k modulaci stejných buněčných procesů a že zejména β -arrestiny mají v této regulaci významný vliv. V případě E2 buněk jsme navíc našli další proteiny s potenciálním významem pro regulaci AC aktivity, neboť, na rozdíl od GH1 linie, vedla stimulace TRH-R u E2 buněk se sníženými hladinami $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ k poklesu v intracelulární koncentraci cAMP a inhibice $PLC\beta_1$ naopak k nárůstu v množství cAMP v těchto buňkách, s výraznějším efektem TRH než TAL. Silnější účinek TRH oproti TAL je možné vysvětlit jeho vyšší afinitou k TRH-R (Thirunarayanan et al., 2012). Fakt, že jsme pozorovali více změn u E2 linie může souviset s tím, že v případě těchto buněk je uměle zvýšena exprese TRH-R1 (Kim et al., 1994) a tudíž množství aktivovaných receptorů nemusí odpovídat přirozeným podmínkám, zatímco u GH1 linie je receptor exprimován přirozeně. Rozdíl ve schopnosti TRH-R interagovat s $G_s\alpha$ a tedy stimulovat AC byl od 90. let minulého století spojován s diverzitou TRH-R. Bylo prokázáno, že E2 buňky, které exprimují výlučně dlouhou izoformu TRH-R, jsou po stimulaci schopny aktivovat $G_{q/11}\alpha$, ale nikoliv $G_s\alpha$ protein (Kim et al., 1994), což je poněkud v rozporu s našimi výsledky. Naproti tomu GH3 buňky zřejmě exprimují dvě odlišné varianty TRH-R, dlouhou a krátkou izoformu, které vznikají alternativním sestřihem, a právě z toho důvodu jim byla připisována schopnost aktivovat kromě signalizace spážené s $G_{q/11}\alpha$ také signalizaci přes $G_s\alpha$ (Kim et al., 1994).

Dále jsme se zaměřili na zkoumání vlivu TRH a TAL na expresi dvou kináz, konkrétně ERK1/2 a Akt, a také jejich fosforylovaných forem. Fosforylace obou kináz byla po stimulaci TRH i TAL zvýšena. Aktivace kinázy ERK1/2 prostřednictvím TRH nebo TAL byla pozorována už dříve (Ohmichi et al., 1994a, b; Smith et al., 2001; Oride et al., 2008; Zheng et al., 2018a, b). S aktivací signální dráhy zahrnující PI3K/Akt jsou spojovány antiapoptotické účinky TRH a jeho analogů (Jaworska-Feil et al., 2010).

V další části práce jsme sledovali vliv TRH a TAL na redoxní rovnováhu, energetický metabolismus a cytoprotekci u GH1 buněčné linie. Protektivní účinky obou ligandů i dalších analogů TRH jsou známy. Například TRH a jeho analogy montirelin, RGH-2202 a Z-TRH v koncentracích 0,1-50 μ M snížily poškození SH-SY5Y buněk způsobené 5 různými neurotoxiny

používanými pro studium neurodegenerativních poruch jako je Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba (Jaworska-Feil *et al.*, 2010). Mezi faktory, které přispívají k progresi zmíněných chorob, se řadí právě mitochondriální dysfunkce, oxidační stres a řada dalších proapoptotických faktorů (Mattson, 2006; Swerdlow, 2007; Danielson a Andersen, 2008; Gil a Rego, 2008). Naše výsledky na GH1 buňkách ukázaly nárůst celkové antioxidační kapacity po stimulaci TRH i TAL a také v hladinách většiny antioxidačních enzymů. Nárůst v transkripci katalázy a SOD2 byl detekován po stimulaci hormonu HPT osy také u keratinocytů lidské kůže (Vidali *et al.*, 2014). TRH a TAL v naší studii dále prokázaly svůj účinek proti oxidačnímu stresu vyvolanému *t*-BHP, když oba v koncentraci 1 μM zvýšily životnost buněk, snížily množství uvolňovaného enzymu LDH a hladiny ROS indukované *t*-BHP. Na buněčném modelu Parkinsonovy choroby, SH-SY5Y buňkách, TAL v koncentraci 5 μM snížil produkci ROS indukovanou 1-methyl-4-phenylpyridiniem (MPP+) nebo rotenonem (Zheng *et al.*, 2018b). *t*-BHP patří mezi široce používané látky vyvolávající oxidativní stres a apoptózu, a tudíž dobře slouží ke studiu protektivních účinků různých substancí (např. Skrabalova *et al.*, 2018; Jung *et al.*, 2019). V naší studii jsme zjišťovali ochrannou roli TRH a TAL proti oxidativnímu stresu způsobenému nízkými koncentracemi *t*-BHP. Zajímavé bylo, že v případě GH1 buněčné linie jsme při aplikaci zvyšujících se dávek *t*-BHP nepozorovali žádné na dávce závislé změny v buněčné viabilitě, jako byly dříve pozorovány například u H9c2 buněk (Skrabalova *et al.*, 2018). Jakákoliv dávka *t*-BHP v rozmezí 5-320 μM způsobila přibližně 40% pokles v buněčné viabilitě. Nami použité koncentrace jsou spíše nízké, GH1 buňkám pravděpodobně stačí k aktivaci apoptotických drah pouhá přítomnost malého množství škodlivé látky bez rozdílu v její koncentraci. Je tedy možné, že GH1 buňky si vyvinuly určitý adaptační mechanismus, který jim slouží k ochraně ostatních sesterských buněk před oxidativním stresem a aktivací apoptotických procesů.

TRH je klíčovým hypotalamickým regulátorem energetického metabolismu především díky svému vlivu na sekreci hormonů štítné žlázy. Bylo zjištěno, že intratekálně aplikovaný TRH a jeho metabolit, histidyl-proline diketopiperazine, potlačují aktivitu mitochondriálního komplexu III, cytochrom c reduktázy, u novorozených potkanů (Miyamori *et al.*, 1988). U orgánových kultur lidské kůže TRH stimuloval transkripci několika klíčových mitochondriálních genů, zvýšil aktivitu mitochondriálních komplexů I a IV a spotřebu kyslíku (Knuever *et al.*, 2012). Mimo jiné se hormony HPT osy účastní regulace energetického metabolismu a redoxního stavu v keratinocytech vlasových folikulů (Vidali *et al.*, 2014). I přesto, že vliv TRH a ostatních hormonů HPT osy na funkci mitochondrií je evidentní, naše výsledky tuto skutečnost nepotvrdily. Ani jeden z ligandů neprokázal v našich experimentech na GH1 buněčné linii vliv na spotřebu kyslíku, ani na žádný z parametrů mitochondriální respirace, ani na expresi mitochondriálních enzymů. Nekompatibilita našich výsledků s výše zmíněnými studiemi je pravděpodobně způsobena odlišností v experimentálních podmínkách a buněčných typech.

β -Arrestiny ovlivňují řadu intracelulárních signalizačních drah, které se podílejí právě například na regulaci funkce mitochondrií. Jsou i určité zmínky o regulaci oxidačního stresu pomocí β -arrestinů (Philip *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2021). Nás zajímalo, zda by inhibice β -arrestinu2 mohla ovlivnit funkci mitochondrií po stimulaci TRH-R. Naše výsledky z experimentů na GH1 linii ukázaly, že inhibice β -arrestinu2 nemá žádný vliv ani na spotřebu kyslíku, ani na jednotlivé komplexy oxidativní fosforylace. Ve shrnutí se dá říci, že akutní aplikace TRH i TAL vykazují jisté antioxidační vlastnosti a také protektivní roli vůči *t*-BHP-indukovanému oxidačnímu stresu, nemá však žádný vliv na komplexy oxidativní fosforylace u GH1 buněk.

V poslední části práce jsme se věnovali studiu vlivu β -arrestinu2 na fosfoproteom u GH1 buněk po stimulaci TRH-R. U E2M11 buněčné linie bylo prokázáno, že dlouhodobé působení TRH má relativně velký vliv na buněčný proteom (Drastichova *et al.*, 2010). Vliv TRH nebo jeho analogů na expresi proteinů, se zřetelem na fosforylované proteiny, u jiných buněčných linií nebyl dosud studován, a to přesto, že by změny v expresním profilu mohly pomoci lépe porozumět mechanismům, které se za aktivaci GPCRs skrývají. V naší studii jsme v každé experimentální skupině zjistili stovky změn ve fosforylaci proteinů, z nichž byla jen některá fosforylační místa lokalizována ve funkčních doménách s enzymatickou aktivitou nebo interakčních místech s jinými proteiny. Jinak se podle databáze Uniprot většina změněných fosforylačních míst nacházela v neuspořádaných oblastech proteinů. Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou stanovenou na základě predikce fosforylačních míst proteinů pomocí webového nástroje DISPHOS, že k fosforylaci proteinů dochází převážně v jejich vnitřně neuspořádaných oblastech (Iakoucheva *et al.*, 2004). Souvisí to pravděpodobně s regulační schopností posttranslačních modifikací, jako je fosforylace, pro řádné sbalení proteinu a tedy jeho správnou funkci (Bah *et al.*, 2015).

Aktivace TRH-R prostřednictvím TRH nebo jeho analogu TAL měla za následek rozdílné změny ve fosforylaci proteinů souvisejících se signalizačními dráhami malých GTPáz a MAPK kaskádami jak u kontrolních GH1 buněk, tak u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2, z čehož by se dalo usuzovat, že TRH a TAL mohou alespoň částečně působit jako tzv. usměrňovací agonisté na TRH-R a tedy zprostředkovávat různé buněčné procesy vedoucí k různým fyziologickým důsledkům. Námí získané rozdílné účinky TRH a TAL by se daly částečně vysvětlit odlišnou afinitou TAL k TRH-R ve srovnání s TRH (Thirunarayanan *et al.*, 2012). Jelikož GH1 buněčná linie je klonální kmen nádorových buněk hypofýzy potkana, které pravděpodobně exprimují výhradně TRH-R1 (Sun *et al.*, 2009), a také bylo prokázáno, že účinky TAL v CNS myši jsou zprostředkovány především TRH-R1 (Thirunarayanan *et al.*, 2013), rozdíly v účincích TRH a TAL na fosforylaci proteinů by se daly vysvětlit tak, že přinejmenším účinky TAL by mohly být umožněny právě aktivací TRH-R1 a účinky TRH primárně aktivací TRH-R1, ale okrajově také TRH-R2.

Ačkoliv bylo prokázáno, že TRH i TAL mohou aktivovat MAPK kaskády (Ohmichi *et al.*, 1994a, b; Smith *et al.*, 2001; Oride *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2018a, b), zřejmě k tomu není potřeba

interakce TRH-R s β -arrestinem (Smith *et al.*, 2001). V naší fosfoproteomické studii nebyla fosforylace ERK1/2 po stimulaci TRH ani TAL detekována, přestože zvýšení ve fosforylaci tohoto enzymu jsme potvrdili pomocí imunoblotu a bylo prokázáno už dříve u GH3 linie po stimulaci 100 nM TRH (Oride *et al.*, 2008) nebo v případě TAL v určitých částech mozku u myšičího modelu Parkinsonovy choroby (Zheng *et al.*, 2018b). Naše výsledky ale odhalily změny ve fosforylaci B-Raf proteinu po stimulaci TRH i TAL, který zprostředkovává přenos signálu z Ras na MEK kinázu a tedy v konečném důsledku řídí také funkci ERK1/2. Změny ve fosforylacích byly detekovány také u dalších přímých interakčních partnerů této kinázové kaskády, například u KSR2 a Cnksr1, a to zejména po snížení exprese β -arrestinu2. Stejně jako v případě ERK1/2 nebo MEK, žádné změny ve fosforylaci po stimulaci buněk TRH a TAL nebyly detekované ani u dalších MAPK, jmenovitě Map3k1, Map3k2, Map3k5, Map3k9 nebo Map4k4, zatímco stimulace TAL naopak ovlivnila fosforylaci u Map3k7 a oba ligandy vyvolaly změny ve fosforylaci u Map3k4 a Map4k1. Fosforylace všech uvedených MAPK ale byla ovlivněna u buněk po inhibici β -arrestinu2 nebo případně po následné stimulaci ligandy. Lze tedy říci, že změny v expresi β -arrestinu mohou ovlivnit fosforylaci a tedy i signalizaci různých MAPK tím, že dojde k narušení interakcí mezi klíčovými molekulami. Tyto výsledky jsou v souladu s tvrzením, že β -arrestin funguje v signalizačních drahách GPCRs jako scaffold a umožňuje tak jednotlivým signalizačním molekulám zůstat v těsném kontaktu a tím modifikovat dynamiku jednotlivých kaskád (Bourquard *et al.*, 2015).

Existují studie, které potvrzují, že nejen signální transdukce TRH-R (Romano *et al.*, 2003), ale také β -arrestin (Peterson a Luttrell, 2017) mohou být zapojeny do signalizačních drah zahrnujících malé GTPázy. Naše výsledky potvrzují toto zjištění, neboť na GH1 linii jsme ukázali, že jak aktivace TRH-R, tak nepřítomnost β -arrestinu2 měly vliv na fosforylaci různých proteinů interagujících s malými GTPázami a také jejich GAP a GEF. Velmi zajímavé v tomto případě bylo, že změny ve fosforylaci některých proteinů byly po aktivaci TRH-R protichůdné účinku snížené exprese β -arrestinu2 na tuto fosforylaci, jak je vidět například u některých proteinů zapojených v signalizaci RabGTPáz (například Rabep1, Rabep2, Dennd1a a další). Tato data naznačují roli β -arrestinu2 v endocytárních, lyzozomálních a sekrečních drahách aktivovaných TRH-R. Detekovali jsme také několik proteinů, u kterých došlo po stimulaci ligandy k fosforylaci v opačném směru u buněk bez snížené exprese β -arrestinu2 oproti buňkám se sníženou expresí tohoto proteinu (například Rock2, Lats1 a další). Stejně tak jsme evidovali několik proteinů, jejichž fosforylační místa nebyla po stimulaci TRH-R ovlivněna sníženou expresí β -arrestinu2 (například Ptk2b, Wnk2 a další). Z výše uvedených informací lze vyvozovat, že β -arrestin2 je klíčovou molekulou pro vazbu mnoha proteinů a jeho nedostatek má veliký význam pro signalizační procesy zprostředkované malými GTPázami iniciované aktivací TRH-R. V rámci signalizačních drah malých GTPáz jsme dále objevili několik proteinů, které fungují jako signalizační uzly a jednotlivé transdukce mezi sebou propojují. Tak například protein Lats1 spojuje signalizace GTPáz z rodin

Ras a Rac přes komplex Arhgef7, G12 a G13 se signalizací Arf a Cdc42. Kináza Akt spojuje procesy řízené GTPázami Ras a Arf, protein Ulk1 zase spřahuje signalizaci Ras s Rab, Src propojuje Ras s Rho a CK2 β překrývá signalizace Ras a Rac. Je tedy patrné, že signalizační mechanismy vedoucí od aktivovaného receptoru k následným efektorům mohou být velice komplexní a že aktivace jediného receptoru má vliv hned na několik kaskád zároveň.

V této studii jsme dále podhalili vliv TRH, TAL a snížené exprese β -arrestinu2 na procesy tvorby váčků, jejich transport a endocytózu, neboť jsme v souvislosti s několika drahami malých GTPáz zaznamenali změny ve fosforylaci podjednotek AP komplexu a jejich interakčních partnerů. Zatímco adaptorový protein AP-2 interaguje s klatrinem a je zodpovědný za rozpoznání nákladu a endocytární procesy od plazmatické membrány (Traub, 2009), AP-3 se účastní transportu proteinů do různých buněčných organel (Robinson a Bonifacino, 2001). V rámci AP-2 komplexu jsme pozorovali změny ve fosforylaci α 1-podjednotky po snížení exprese β -arrestinu2 nebo po následné stimulaci buněk se sníženými hladinami tohoto proteinu pomocí TAL. Co se týče AP-3 komplexu, aktivace TRH-R pomocí TRH a TAL vyvolala změny ve fosforylaci u jeho β -podjednotky. Stejně změny byly pozorovány také u interakčního proteinu adaptorových proteinů, Btd8. Efekt těchto dvou ligandů byl v případě obou proteinů zrušen, pokud byla snížena exprese β -arrestinu2. Lze tedy usuzovat, že aktivace TRH-R hraje určitou roli ve váčkovém transportu jak na plazmatické membráně, tak v dalších buněčných kompartmentech a β -arrestin2 je zásadní molekulou, která tento transport zprostředkovává.

Bylo zjištěno, že TRH ovlivňuje fosforylaci tyrozinů v molekule EGFR a tento jeho efekt může být zprostředkován různými signálními drahami (Wang *et al.*, 2000b; Luo *et al.*, 2006). Jeden ze způsobů zahrnuje aktivaci Src prostřednictvím G $\beta\gamma$ komplexu (Luo *et al.*, 2006). V našich experimentálních podmínkách jsme nezjistili změny ve fosforylaci EGFR po stimulaci ligandy, ale zvýšená fosforylace byla detekována u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2, nikoliv však na tyrozinových zbytcích, ale na Ser1165. Tato fosforylace byla zvrácena stimulací buněk s nízkými hladinami β -arrestinu2 ligandem TAL. Stejný trend jsme pozorovali i u proteinu Src, kde jsme u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 detekovali také zvýšenou fosforylaci, a to na Ser75, která byla po stimulaci těchto buněk ligandy opět zvrácena. Žádný z ligandů ale neměl na fosforylaci Src vliv v případě stimulace kontrolních buněk. Fosforylace tohoto místa je spojena se zvýšenou ubiquitylací a směřováním Src k proteazomální degradaci, naopak snížená fosforylace Src je spojována s jeho aktivací (Pan *et al.*, 2011). Bylo popsáno, že β -arrestin působí jako adaptorový protein, který je potřeba pro vytvoření komplexu aktivovaného GPCRs se Src proteinem (Luttrell *et al.*, 1999). Z našich dat by se tedy dalo usuzovat, že Src je aktivní ve spojení do komplexu s aktivovaným TRH-R a β -arrestinem2 a jeho aktivita úzce souvisí s množstvím přítomného β -arrestinu2. Prostřednictvím komplexu s GPCR, EGFR a Src β -arrestin zřejmě reguluje také fosforylaci β -kateninu na tyrozinu a v komplexu s axinem a GSK3 β β -katenin stabilizuje (Rosano *et al.*, 2009). β -Arrestin tedy představuje nezbytnou složku signalizace

Wnt/ β -kateninu. V naší studii jsme zaznamenali mnoho proteinů souvisejících s Wnt/ β -kateninovou signalizací, jejichž fosforylace byla změněna u buněk se sníženou expresí β -arrestinu2, ať už stimulovaných ligandy nebo nestimulovaných. Například právě zmíněné EGFR a Src. Dále jsme pozorovali rozdílné změny ve fosforylacích také u proteinu axin po stimulaci kontrolních buněk a buněk se sníženým množstvím β -arrestinu2. Dalo by se tedy shrnout, že po aktivaci TRH-R dochází k regulaci komplexů sestávajících z β -arrestinu2, EGFR a Src anebo β -arrestinu2, axinu a GSK3 β a že každý z ligandů může na tyto komplexy působit odlišně v závislosti na konformaci indukované vazbou na TRH-R. Další z možností, jak by mohla aktivace TRH-R ovlivňovat signalizaci související s β -kateninem je přes Psen-1, neboť u tohoto proteinu jsme zaznamenali změny ve fosforylačních místech přítomných v oblasti přímo zodpovědné za interakci s β -kateninem (Murayama *et al.*, 1998). Signalizace β -kateninu může být ovlivněna dráhou zahrnující PI3K/Akt (Fang *et al.*, 2007; Sastre-Perona *et al.*, 2016). V naší studii jsme pozorovali, že po snížení exprese β -arrestinu2 a/nebo aktivaci TRH-R došlo k rozsáhlým změnám ve fosforylaci Akt. Bylo prokázáno, že fosforylace β -kateninu na Ser552 je řízena proteinkinázou Akt buďto přes signalizaci vedoucí od EGFR nebo přes Ras a PI3K (Fang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Sastre-Perona *et al.*, 2016). V naší studii došlo ke změnám ve fosforylaci β -kateninu na Ser552 po snížení exprese β -arrestinu2 a/nebo stimulaci TAL. Signalizace zahrnující EGFR/Ras/PI3K/Akt byla tedy ovlivněna zejména u buněk se sníženými hladinami β -arrestinu2 a stimulací těchto buněk TAL. Naproti tomu, změny ve fosforylaci u Dvl proteinů, GSK3 β a axinu, které regulují funkci β -kateninu přes aktivovaný receptor frizzled, byly pozorovány po stimulaci kontrolních buněk TRH nebo TAL, nebo po stimulaci buněk se sníženou expresí β -arrestinu2 pomocí TRH. Tyto výsledky tedy poukazují na zapojení TRH-R aktivované signalizace v regulaci aktivity β -kateninu a naznačují rozdílné účinky TRH a TAL v těchto signalizačních transdukcích.

Jak bylo uvedeno dříve v této práci, signalizace vedoucí od aktivovaného TRH-R by mohla mít své uplatnění v modulaci průběhu nebo léčby neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba, protože jak TRH, tak jeho různé analogy vykazují jisté neuroprotektivní účinky (Jaworska-Feil *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2018b). V naší studii jsme prokázali změny ve fosforylaci proteinů souvisejících s těmito neuropatologiemi indukované TRH nebo TAL. V případě Alzheimerovy choroby bylo zjištěno zapojení PI3K/Akt/mTOR dráhy, snížená aktivita AMPK a naopak zvýšená aktivita p38 MAPK nebo inhibice Wnt signální dráhy (Martinez-Cue a Rueda, 2020). V patogenezi Parkinsonovy choroby pravděpodobně hraje roli narušení intracelulárního transportu, poškození funkce Rab7 a zapojení p38/JNK signální dráhy (Bohush *et al.*, 2018; Cherubini a Wade-Martins, 2018). Naše výsledky tak pomáhají rozklíčovat molekulární mechanismy stojícími za účinky TRH a TAL s využitím modelu snížené exprese β -arrestinu2 v GH1 buňkách.

8. Závěr

Tato disertační práce vznikla na základě dvou publikovaných studií a dalších nepublikovaných dat zabývajících se vlivem ústředních signálních molekul TRH-R-řízené signalizace na chování receptoru v membráně a na přenos signálu od receptoru směrem k různým efektorovým molekulám.

Výsledky první studie ukázaly, že nejen stimulace pomocí TRH, ale také přítomnost jednotlivých signalizačních molekul má zásadní vliv na pohyblivost TRH-R v membráně. TRH výrazně snížil difúzní koeficient, neměl však žádný vliv na velikost mobilní frakce. Na druhou stranu, pokud jsme použili antagonistu TRH-R, MDL, efekt TRH byl zablokovan a část TRH-R v membráně byla určitým způsobem znehybněna, protože došlo k významnému poklesu v mobilní frakci. Zkoumání zapojení vybraných signálních molekul v parametrech laterální pohyblivosti TRH-R v membráně odhalilo vliv téměř všech studovaných proteinů jak na velikost difúzního koeficientu, tak na mobilní frakci, účinek TRH byl ale ve většině případů silnější než vliv změněné exprese jednotlivých proteinů. Nejsilnější efekt na hodnotu difúzního koeficientu byl zaznamenán po inhibici $G_{q/11\alpha}$, $G_{\beta 1/2}$, β -Arr2 a $PLC\beta_1$, hodnota mobilní frakce byla nejvíce ovlivněna snížením hladin $G_{q/11\alpha}$, $G_{\beta 1/2}$, β -Arr1 a $G_i\alpha-1$ proteinů. Nejzajímavějším zjištěním této práce byl právě výrazný pokles v mobilní frakci po snížení exprese $G_i\alpha-1$, naznačující zapojení této podjednotky v TRH-R řízené signalizaci.

Vliv jednotlivých signalizačních molekul na funkční stav TRH-R byl sledován jak na úrovni intracelulárních hladin Ca^{2+} , IP_3 , ale také cAMP. Měření intracelulární koncentrace Ca^{2+} prokázalo odlišný vliv $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ proteinů na výlev tohoto druhého posla z intracelulárních zásobáren v odpovědi na TRH jak u TRY-1, tak u E2 linie, zkoumání působení jednotlivých signálních molekul na desenzitizaci tohoto receptoru by však vyžadovalo další výzkum, neboť naše výsledky v tomto ohledu neprokázaly jednotný účinek. Výsledky získané nepřímým měřením IP_3 , pomocí IP_1 , naznačily regulaci aktivity $PLC\beta$ prostřednictvím hned několika proteinů. Aplikace TRH vedla ke zvýšení koncentrace IP_3 , což bylo zablokováno MDL. Významný pokles v produkci IP_3 byl zaznamenán, pokud byla snížena exprese $G_{q/11\alpha}$, $G_{\beta 1/2}$, $PLC\beta_1$ nebo RGS2. Naopak nárůst v koncentraci IP_3 způsobil pokles v expresi GRK2, β -arrestinu2 nebo dokonce $G_s\alpha$ a $G_i\alpha$. Dokázali jsme, že pokud je nedostatek proteinů důležitých pro signální transdukcii TRH-R, dochází k poklesu v aktivitě $PLC\beta$, naopak pokud jsou sníženy hladiny proteinů důležitých pro desenzitizaci TRH-R, jako jsou GRK2 a β -arrestin2, dochází ke zvýšení aktivity $PLC\beta$. Naše výsledky také naznačují, že TRH-R pravděpodobně po své aktivaci působí také přes jiné $G\alpha$ proteiny ($G_s\alpha$ a $G_i\alpha$), a řídí přenos signálu pomocí jiných signálních drah, neboť nedostatek těchto proteinů vede k výraznému zvýšení v produkci IP_3 . Zkoumání možného vlivu signální dráhy TRH-R na aktivitu AC potvrdilo, že po aktivaci této dráhy jak TRH, tak TAL dochází ke zvýšení produkce cAMP. Zapojení jednotlivých proteinů v tomto procesu bylo více zřejmé na modelu buněčné linie E2, kde byl

pozorován pokles v produkci cAMP po inhibici $G_{q/11\alpha}$ proteinů a naopak nárůst v koncentraci cAMP po snížení hladin PLC β . Velmi zajímavým zjištěním byl rozdíl v zapojení odlišných podtypů β -arrestinu v regulaci aktivity AC u různých buněčných linií. Zatímco v případě E2 buněk byl výrazný pokles v produkci cAMP detekován po snížení exprese β -arrestinu1, u GH1 buněčné linie to byl naopak β -arrestin2, který způsobil pokles v produkci cAMP.

Dalším zjištěním této práce bylo, že TRH a TAL vykazují antioxidační účinky, neboť jsme po stimulaci GH1 buněk pozorovali nárůst v celkové antioxidační kapacitě a také zvýšenou expresi antioxidačních enzymů. Také jsme prokázali mírné protektivní účinky TRH a TAL proti oxidačnímu stresu vyvolanému *t*-BHP. Ani jeden z agonistů TRH-R ale neprokázal žádný účinek na spotřebu kyslíku, ani na procesy oxidativní fosforylace.

V poslední studii jsme ukázali, že aktivace TRH-R ale také úroveň exprese β -arrestinu2 má klíčovou úlohu v signálních drahách malých GTPáz a MAPK, neboť jsme pozorovali změny ve fosforylaci mnoha proteinů těchto drah související se sníženou hladinou β -arrestinu2. Námi použité ligandy, TRH a TAL, vykazovaly v řadě proteinů odlišný vliv na jejich fosforylaci, což poukazuje na určitý usměrňovací agonismus těchto ligandů vůči TRH-R. Také jsme prokázali úlohu TRH-R signalizace a β -arrestinu2 ve fosforylaci proteinů z mnoha důležitých signalizačních kaskád, které jsou zapojené například v progresi neurodegenerativních chorob.

Tyto výsledky v souhrnu naznačují, že vyřazení některého z interakčních partnerů nebo stimulace receptoru různými ligandy má zásadní vliv jak na pohyblivost receptoru v membráně, tak ve svém důsledku také na výběr signálních drah určujících výsledný (pato)fyziologický účinek.

9. Seznam použité literatury

- Abera AB, Sales KJ, Catalano RD, Katz AA & Jabbour HN. (2010). EP2 receptor mediated cAMP release is augmented by PGF(2 alpha) activation of the FP receptor via the calcium-calmodulin pathway. *Cellular Signalling* **22**, 71-79.
- Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C & Chidiac P. (2006). RGS proteins have a signalling complex: Interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cellular Signalling* **18**, 579-591.
- Akerman SN, Zorec R, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ & Mason WT. (1991). Fura-2 imaging of thyrotropin-releasing-hormone and dopamine effects on calcium homeostasis of bovine lactotrophs. *Endocrinology* **129**, 475-488.
- Akita Y, Kawasaki H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Ohno S, Hirano H, Ono Y & Yonekawa H. (2007). Protein kinase C epsilon phosphorylates keratin 8 at Ser8 and Ser23 in GH(4)C(1) cells stimulated by thyrotropin-releasing hormone. *FEBS Journal* **274**, 3270-3285.
- Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Konno Y, Saido TC, Mizuno K, Chida K, Osada S, Kuroki T, Kawashima S & Suzuki K. (1994). Overproduction of a Ca^{2+} -independent protein-kinase-c isozyme, npkc-epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary gh(4)c(1) cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 4653-4660.
- Akizu N & Martínez-Balbás MA. (2016). EZH2 orchestrates apicobasal polarity and neuroepithelial cell renewal. *Neurogenesis (Austin)* **3**, e1250034.
- Alsaqati M, Heine VM & Harwood AJ. (2020). Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation. *Molecular Autism* **11**, 80.
- Anderson L, Alexander CL, Faccenda E & Eidne KA. (1995). Rapid desensitization of the thyrotropin-releasing-hormone receptor expressed in single human-embryonal-kidney-293-cells. *Biochemical Journal* **311**, 385-392.
- Anger T, Zhang W & Mende U. (2004). Differential contribution of GTPase activation and effector antagonism to the inhibitory effect of RGS proteins on G(q)-mediated signaling in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3906-3915.
- Annunziata MC, Parisi M, Esposito G, Fabbrocini G, Ammendola R & Cattaneo F. (2020). Phosphorylation Sites in Protein Kinases and Phosphatases Regulated by Formyl Peptide Receptor 2 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 3818.
- Antoni FA, Palkovits M, Simpson J, Smith SM, Leitch AL, Rosie R, Fink G & Paterson JM. (1998). Ca^{2+} /calmodulin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *Journal of Neuroscience* **18**, 9650-9661.
- Arash EH, Song KM, Song S, Shiban A & Attisano L. (2014). Arhgef7 promotes activation of the Hippo pathway core kinase Lats. *EMBO Journal* **33**, 2997-3011.
- Arshavsky VY & Bownds MD. (1992). Regulation of deactivation of photoreceptor G-protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* **357**, 416-417.
- Ashworth R, Yu R, Nelson EJ, Dermer S, Gershengorn MC & Hinkle PM. (1995). Visualization of the thyrotropin-releasing-hormone receptor and its ligand during endocytosis and

recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 512-516.

- Asih PR, Prikas E, Stefanoska K, Tan ARP, Ahel HI & Ittner A. (2020). Functions of p38 MAP Kinases in the Central Nervous System. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **13**, 570586.
- Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K & Straiker A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* **12**, 14.
- Bah A, Vernon RM, Siddiqui Z, Krzeminski M, Muhandiram R, Zhao C, Sonenberg N, Kay LE & Forman-Kay JD. (2015). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **519**, 106-U240.
- Baker MJ, Pan DX & Welch HCE. (2016). Small GTPases and their guanine-nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins in neutrophil recruitment. *Current Opinion in Hematology* **23**, 44-54.
- Banihashemi B & Albert PR. (2002). Dopamine-D2S receptor inhibition of calcium influx, adenylyl cyclase, and mitogen-activated protein kinase in pituitary cells: Distinct G alpha and G beta gamma requirements. *Molecular Endocrinology* **16**, 2393-2404.
- Bansinath M & Bhargava HN. (1988). Evidence for a peripheral action of thyrotropin releasing hormone on gastrointestinal transit in mice. *Neuropharmacology* **27**, 433-437.
- Barr AJ, Ali H, Haribabu B, Snyderman R & Smrcka AV. (2000). Identification of a region at the N-terminus of phospholipase C-beta 3 that interacts with G protein beta gamma subunits. *Biochemistry* **39**, 1800-1806.
- Bauer CK, Davison I, Kubasov I, Schwarz JR & Mason WT. (1994). Different G-proteins are involved in the biphasic response of clonal rat pituitary-cells to thyrotropin-releasing-hormone. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **428**, 17-25.
- Beazely MA & Watts VJ. (2005). G alpha(q)-coupled receptor signaling enhances adenylyl cyclase type 6 activation. *Biochemical Pharmacology* **70**, 113-120.
- Beck TN, Nicolas E, Kopp MC & Golemis EA. (2014). Adaptors for disorders of the brain? The cancer signaling proteins NEDD9, CASS4, and PTK2B in Alzheimer's disease. *Oncoscience* **1**, 486-503.
- Berman DM & Gilman AG. (1998). Mammalian RGS proteins: Barbarians at the gate. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1269-1272.
- Bernkopff DB, Bruckner M, Hadjihannas MV & Behrens J. (2019). An aggregon in conductin/axin2 regulates Wnt/beta-catenin signaling and holds potential for cancer therapy. *Nature Communications* **10**, 4251.
- Bernstein LS, Ramineni S, Hague C, Cladman W, Chidiac P, Levey AI & Hepler JR. (2004). RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate G(q/11 alpha) signaling. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 21248-21256.
- Biddlecome GH, Berstein G & Ross EM. (1996). Regulation of phospholipase C-beta 1 by G(q) and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation (vol 271, pg 7999, 1996).

- Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A & Ponstingl H. (1994). RANGAP1 induced GTPase activity of nuclear RAS-related RAN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2587-2591.
- Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R & Schioth HB. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**, 263-273.
- Blangy A. (2017). Tensins are versatile regulators of Rho GTPase signalling and cell adhesion. *Biology of the Cell* **109**, 115-126.
- Bohush A, Niewiadomska G & Filipek A. (2018). Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2973.
- Boissier P & Huynh-Do U. (2014). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: A Janus-faced molecule in cellular signaling. *Cellular Signalling* **26**, 483-491.
- Bok S, Shin DY, Yallowitz AR, Eiseman M, Cung M, Xu R, Li N, Sun J, Williams AL, Scott JE, Su B, Shim JH & Greenblatt MB. (2020). MEKK2 mediates aberrant ERK activation in neurofibromatosis type I. *Nature Communications* **11**, 5704.
- Bol GF, Gros C, Hulster A, Bosel A & Pfeuffer T. (1997a). Phorbol ester-induced sensitisation of adenylyl cyclase type II is related to phosphorylation of threonine 1057. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**, 251-256.
- Bol GF, Hulster A & Pfeuffer T. (1997b). Adenylyl cyclase type II is stimulated by PKC via C-terminal phosphorylation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1358**, 307-313.
- Boran ADW, Chen YB & Iyengar R. (2011). Identification of new G beta gamma interaction sites in adenylyl cyclase 2. *Cellular Signalling* **23**, 1489-1495.
- Boudhraa Z, Carmona E, Provencher D & Mes-Masson AM. (2020). Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 245.
- Bourquard T, Landomiel F, Reiter E, Crepieux P, Ritchie DW, Aze J & Poupon A. (2015). Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/beta-arrestin/Erk module complex. *Scientific Reports* **5**, 10760.
- Brejchova J, Sykora J, Ostasov P, Merta L, Roubalova L, Janacek J, Hof M & Svoboda P. (2015). TRH-receptor mobility and function in intact and cholesterol-depleted plasma membrane of HEK293 cells stably expressing TRH-R-eGFP. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1848**, 781-796.
- Bros M, Haas K, Moll L & Grabbe S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells* **8**, 733.
- Brozmanova H, Langer P, Knopp J & Foldes O. (1980). Changes in adenylate-cyclase activity in rat pituitary after TRH and T3 injection invivo. *Acta Endocrinologica* **95**, 166-171.
- Brudvig JJ, Cain JT, Sears RM, Schmidt-Grimminger GG, Wittchen ES, Adler KB, Ghashghaei HT & Weimer JM. (2018). MARCKS regulates neuritegenesis and interacts with a CDC42 signaling network. *Scientific Reports* **8**, 13278.

- Bryja V, Schambony A, Cajanek L, Dominguez I, Arenas E & Schulte G. (2008). beta-Arrestin and casein kinase 1/2 define distinct branches of non-canonical WNT signalling pathways. *EMBO Reports* **9**, 1244-1250.
- Cao XQ, Cismowski MJ, Sato M, Blumer JB & Lanier SM. (2004). Identification and characterization of AGS4 - A protein containing three G-protein regulatory motifs that regulate the activation state of G(i)alpha. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 27567-27574.
- Carayon K, Mouledous L, Combedazou A, Mazeret S, Haanappel E, Salome L & Mollereau C. (2014). Heterologous Regulation of Mu-Opioid (MOP) Receptor Mobility in the Membrane of SH-SY5Y Cells. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 28697-28706.
- Carman CV, Barak LS, Chen CG, Liu-Chen LY, Onorato JJ, Kennedy SP, Caron MG & Benovic JL. (2000). Mutational analysis of G beta gamma and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10443-10452.
- Carretero L, Llavona P, Lopez-Hernandez A, Casado P, Cutillas PR, de la Pena F, Barros F & Dominguez P. (2015). ERK and RSK are necessary for TRH-induced inhibition of r-ERG potassium currents in rat pituitary GH(3) cells. *Cellular Signalling* **27**, 1720-1730.
- Casalou C, Faustino A & Barral DC. (2016). Arf proteins in cancer cell migration. *Small GTPases* **7**, 270-282.
- Cassier E, Gallay N, Bourquard T, Claeysen S, Bockaert J, Crepieux P, Poupon A, Reiter E, Marin P & Vandermoere F. (2017). Phosphorylation of beta-arrestin2 at Thr(383) by MEK underlies beta-arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife* **6**, e23777.
- Ceresa BP. (2006). Regulation of EGFR endocytic trafficking by rab proteins. *Histology and Histopathology* **21**, 987-993.
- Cerezo EL, Houles T, Lie O, Sarthou MK, Audouyoud C, Lavoie G, Halladjian M, Cantaloube S, Froment C, Burette-Schiltz O, Henry Y, Roux PP, Henras AK & Romeo Y. (2021). RIOK2 phosphorylation by RSK promotes synthesis of the human small ribosomal subunit. *PLOS Genetics* **17**, e1009583.
- Chaineau M, Ioannou MS & McPherson PS. (2013). Rab35: GEFs, GAPs and Effectors. *Traffic* **14**, 1109-1117.
- Chakrabarti S & Gintzler AR. (2003). Phosphorylation of G(beta) is augmented by chronic morphine and enhances G(beta gamma) stimulation of adenylyl cyclase activity. *Molecular Brain Research* **119**, 144-151.
- Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA & Sillje HHW. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* **24**, 2076-2086.
- Chan P, Gabay M, Wright FA, Kan W, Oner SS, Lanier SM, Smrcka AV, Blumer JB & Tall GG. (2011a). Purification of Heterotrimeric G Protein alpha Subunits by GST-Ric-8 association primary characterization of purified G alpha(olf). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 2625-2635.
- Chan P, Gabay M, Wright FA & Tall GG. (2011b). Ric-8B Is a GTP-dependent G Protein alpha(s) Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 19932-19942.

- Chavrier P & Goud B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 466-475.
- Chen JQ, Devivo M, Dingus J, Harry A, Li JR, Sui JL, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH, Inglese J, Lefkowitz RJ, Logothetis DE, Hildebrandt JD & Iyengar R. (1995). A region of adenylyl-cyclase-2 critical for regulation by G-protein beta-gamma-subunits. *Science* **268**, 1166-1169.
- Chen M, Qu BX, Chen XL, Hu HH, Jiang HD, Yu LS, Zhou Q & Zeng S. (2016). Construction of HEK293 cells stably expressing wild-type organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1(star)1a) and variant OATP1B1(star)1b and OATP1B1(star)15. *Pharmazie* **71**, 337-339.
- Chen QA, Zhu YC, Yu J, Miao S, Zheng J, Xu L, Zhou Y, Li D, Zhang C, Tao J & Xiong ZQ. (2010). CDKL5, a Protein Associated with Rett Syndrome, Regulates Neuronal Morphogenesis via Rac1 Signaling. *Journal of Neuroscience* **30**, 12777-12786.
- Chen X, Shibata ACE, Hendi A, Kurashina M, Fortes E, Weilinger NL, MacVicar BA, Murakoshi H & Mizumoto K. (2018). Rap2 and TNIK control Plexin-dependent tiled synaptic innervation in *C. elegans*. *Elife* **7**, e38801.
- Chen Y, Liang ZY, Fei EK, Chen YW, Zhou XP, Fang WQ, Fu WY, Fu AKY & Ip NY. (2015). Axin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis through Cdc42-Dependent Signaling. *PLOS One* **10**, e0133115.
- Cherubini M & Wade-Martins R. (2018). Convergent pathways in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research* **373**, 79-90.
- Choi EJ, Wong ST, Hinds TR & Storm DR. (1992). Calcium and muscarinic agonist stimulation of type-i adenylylcyclase in whole cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 12440-12442.
- Cismowski MJ, Ma CL, Ribas C, Xie XB, Spruyt M, Lizano JS, Lanier SM & Duzic E. (2000). Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a Ras-related protein - Implications for signal integration. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23421-23424.
- Clayton NS & Ridley AJ. (2020). Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 222.
- Coffa S, Breitman M, Hanson SM, Callaway K, Kook S, Dalby KN & Gurevich VV. (2011). The Effect of Arrestin Conformation on the Recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 Activation. *PLOS One* **6**, e28723.
- Cook DR, Rossman KL & Der CJ. (2014). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021-4035.
- Cook JVF, McGregor A, Lee TW, Milligan G & Eidne KA. (1996). A disulfide bonding interaction role for cysteines in the extracellular domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* **137**, 2851-2858.
- Cook LB & Hinkle PM. (2004a). Agonist-dependent up-regulation of thyrotrophin-releasing hormone receptor protein. *Biochemical Journal* **380**, 815-821.
- Cook LB & Hinkle PM. (2004b). Fate of internalized thyrotropin-releasing hormone receptors monitored with a timer fusion protein. *Endocrinology* **145**, 3095-3100.

- Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Barrachina MD & Calatayud S. (2020). Metabolite Sensing GPCRs: Promising Therapeutic Targets for Cancer Treatment? *Cells* **9**, 2345.
- Cossette SM, Bhute VJ, Bao X, Harmann LM, Horswill MA, Sinha I, Gastonguay A, Pooya S, Bordas M, Kumar SN, Mirza SP, Palecek SP, Strande JL & Ramchandran R. (2016). Sucrose Nonfermenting-Related Kinase Enzyme-Mediated Rho-Associated Kinase Signaling is Responsible for Cardiac Function. *Circulation-Cardiovascular Genetics* **9**, 474-486.
- Cuesta C, Arevalo-Alameda C & Castellano E. (2021). The Importance of Being PI3K in the RAS Signaling Network. *Genes* **12**, 1094.
- Cui ZJ, Gorelick FS & Dannies PS. (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein-kinase-II activation in rat pituitary-cells in the presence of thyrotropin-releasing-hormone and dopamine. *Endocrinology* **134**, 2245-2250.
- Cumbay MG & Watts VJ. (2005). G alpha(q) potentiation of adenylate cyclase type 9 activity through a Ca²⁺/calmodulin-dependent pathway. *Biochemical Pharmacology* **69**, 1247-1256.
- D'Aloia A, Berruti G, Costa B, Schiller C, Ambrosini R, Pastori V, Martegani E & Ceriani M. (2018). RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells. *Experimental Cell Research* **362**, 349-361.
- Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S & Martin B. (2013). The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases. *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias (Columbia)* **1**, 10.7726/ajad.2013.1003.
- Danielson SR & Andersen JK. (2008). Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1787-1794.
- Dasso M. (2002). The Ran GTPase: Theme and variations. *Current Biology* **12**, R502-R508.
- Davies MN, Secker A, Freitas AA, Mendao M, Timmis J & Flower DR. (2007). On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics* **23**, 3113-3118.
- Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL & Wedegaertner PB. (2003). Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha(q) family. *Biochemistry* **42**, 9176-9184.
- de la Peña P, del Camino D, Pardo LA, Domínguez P & Barros F. (1995). Gs couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in *Xenopus* oocytes to phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3554-3559.
- de la Peña P, Delgado LM, del Camino D & Barros F. (1992). Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 25703-25708.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E & Farquhar MG. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**, 235-271.
- Del'Guidice T, Lemasson M & Beaulieu JM. (2011). Role of beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy* **5**, 58.
- Deng YN, Xia ZJ, Zhang P, Ejaz S & Liang SF. (2020). Transcription Factor RREB1: from Target

- Genes towards Biological Functions. *International Journal of Biological Sciences* **16**, 1463-1473.
- Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA & Ruzzene M. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death and Differentiation* **12**, 668-677.
- Diel S, Beyermann M, Llorens JMN, Wittig B & Kleuss C. (2008). Two interaction sites on mammalian adenylyl cyclase type I and II: modulation by calmodulin and G(beta gamma). *Biochemical Journal* **411**, 449-456.
- Diel S, Klass K, Wittig B & Kleuss C. (2006). G beta gamma activation site in adenylyl cyclase type II Adenylyl cyclase type III is inhibited by G beta gamma. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 288-294.
- Dorr A, Pierre S, Zhang DD, Henke M, Holland S & Scholich K. (2015). MYCBP2 Is a Guanosine Exchange Factor for Ran Protein and Determines Its Localization in Neurons of Dorsal Root Ganglia. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 25620-25635.
- Dowal L, Elliott J, Popov S, Wilkie TM & Scarlata S. (2001). Determination of the contact energies between a regulator of G protein signaling and G protein subunits and phospholipase C beta(1). *Biochemistry* **40**, 414-421.
- Drago F, Coppi G, Antonuzzo PA, Valerio C, Genazzani AA, Grassi M, Raffaele R & Scapagnini U. (1996). Effects of RGH 2202 on cognitive and motor behavior of the rat. *Neurobiology of Aging* **17**, 67-71.
- Drago F, Grassi M, Valerio C, Coppi G, Lauria N, Nicotra GC & Raffaele R. (1991). Behavioral-changes induced by the thyrotropin-releasing-hormone analog, RGH 2202. *Peptides* **12**, 1309-1313.
- Drastichova Z, Bourova L, Hejnova L, Jedelsky P, Svoboda P & Novotny J. (2010). Protein Alterations Induced by Long-Term Agonist Treatment of HEK293 Cells Expressing Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor and G(11)alpha Protein. *Journal of Cellular Biochemistry* **109**, 255-264.
- Drastichova Z & Novotny J. (2012a). Identification and subcellular localization of molecular complexes of G(q/11) protein in HEK293 cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **44**, 641-649.
- Drastichova Z & Novotny J. (2012b). Identification of a Preassembled TRH Receptor-G(q/11) Protein Complex in HEK293 Cells. *Cell Structure and Function* **37**, 1-12.
- Drmotá T, Gould GW & 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. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24000-24008.
- Drmotá T & Milligan G. (2000). Kinetic analysis of the internalization and recycling of H-3 TRH and C-terminal truncations of the long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1. *Biochemical Journal* **346**, 711-718.
- Drmotá T, Novotny J, Gould GW, 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. *Biochemical Journal* **340**, 529-538.

- Drmota T, Novotny J, Kim GD, Eidne KA, 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. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21699-21707.
- Drust DS & Martin TFJ. (1982). Thyrotropin-releasing-hormone rapidly and transiently stimulates cytosolic calcium-dependent protein-phosphorylation in GH3 pituitary-cells. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 7566-7573.
- Drust DS & Martin TFJ. (1984). Thyrotropin-releasing-hormone rapidly activates protein-phosphorylation in GH3 pituitary-cells by a lipid-linked, protein-kinase C-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 4520-4530.
- Du DY, Raaka BM, Grimberg H, Lupu-Meiri M, Oron Y & Gershengorn MC. (2005). Carboxyl tail cysteine mutants of the thyrotropin-releasing hormone receptor type 1 exhibit constitutive signaling: Role of palmitoylation. *Molecular Pharmacology* **68**, 204-209.
- Durkin CH, Leite F, Cordeiro JV, Handa Y, Arakawa Y, Valderrama F & Way M. (2017). RhoD Inhibits RhoC-ROCK-Dependent Cell Contraction via PAK6. *Developmental Cell* **41**, 315-329.
- Dutil EM & Newton AC. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10697-10701.
- Eathiraj S, Pan XJ, Ritacco C & Lambright DG. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**, 415-419.
- Eiseler T, Wille C, Koehler C, Illing A & Seufferlein T. (2016). Protein Kinase D2 Assembles a Multiprotein Complex at the Trans-Golgi Network to Regulate Matrix Metalloproteinase Secretion. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 462-477.
- Eisemann T, McCauley M, Langelier MF, Gupta K, Roy S, Van Duyne GD & Pascal JM. (2016). Tankyrase-1 Ankyrin Repeats Form an Adaptable Binding Platform for Targets of ADP-Ribose Modification. *Structure* **24**, 1679-1692.
- Eishingdrelo H, Kongsamut S. (2013). Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*. **7**, 9-15.
- Eisler SA, Curado F, Link G, Schulz S, Noack M, Steinke M, Olayioye MA & Hausser A. (2018). A Rho signaling network links microtubules to PKD controlled carrier transport to focal adhesions. *Elife* **7**, e35907.
- Elbaz-Alon Y, Guo YT, Segev N, Harel M, Quinnell DE, Geiger T, Avinoam O, Li D & Nunnari J. (2020). PDZD8 interacts with Protrudin and Rab7 at ER-late endosome membrane contact sites associated with mitochondria. *Nature Communications* **11**, 3645.
- Engel S, Neumann S, Kaur N, Monga V, Jain R, Northup J & Gershengorn MC. (2006). Low affinity analogs of thyrotropin-releasing hormone are super-agonists. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 13103-13109.
- Escobar-Henriques M & Anton V. (2020). Mitochondrial Surveillance by Cdc48/p97: MAD vs. Membrane Fusion. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 6841.
- Faden AI. (1989). TRH analog YM-14673 improves outcome following traumatic brain and spinal-

- cord injury in rats - dose-response studies. *Brain Research* **486**, 228-235.
- Faden AI, Fox GB, Fan L, Araldi GL, Qiao LX, Wang SM & Kozikowski AP. (1999). Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **277**, R1196-R1204.
- Faden AI, Knoblach SM, Movsesyan VA, Lea PM & Cernak I. (2005a). Novel neuroprotective tripeptides and dipeptides. *Neuroprotective Agents* **1053**, 472-481.
- Faden AI, Movsesyan VA, Knoblach SM, Ahmed F & Cernak B. (2005b). Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury. *Neuropharmacology* **49**, 410-424.
- Fang CY, Lai TC, Hsiao M & Chang YC. (2020). The Diverse Roles of TAO Kinases in Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7463.
- Fang DX, Hawke D, Zheng YH, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T & Lu ZM. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 11221-11229.
- Farrugia AJ & Calvo F. (2016). The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochemical Society Transactions* **44**, 1709-1716.
- Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR & Bourne HR. (1992). Hormonal-stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta-gamma-subunits. *Nature* **356**, 159-161.
- Feng XD, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, Chen QM & Gutkind JS. (2014). Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-Regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831-845.
- Fillatre J, Delacour D, Van Hove L, Bagarre T, Houssin N, Soulika M, Veitia RA & Moreau J. (2012). Dynamics of the subcellular localization of RalBP1/RLIP through the cell cycle: the role of targeting signals and of protein-protein interactions. *Faseb Journal* **26**, 2164-2174.
- Fokin AI, Klementeva TS, Nadezhdina ES & Burakov AV. (2016). SLK/LOSK kinase regulates cell motility independently of microtubule organization and Golgi polarization. *Cytoskeleton* **73**, 83-92.
- Forrest MP, Parnell E & Penzes P. (2018). Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience* **19**, 215-234.
- Fortin SP, Ennis MJ, Schumacher CA, Zylstra-Diegel CR, Williams BO, Ross JTD, Winkles JA, Loftus JC, Symons MH & Tran NL. (2012). Cdc42 and the Guanine Nucleotide Exchange Factors Ect2 and Trio Mediate Fn14-Induced Migration and Invasion of Glioblastoma Cells. *Molecular Cancer Research* **10**, 958-968.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG & Schioth HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology* **63**, 1256-1272.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* **80**, 1523-1631.

- Frolich N, Dees C, Paetz C, Ren X, Lohse MJ, Nikolaev VO & Zenk MH. (2011). Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochemical Pharmacology* **81**, 1248-1254.
- Fu XD. (2017). Both sides of the same coin: Rac1 splicing regulating by EGF signaling. *Cell Research* **27**, 455-456.
- Gallo LI, Liao Y, Ruiz WG, Clayton DR, Li M, Liu YJ, Jiang Y, Fukuda M, Apodaca G & Yin XM. (2014). TBC1D9B functions as a GTPase-activating protein for Rab11a in polarized MDCK cells. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 3779-3797.
- Ganguly S, Pucadyil TJ & Chattopadhyay A. (2008). Actin cytoskeleton-dependent dynamics of the human serotonin(1A) receptor correlates with receptor signaling. *Biophysical Journal* **95**, 451-463.
- Garcia-Marcos M, Ghosh P & Farquhar MG. (2009). GIV is a nonreceptor GEF for G alpha i with a unique motif that regulates Akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3178-3183.
- Garzon J, Rodriguez-Munoz M, Lopez-Fando A & Sanchez-Blazquez P. (2005a). Activation of mu-opioid receptors transfers control of G alpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2 - Role in receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 8951-8960.
- Garzon J, Rodriguez-Munoz M & Sanchez-Blazquez P. (2005b). Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology* **48**, 853-868.
- Gasbarrini G, Stefanini G, Addolorato G, Foschi F, Ricci C, Bertolotti P, Voltolini G, Bonavita E, Bertoncelli R, Renzi G, Bianchini G, Bonaiuto S, Giannandrea E, Cavassini G, Mazzini V, Chioma V, Marzara G, Daddetta G, Totaro G, Dalmonte E, Tassini D, Giungi F, DeNitto C, DiFazio G, Tessitore A, Guadagnino M, Tessitore E, Spina P, Luppi M, Bignamini A, Peracino L, Fiorentino M, BeunGarbe D, Poli A, Ambrosoli L & Girardello R. (1997). Positirelin for the treatment of degenerative and vascular dementia: results of explanatory and pragmatic efficacy analyses. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **26**, 33-47.
- Gautvik KM, Walaas E & Walaas O. (1977). Effect of thyroliberin on concentration of adenosine 3'-5'-phosphate and on activity of adenosine 3'-5'-phosphate-dependent protein-kinase in prolactin-producing cells in culture. *Biochemical Journal* **162**, 379-386.
- Gehret AU & Hinkle PM. (2010). Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical Journal* **428**, 235-245.
- Gehret AU & Hinkle PM. (2013). siRNA Screen Identifies the Phosphatase Acting on the G Protein-Coupled Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor. *ACS Chemical Biology* **8**, 588-598.
- Gehret AU, Jones BW, Tran PN, Cook LB, Greuber EK & Hinkle PM. (2010). Role of Helix 8 of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor in Phosphorylation by G Protein-Coupled Receptor Kinase. *Molecular Pharmacology* **77**, 288-297.
- Geisse S & Fux C. (2009). Recombinant protein production by transient gene transfer into mammalian cells. *Guide to Protein Purification, Second Edition* **463**, 223-238.

- Georgoussi Z, Leontiadis L, Mazarakou G, Merkouris M, Hyde K & Hamm H. (2006). Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cellular Signalling* **18**, 771-782.
- Gershengorn MC & Osman R. (1996). Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiological Reviews* **76**, 175-191.
- Ghelfi E, Grondin Y, Millet EJ, Bartos A, Bortoni M, dos Santos COG, Trevino-Villarreal HJ, Sepulveda R & Rogers R. (2018). In vitro gentamicin exposure alters caveolae protein profile in cochlear spiral ligament pericytes. *Proteome Science* **16**, 7.
- Ghil S, McCoy KL & Hepler JR. (2014). Regulator of G Protein Signaling 2 (RGS2) and RGS4 Form Distinct G Protein-Dependent Complexes with Protease Activated-Receptor 1 (PAR1) in Live Cells. *PLoS One* **9**, e95355.
- Gil JM & Rego AC. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* **27**, 2803-2820.
- Girardi C, James P, Zanin S, Pinna LA & Ruzzene M. (2014). Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1843**, 1865-1874.
- Gnad T, Navarro G, Lahesmaa M, Reverte-Salisa L, Copperi F, Cordomi A, Naumann J, Hochhauser A, Haufs-Brusberg S, Wenzel D, Suhr F, Jespersen NZ, Scheele C, Tsvilovskyy V, Brinkmann C, Rittweger J, Dani C, Kranz M, Deuther-Conrad W, Eltzhig HK, Niemi T, Taittonen M, Brust P, Nuutila P, Pardo L, Fleischmann BK, Bluher M, Franco R, Bloch W, Virtanen KA & Pfeifer A. (2020). Adenosine/A2B Receptor Signaling Ameliorates the Effects of Aging and Counteracts Obesity. *Cell Metabolism* **32**, 56-70.
- Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS & Zhao JJ. (2018). CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in Cell Biology* **28**, 911-925.
- Gollasch M, Kleuss C, Hescheler J, Wittig B & Schultz G. (1993). G(i2) and protein-kinase-C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat pituitary GH3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6265-6269.
- Gong XW, Didan Y, Lock JG & Stromblad S. (2018). KIF13A-regulated RhoB plasma membrane localization governs membrane blebbing and blebby amoeboid cell migration. *EMBO Journal* **37**, e98994.
- Gordeladze JO, Bjoro T, Ostberg BC, Sand O, Torjesen P, Haug E & Gautvik KM. (1988). Phorbol esters and thyroliberin have distinct actions regarding stimulation of prolactin secretion and activation of adenylate-cyclase in rat pituitary-tumor cells (GH4C1 CELLS). *Biochemical Pharmacology* **37**, 3133-3138.
- Graham TE, Prossnitz ER & Dorin RI. (2002). Dexras1/AGS-1 inhibits signal transduction from the G(i)-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 10876-10882.
- Grimberg H, Zaltsman I, Lupu-Meiri M, Gershengorn MC & Oron Y. (1999). Inverse agonist abolishes desensitization of a constitutively active mutant of thyrotropin-releasing hormone receptor: role of cellular calcium and protein kinase C. *British Journal of Pharmacology*

126, 1097-1106.

- Groarke DA, Drmota T, Bahia DS, Evans NA, Wilson S & Milligan G. (2001). Analysis of the C-terminal tail of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1 in interactions and cointernalization with beta-arrestin 1-green fluorescent protein. *Molecular Pharmacology* **59**, 375-385.
- Gurevich VV & Gurevich EV. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in Pharmacology* **10**, 125.
- Gutierrez-Mariscal M, de Gortari P, Lopez-Rubalcava C, Martinez A & Joseph-Bravo P. (2008). Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* **33**, 198-213.
- Haga RB & Ridley AJ. (2016). Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **7**, 207-221.
- Hague C, Bernstein LS, Ramineni S, Chen ZJ, Minneman KP & Hepler JR. (2005). Selective inhibition of alpha(1A)-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 27289-27295.
- Han BM & Tashjian AH. (1995a). Identification of asn289 as a ligand-binding site in the rat thyrotropin-releasing-hormone (TRH) receptor as determined by complementary modifications in the ligand and receptor - a new model for TRH binding. *Biochemistry* **34**, 13412-13422.
- Han BM & Tashjian AH. (1995b). Importance of extracellular domains for ligand-binding in the thyrotropin-releasing-hormone receptor. *Molecular Endocrinology* **9**, 1708-1719.
- Hanyaloglu AC, Seeber RM, Kohout TA, Lefkowitz RJ & Eidne KA. (2002). Homo- and hetero-oligomerization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtypes - Differential regulation of beta-arrestins 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 50422-50430.
- Hara J, Gerashchenko D, Wisor JP, Sakurai T, Xie XM & Kilduff TS. (2009). Thyrotropin-Releasing Hormone Increases Behavioral Arousal through Modulation of Hypocretin/Orexin Neurons. *Journal of Neuroscience* **29**, 3705-3714.
- Harden TK, Hicks SN & Sondek J. (2009). Phospholipase C isozymes as effectors of Ras superfamily GTPases. *Journal of Lipid Research* **50**, S243-S248.
- Harder S, Dammann O, Buck F, Zwiers H, Lederis K, Richter D & Bruhn TO. (2001a). Cloning of two thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): Functional expression, gene structure, and evolution. *General and Comparative Endocrinology* **124**, 236-245.
- Harder S, Lu XP, Wang W, Buck F, Gershengorn MC & Bruhn TO. (2001b). Regulator of G protein signaling 4 suppresses basal and thyrotropin releasing-hormone (TRH)-stimulated signaling by two mouse TRH receptors, TRH-R-1 and TRH-R-2. *Endocrinology* **142**, 1188-1194.
- Harrison LM & He YE. (2011). Rhes and AGS1/Dexas1 Affect Signaling by Dopamine D1 Receptors Through Adenylyl Cyclase. *Journal of Neuroscience Research* **89**, 874-882.
- Harvey S. (1990). Thyrotropin-releasing-hormone - a growth hormone-releasing factor. *Journal of Endocrinology* **125**, 345-358.

- Haug TM, Hafting T & Sand O. (2004). Inhibition of BK channels contributes to the second phase of the response to TRH in clonal rat anterior pituitary cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **180**, 347-357.
- He XJ, Kuo YC, Rosche TJ & Zhang XW. (2013). Structural Basis for Autoinhibition of the Guanine Nucleotide Exchange Factor FARP2. *Structure* **21**, 355-364.
- He YJ, Yang ZG, Zhao CS, Xiao ZH, Gong Y, Li YY, Chen YQ, Du YT, Feng DY, Altman A & Li YQ. (2021). T-cell receptor (TCR) signaling promotes the assembly of RanBP2/RanGAP1-SUMO1/Ubc9 nuclear pore subcomplex via PKC-theta-mediated phosphorylation of RanGAP1. *Elife* **10**, e67123.
- Heo J, Thapar R & Campbell SL. (2005). Recognition and activation of rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**, 6573-6585.
- Hepler JR, Biddlecome GH, Kleuss C, Camp LA, Hofmann SL, Ross EM & Gilman AG. (1996). Functional importance of the amino terminus of G(q alpha). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 496-504.
- Herlitze X, Ruppertsberg JP & Mark MD. (1999). New roles for RGS2, 5 and 8 on the ratio-dependent modulation of recombinant GIRK channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology-London* **517**, 341-352.
- Hermle T, Schneider R, Schapiro D, Braun DA, van der Ven AT, Warejko JK, Daga A, Widmeier E, Nakayama M, Jobst-Schwan T, Majmundar AJ, Ashraf S, Rao J, Finn LS, Tasic V, Hernandez JD, Bagga A, Jalalah SM, El Desoky S, Kari JA, Laricchia KM, Lek M, Rehm HL, MacArthur DG, Mane S, Lifton RP, Shril S & Hildebrandt F. (2018). GAPVD1 and ANKFY1 Mutations Implicate RAB5 Regulation in Nephrotic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* **29**, 2123-2138.
- Hinkle PM, Gehret AU & Jones BW. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Frontiers in Neuroscience* **6**, 180.
- Hinkle PM & Shanshala ED. (1989). Pituitary thyrotropin-releasing-hormone (TRH) receptors - effects of TRH, drugs mimicking TRH action, and chlordiazepoxide. *Molecular Endocrinology* **3**, 1337-1344.
- Hinkle PM & Tashjian AH. (1977). Adenylyl cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterases in GH-strains of rat pituitary cells. *Endocrinology* **100**, 934-944.
- Horita A, Carino MA, Zabawska J & Lai H. (1989). TRH analog MK-771 reverses neurochemical and learning-deficits in medial septal-lesioned rats. *Peptides* **10**, 121-124.
- Hu BA, Nakata H, Gu C, de Beer T & Cooper DMF. (2002). A critical interplay between Ca²⁺ inhibition and activation by Mg²⁺ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33139-33147.
- Huang W, Osman R & Gershengorn MC. (2005). Agonist-induced conformational changes in thyrotropin-releasing hormone receptor type I: Disulfide cross-linking and molecular modeling approaches. *Biochemistry* **44**, 2419-2431.
- Huang XC, Saigusa T & Iriki M. (1992). Comparison of TRH and its analog (NS-3) in thermoregulatory and cardiovascular effects. *Peptides* **13**, 305-311.

- Humbert N, Navaratnam N, Augert A, Da Costa M, Martien S, Wang J, Martinez D, Abbadie C, Carling D, de Launoit Y, Gil J & Bernard D. (2010). Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUA1. *EMBO Journal* **29**, 376-386.
- Hutagalung AH & Novick PJ. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* **91**, 119-149.
- Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z & Dunker AK. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Research* **32**, 1037-1049.
- Ikeda SR. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255-258.
- Ilkaeva O, Kinch LN, Paulssen RH & Ross EM. (2002). Mutations in the carboxyl-terminal domain of phospholipase C-beta 1 delineate the dimer interface and a potential G alpha(q) interaction site. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4294-4300.
- Ishihara K, Katsuki H, Sugimura M & Satoh M. (1992). YM-14673, a new thyrotropin-releasing-hormone analog, augments long-term potentiation in the mossy fiber-CA3 system of guinea-pig hippocampal slices. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **15**, 75-78.
- Jantas D, Jaworska-Feil L, Lipkowski AW, Lason W. (2009) Effects of TRH and its analogues on primary cortical neuronal cell damage induced by various excitotoxic, necrotic and apoptotic agents. *Neuropeptides* **43**, 371-385.
- Jaworska-Feil L, Jantas D, Leskiewicz M, Budziszewska B, Kubera M, Basta-Kaim A, Lipkowski AW & Lason W. (2010). Protective effects of TRH and its analogues against various cytotoxic agents in retinoic acid (RA)-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuropeptides* **44**, 495-508.
- Jaworska-Feil L, Kajta M, Budziszewska B, Leskiewicz M & Lason W. (2001). Protective effects of TRH and its stable analogue, RGH-2202, on kainate-induced seizures and neurotoxicity in rodents. *Epilepsy Research* **43**, 67-73.
- Jefferson AB, Travis SM & Schulman H. (1991). Activation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein-kinase in GH3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 1484-1490.
- Jiang X, Tan J, Li JS, Kivimaa S, Yang XJ, Zhuang L, Lee PL, Chan MTW, Stanton LW, Liu ET, Cheyette BNR & Yu Q. (2008). DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* **13**, 529-541.
- Jin HK, Fedorowicz G, Yang RH, Ogasawara A, Peale F, Pham T & Paoni NF. (2004). Thyrotropin-releasing hormone is induced in the left ventricle of rats with heart failure and can provide inotropic support to the failing heart. *Circulation* **109**, 2240-2245.
- Joels LA & Drummond AH. (1989). The interaction of benzodiazepines with thyrotropin-releasing-hormone receptors on clonal pituitary-cells. *British Journal of Pharmacology* **96**, 450-456.
- Johansen PW, Paulssen RH, Bjoro T, Gautvik KM & Gordeladze JO. (2001). Distinct guanine nucleotide binding protein alpha-subunit receptor coupling in GH cell lines: Effects of bromocriptine and hormones on effector enzyme modulation. *Cellular Physiology and Biochemistry* **11**, 339-352.

- Jones BW & Hinkle PM. (2005). beta-arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 38346-38354.
- Jones BW & Hinkle PM. (2008). Arrestin binds to different phosphorylated regions of the thyrotropin-releasing hormone receptor with distinct functional consequences. *Molecular Pharmacology* **74**, 195-202.
- Jones BW, Song GJ, Greuber EK & Hinkle PM. (2007). Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12893-12906.
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L & Charli JL. (2016). Advances in TRH signaling. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **17**, 545-558.
- Jullien-Flores V, Mahe Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorkin A & Camonis JH. (2000). RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *Journal of Cell Science* **113**, 2837-2844.
- Jung HL, Yang SY, Pyo MC, Hong CO, Nam MH, Lee JW & Lee KW. (2019). Protective effects of chebulic acid from. *Food Science and Biotechnology* **28**, 555-562.
- Kadamur G & Ross EM. (2013). Mammalian Phospholipase C. *Annual Review of Physiology* **75**, 127-154.
- Kadamur G & Ross EM. (2016). Intrinsic Pleckstrin Homology (PH) Domain Motion in Phospholipase C- Exposes a G Protein Binding Site. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 11394-11406.
- Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K & Miyamoto E. (1999). Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH3 cells. *Biology of Reproduction* **61**, 319-325.
- Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T & Kyo S. (2015). Role of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing cell models. *Neuropeptides* **54**, 73-77.
- Kanda Y, Koike K, Ohmichi M, Sawada T, Hirota K & Miyake A. (1994). A possible involvement of tyrosine kinase in TRH-induced prolactin secretion in GH3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**, 1447-1452.
- Kang JH, Shi YF, Xiang B, Qu B, Su WJ, Zhu M, Zhang M, Bao GB, Wang FF, Zhang XQ, Yang RX, Fan FJ, Chen XQ, Pei G & Ma L. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: Regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* **123**, 833-847.
- Karakoula A, Tovey SC, Brighton PJ & Willars GB. (2008). Lack of receptor-selective effects of either RGS2, RGS3 or RGS4 on muscarinic M-3- and gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signalling through G alpha(q/11). *European Journal of Pharmacology* **587**, 16-24.
- Kenakin T. (2011). Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **336**, 296-302.
- Kent OA, Fox-Talbot K & Halusha MK. (2013). RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene* **32**, 2576-2585.

- Keshet Y & Seger R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. *Map Kinase Signaling Protocols, Second Edition* **661**, 3-38.
- Khoury E, Nikolajev L, Simaan M, Namkung Y & Laporte SA. (2014). Differential Regulation of Endosomal GPCR/beta-Arrestin Complexes and Trafficking by MAPK. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 23302-23317.
- Khurana C & Bedi O. (2022). Proposed hypothesis of GSK-3 beta inhibition for stimulating Wnt/beta-catenin signaling pathway which triggers liver regeneration process. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **395**, 377-380.
- Kichina JV, Goc A, Al-Husein B, Somanath PR & Kandel ES. (2010). PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **14**, 703-725.
- Kiley S, Schaap D, Parker P, Hsieh LL & Jaken S. (1990). Protein-kinase-C heterogeneity in GH4C1 RAT pituitary-cells - Characterization of a Ca-2+-independent phorbol ester receptor. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 15704-15712.
- Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D & Jaken S. (1991). Differential regulation of protein-kinase-C isozymes by thyrotropin-releasing-hormone in GH4C1 cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 23761-23768.
- Kim GD, Carr IC, Anderson LA, Zabavnik J, Eidne KA & Milligan G. (1994). The long isoform of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor down-regulates G(q) proteins. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19933-19940.
- Kim SI, Kim HJ, Han DC & Lee HB. (2000). Effect of lovastatin on small GTP binding proteins and on TGF-beta 1 and fibronectin expression. *Kidney International* **58**, S88-S92.
- Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL & Ginsberg MH. (2003). Ras GTPases: Integrins' friends or foes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 767-776.
- Kineman RD, Gettys TW & Frawley LS. (1996). Role of guanine nucleotide-binding proteins, G(i alpha 3) and G(s alpha), in dopamine and thyrotropin-releasing hormone signal transduction: Evidence for competition and commonality. *Journal of Endocrinology* **148**, 447-455.
- Kiral FR, Kohrs FE, Jin EJ & Hiesinger PR. (2018). Rab GTPases and Membrane Trafficking in Neurodegeneration. *Current Biology* **28**, R471-R486.
- Knuever J, Poeggeler B, Gaspar E, Klinger M, Hellwig-Burgel T, Hardenbicker C, Toth BI, Biro T & Paus R. (2012). Thyrotropin-Releasing Hormone Controls Mitochondrial Biology in Human Epidermis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **97**, 978-986.
- Komolov KE & Benovic JL. (2017). G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. *Cellular Signalling* **41**, 17-24.
- Koo KB, Suh HJ, Ra KS & Choi JW. (2011). Protective Effect of Cyclo(His-Pro) on Streptozotocin-Induced Cytotoxicity and Apoptosis In Vitro. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**, 218-227.
- Kovacs JJ, Hara MR, Davenport CL, Kim J & Lefkowitz RJ. (2009). Arrestin Development: Emerging Roles for beta-arrestins in Developmental Signaling Pathways. *Developmental*

Cell **17**, 443-458.

- Kroeger KM, Hanyaloglu AC, Seeber RM, Miles LEC & Eidne KA. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor - Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12736-12743.
- Kucerova L, Kubrak OI, Bengtsson JM, Strnad H, Nylin S, Theopold U & Nassel DR. (2016). Slowed aging during reproductive dormancy is reflected in genome-wide transcriptome changes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **17**, 50.
- Kuijl C, Pilli M, Alahari SK, Janssen H, Khoo PS, Ervin KE, Calero M, Jonnalagadda S, Scheller RH, Neefjes J & Junutula JR. (2013). Rac and Rab GTPases dual effector Nischarin regulates vesicle maturation to facilitate survival of intracellular bacteria. *EMBO Journal* **32**, 713-727.
- Kukimoto-Niino M, Tsuda K, Ihara K, Mishima-Tsumagari C, Honda K, Ohsawa N & Shirouzu M. (2019). Structural Basis for the Dual Substrate Specificity of DOCK7 Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Structure* **27**, 741-748.
- Kurtzeborn K, Kwon HN & Kuure S. (2019). MAPK/ERK Signaling in Regulation of Renal Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1779.
- Laakkonen LJ, Guarnieri F, Perlman JH, Gershengorn MC & Osman R. (1996). A refined model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket. Novel mixed mode Monte Carlo stochastic dynamics simulations of the complex between TRH and TRH receptor. *Biochemistry* **35**, 7651-7663.
- Ladds G, Goddard A, Hill C, Thornton S & Davey J. (2007). Differential effects of RGS proteins on G α (q) G α (11) activity. *Cellular Signalling* **19**, 103-113.
- Lai FPL, Szczodrak M, Oelkers JM, Ladwein M, Acconcia F, Benesch S, Auinger S, Faix J, Small JV, Polo S, Stradal TEB & Rottner K. (2009). Cortactin Promotes Migration and Platelet-derived Growth Factor-induced Actin Reorganization by Signaling to Rho-GTPases. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 3209-3223.
- Lai MC, Chang CM & Sun HS. (2016). Hypoxia Induces Autophagy through Translational Up-Regulation of Lysosomal Proteins in Human Colon Cancer Cells. *PLOS One* **11**, e0153627.
- Lalonde S, Weise A, Walsh RP, Ward JM & Frommer WB. (2003). Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells. *BMC Plant Biology* **3**, 8.
- Lang S, Schauble N, Cavalie A & Zimmermann R. (2011). Live Cell Calcium Imaging Combined with siRNA Mediated Gene Silencing Identifies Ca²⁺ Leak Channels in the ER Membrane and their Regulatory Mechanisms. *Jove-Journal of Visualized Experiments* **53**, e2730.
- Lartey J & Bernal AL. (2009). RHO protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction* **138**, 407-424.
- Laverriere JN, Tixiervidal A, Buisson N, Morin A, Martial JA & Gourdj D. (1988). Preferential role of calcium in the regulation of prolactin gene-transcription by thyrotropin-releasing-hormone in GH3 pituitary-cells. *Endocrinology* **122**, 333-340.
- LaVigne J, Keresztes A, Chiem D & Streicher JM. (2020). The endomorphin-1/2 and dynorphin-B

- peptides display biased agonism at the mu opioid receptor. *Pharmacological Reports* **72**, 465-471.
- Lavoie H, Sahmi M, Maisonneuve P, Marullo SA, Thevakumaran N, Jin T, Kurinov I, Sichei F & Therrien M. (2018). MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* **554**, 549-553.
- Le-Niculescu H, Niesman I, Fischer T, DeVries L & Farquhar MG. (2005). Identification and characterization of GIV, a novel G alpha(i/s)-interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 22012-22020.
- Lee G, Goretsky T, Managlia E, Dirisina R, Singh AP, Brown JB, May R, Yang GY, Ragheb JW, Evers BM, Weber CR, Turner JR, He XC, Katzman RB, Li LH & Barrett TA. (2010). Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Mediates beta-Catenin Activation in Intestinal Epithelial Stem and Progenitor Cells in Colitis. *Gastroenterology* **139**, 869-U237.
- Lee SY, Kim H, Kim K, Lee H, Lee S & Lee D. (2016). Arhgap17, a RhoGTPase activating protein, regulates mucosal and epithelial barrier function in the mouse colon. *Scientific Reports* **6**, 26923.
- Lee TW, Anderson LA, Eidne KA & Milligan G. (1995). Comparison of the signaling properties of the long and short isoforms of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor following expression in rat-1 fibroblasts. *Biochemical Journal* **310**, 291-298.
- Li PZ, Thaw CN, Sempowski GD, Gershengorn MC & Hinkle PM. (1992). Characterization of the calcium response to thyrotropin-releasing-hormone (TRH) in cells transfected with trh receptor complementary-DNA - Importance of voltage-sensitive calcium channels. *Molecular Endocrinology* **6**, 1393-1402.
- Li XX, Li ZY, Deng Y, Zhang JN, Li J & Wang YJ. (2020a). Characterization of a novel thyrotropin-releasing hormone receptor, TRHR3, in chickens. *Poultry Science* **99**, 1643-1654.
- Li YY, Shi JH, Yang J, Ge SF, Zhang JM, Jia RB & Fan XQ. (2020b). Uveal melanoma: progress in molecular biology and therapeutics. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **12**, 1758835920965852.
- Li Z, Zhao K, Lv XL, Lan YG, Hu SY, Shi JC, Guan JY, Yang YW, Lu HJ, He HB, Gao F & He WQ. (2018). Ulk1 Governs Nerve Growth Factor/TrkA Signaling by Mediating Rab5 GTPase Activation in Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus-Induced Neurodegenerative Disorders. *Journal of Virology* **92**, e00325-18.
- Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J & Callewaert N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* **5**, 4767.
- Llavero F, Arrazola Sastre A, Luque Montoro M, Martín MA, Arenas J, Lucia A & Zugaza JL. (2021). Small GTPases of the Ras superfamily and glycogen phosphorylase regulation in T cells. *Small GTPases* **12**, 106-113.
- Llavero F, Montoro ML, Sastre AA, Fernandez-Moreno D, Lacerda HM, Parada LA, Lucia A & Zugaza JL. (2019). Epidermal growth factor receptor controls glycogen phosphorylase in T cells through small GTPases of the RAS family. *Journal of Biological Chemistry* **294**,

4345-4358.

- Lober RM, Pereira MA & Lambert NA. (2006). Rapid activation of inwardly rectifying potassium channels by immobile G-protein-coupled receptors. *Journal of Neuroscience* **26**, 12602-12608.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ & Clapham DE. (1987). The beta-subunit and gamma-subunit of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**, 321-326.
- Lohr NL. (2014). Collateral Development The Quest Continues. *Circulation Research* **114**, 591-593.
- Lopez-Guerrero AM, Espinosa-Bermejo N, Sanchez-Lopez I, Macartney T, Pascual-Caro C, Orantos-Aguilera Y, Rodriguez-Ruiz L, Perez-Oliva AB, Mulero V, Pozo-Guisado E & Martin-Romero FJ. (2020). RAC1-Dependent ORA1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence. *Scientific Reports* **10**, 6580.
- Lopez-Haber C, Barrio-Real L, Casado-Medrano V & Kazanietz MG. (2016). Heregulin/ErbB3 Signaling Enhances CXCR4-Driven Rac1 Activation and Breast Cancer Cell Motility via Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha. *Molecular and Cellular Biology* **36**, 2011-2026.
- Lu L, Horstmann H, Ng C & Hong WJ. (2001). Regulation of Golgi structure and function by ARF-like protein 1 (Arl1). *Journal of Cell Science* **114**, 4543-4555.
- Lu XP, Huang W, Worthington S, Drabik P, Osman R & Gershengorn MC. (2004). A model of inverse agonist action at thyrotropin-releasing hormone receptor type 1: Role of a conserved tryptophan in helix 6. *Molecular Pharmacology* **66**, 1192-1200.
- Luo L, Luo JZ & Jackson I. (2013). Tripeptide amide L-pyroglutamyl-histidyl-L-prolineamide (L-PHP-thyrotropin-releasing hormone, TRH) promotes insulin-producing cell proliferation. *Current Aging Science* **6**, 8-13.
- Luo L, Yano N & Luo JZ. (2006). The molecular mechanism of EGF receptor activation in pancreatic beta-cells by thyrotropin-releasing hormone. *The American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* **290**, E889-899.
- Luo LG, Yano N, Mao QF, Jackson IMD & Stopa EG. (2002). Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the hippocampus of Alzheimer patients. *Journal of Alzheimers Disease* **4**, 97-103.
- Lustig KD, Conklin BR, Herzmark P, Taussig R & Bourne HR. (1993). Type-II adenylyl cyclase integrates coincident signals from Gs, Gi, and Gq. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 13900-13905.
- Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin FT, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG & Lefkowitz RJ. (1999). beta-arrestin-dependent formation of beta(2) adrenergic receptor Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL & Lefkowitz RJ. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2449-2454.

- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. (2002). *Journal of Cell Science* **115**, 455-465.
- Ma HZ, Peterson YK, Bernard ML, Lanier SM & Graber SG. (2003). Influence of cytosolic AGS3 on receptor-G protein coupling. *Biochemistry* **42**, 8085-8093.
- Madukwe JC, Garland-Kuntz EE, Lyon AM & Smrcka AV. (2018). G protein beta gamma subunits directly interact with and activate phospholipase C epsilon. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 6387-6397.
- Maiwald S, Motazacker MM, van Capelleveen JC, Sivapalaratnam S, van der Wal AC, van der Loos C, Kastelein JJP, Ouwehand WH, Hovingh GK, Trip MD, van Buul JD & Dallinga-Thie GM. (2016). A rare variant in MCF2L identified using exclusion linkage in a pedigree with premature atherosclerosis. *European Journal of Human Genetics* **24**, 86-91.
- Mamluk R, Defer N, Hanoune J & Meidan R. (1999). Molecular identification of adenylyl cyclase 3 in bovine corpus luteum and its regulation by prostaglandin F2 alpha-induced signaling pathways. *Endocrinology* **140**, 4601-4608.
- Manchanda PK, Jones GN, Lee AA, Pringle DR, Zhang M, Yu L, La Perle KMD & Kirschner LS. (2013). Rac1 is required for Prkar1a-mediated Nf2 suppression in Schwann cell tumors. *Oncogene* **32**, 3491-3499.
- Mariggio S, Garcia-Hoz C, Sarnago S, De Blasi A, Mayor F & Ribas C. (2006). Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with G alpha q. *Cellular Signalling* **18**, 2004-2012.
- Mariotti L, Pollock K & Guettler S. (2017). Regulation of Wnt/beta-catenin signalling by tankyrase-dependent poly(ADP-ribosyl) ation and scaffolding. *British Journal of Pharmacology* **174**, 4611-4636.
- Marjamaki A, Sato M, BouetAlard R, Yang Q, LimonBoulez I, Legrand C & Lanier SM. (1997). Factors determining the specificity of signal transduction by guanine nucleotide-binding protein-coupled receptors - Integration of stimulatory and inhibitory input to the effector adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 16466-16473.
- Markova V, Hejnova L, Benda A, Novotny J & Melkes B. (2021). beta-Arrestin 1 and 2 similarly influence mu-opioid receptor mobility and distinctly modulate adenylyl cyclase activity. *Cellular Signalling* **87**, 110124.
- Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C & McCubrey JA. (2010). The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/ akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cell biology. *Cancers (Basel)* **2**, 1576-1596.
- Martin TFJ, Lewis JE & Kowalchuk JA. (1991). Phospholipase C-beta-1 is regulated by a pertussis toxin-insensitive G-protein. *Biochemical Journal* **280**, 753-760.
- Martinez-Cue C & Rueda N. (2020). Signalling Pathways Implicated in Alzheimer ' s Disease Neurodegeneration in Individuals with and without Down Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 6906.
- Masada N, Schaks S, Jackson SE, Sinz A & Cooper DMF. (2012). Distinct Mechanisms of Calmodulin Binding and Regulation of Adenylyl Cyclases 1 and 8. *Biochemistry* **51**, 7917-7929.

- Masaki T. (2012). Polarization and myelination in myelinating glia. *ISRN Neurology* **2012**, 769412.
- Matsui K, Wada K & Kwak S. (1994). Ataxia-ameliorating effects of YM-14673, a potent analog of thyrotropin-releasing-hormone, in ataxic mutant mice. *European Journal of Pharmacology* **254**, 295-297.
- Matsui T & Fukuda M. (2013). Rab12 regulates mTORC1 activity and autophagy through controlling the degradation of amino-acid transporter PAT4. *EMBO Reports* **14**, 450-457.
- Mattson MP. (2006). Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**, 1997-2006.
- Mazurkiewicz JE, Herrick-Davis K, Barroso M, Ulloa-Aguirre A, Lindau-Shepard B, Thomas RM & Dias JA. (2015). Single-Molecule Analyses of Fully Functional Fluorescent Protein-Tagged Follitropin Receptor Reveal Homodimerization and Specific Heterodimerization with Lutropin Receptor. *Biology of Reproduction* **92**, 100.
- McIntosh TK, Fernyak S, Hayes RL & Faden AI. (1993). Beneficial effect of the nonselective opiate antagonist naloxone hydrochloride and the thyrotropin-releasing-hormone (TRH) analog YM-14673 on long-term neurobehavioral outcome following experimental brain injury in the rat. *Journal of Neurotrauma* **10**, 373-384.
- Melkes B, Hejnova L & Novotny J. (2016). Biased mu-opioid receptor agonists diversely regulate lateral mobility and functional coupling of the receptor to its cognate G proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **389**, 1289-1300.
- Meng ZP, Moroishi T & Guan KL. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development* **30**, 1-17.
- Mertens AE, Roovers RC & Collard JG. (2003). Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Letters* **546**, 11-16.
- Meyer E & Fromherz P. (1999). Ca²⁺ activation of hSlo K⁺ channel is suppressed by N-terminal GFP tag. *European Journal of Neuroscience* **11**, 1105-1108.
- Miao RJ, Lu Y, Xing XW, Li Y, Huang ZJ, Zhong H, Huang Y, Chen AF, Tang XH, Li HL, Cai JJ & Yuan H. (2016). Regulator of G-Protein Signaling 10 Negatively Regulates Cardiac Remodeling by Blocking Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 1/2 Signaling. *Hypertension* **67**, 86-98.
- Mihaylova MM & Shaw RJ. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology* **13**, 1016-1023.
- Milligan G & Kostenis E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147**, S46-S55.
- Miranda P, Giraldez T, de la Pena P, Manso DG, Alonso-Ron C, Gomez-Varela D, Dominguez P & Barros F. (2005). Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins for regulation of ERG K⁺ channels in GH(3) rat anterior pituitary cells. *Journal of Physiology-London* **566**, 717-736.
- Miyamori C, Kato T, Imura E, Murata A, Sato T, Sakura N & Hashimoto T. (1988). Long-term effects of thyrotropin-releasing-hormone and histidyl-proline diketopiperazine on the maturation of homeothermia and mitochondrial enzyme-activities in neonatal rats. *Acta Endocrinologica* **119**, 575-581.

- Miyamoto Y, Yamauchi J, Sanbe A & Tanoue A. (2007). Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Experimental Cell Research* **313**, 791-804.
- Molchan SE, Mellow AM, Lawlor BA, Weingartner HJ, Cohen RM, Cohen MR & Sunderland T. (1990). TRH attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology* **100**, 84-89.
- Monetta P, Slavin F, Romero N & Alvarez C. (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARR dynamics and COPI association. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2400-2410.
- Monga V, Meena CL, Kaur N & Jain R. (2008). Chemistry and Biology of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) and its Analogs. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 2718-2733.
- Moniz S & Jordan P. (2010). Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 1265-1276.
- Morgan NE, Cutrona MB & Simpson JC. (2019). Multitasking Rab Proteins in Autophagy and Membrane Trafficking: A Focus on Rab33b. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3916.
- Mork HK, Haug TM & Sand O. (2005). Contribution of different Ca²⁺-activated K⁺ channels to the first phase of the response to TRH in clonal rat anterior pituitary cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **184**, 141-150.
- Mulla CM, Geras-Raaka E, Raaka BM & Gershengorn MC. (2009). High Levels of Thyrotropin-Releasing Hormone Receptors Activate Programmed Cell Death in Human Pancreatic Precursors. *Pancreas* **38**, 197-202.
- Muller PM, Rademacher J, Bagshaw RD, Wortmann C, Barth C, van Unen J, Alp KM, Giudice G, Eccles RL, Heinrich LE, Pascual-Vargas P, Sanchez-Castro M, Brandenburg L, Mbamalu G, Tucholska M, Spatt L, Czajkowski MT, Welke RW, Zhang SQ, Nguyen V, Rustemi T, Trnka P, Freitag K, Larsen B, Popp O, Mertins P, Gingras AC, Roth FP, Colwill K, Bakal C, Pertz O, Pawson T, Petsalaki E & Rocks O. (2020). Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nature Cell Biology* **22**, 498-511.
- Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu XA, Tokumitsu H, Inuzuka H, Wong NCW, Shupnik MA, Kobayashi R & Ishida T. (2004). Role of calcium-calmodulin-dependent protein kinase cascade in thyrotropin (TSH)-releasing hormone induction of TSH and prolactin gene expression. *Endocrinology* **145**, 4846-4852.
- Murayama M, Tanaka S, Palacino J, Murayama O, Honda T, Sun XY, Yasutake K, Nihonmatsu N, Wolozin B & Takashima A. (1998). Direct association of presenilin-1 with beta-catenin. *FEBS Letters* **433**, 73-77.
- Nacke M, Sandilands E, Nikolatou K, Roman-Fernandez A, Mason S, Patel R, Lilla S, Yelland T, Galbraith LCA, Freckmann EC, McGarry L, Morton JP, Shanks E, Leung HY, Markert E, Ismail S, Zanivan S, Blyth K & Bryant DM. (2021). An ARF GTPase module promoting invasion and metastasis through regulating phosphoinositide metabolism. *Nature Communications* **12**, 1623.
- Nakano A & Muramatsu M. (1989). A novel GTP-binding protein, SAR1P, is involved in transport from the endoplasmic-reticulum to the golgi-apparatus. *Journal of Cell Biology* **109**, 2677-

2691.

- Namba T, Funahashi Y, Nakamuta S, Xu C, Takano T & Kaibuchi K. (2015). Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. *Physiological Reviews* **95**, 995-1024.
- Nassari S, Del Olmo T & Jean S. (2020). Rabs in Signaling and Embryonic Development. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1064.
- Navaratnarajah P, Gershenson A & Ross EM. (2017). The binding of activated G alpha(q) to phospholipase C-beta exhibits anomalous affinity. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 16788-16801.
- Neitzel KL & Hepler JR. (2006). Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**, 383-389.
- Nelson EJ, Hinkle PM. (1994a). Characteristics of the Ca²⁺ spike and oscillations induced by different doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in individual pituitary cells and nonexcitable cells transfected with TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* **135**, 1084-1092.
- Nelson EJ, Hinkle PM. (1994b). Thyrotropin-releasing hormone activates Ca²⁺ efflux. Evidence suggesting that a plasma membrane Ca²⁺ pump is an effector for a G-protein-coupled Ca(2+)-mobilizing receptor. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 30854-30860.
- Nelson EJ, Hellevuo K, Yoshimura M & Tabakoff B. (2003). Ethanol-induced phosphorylation and potentiation of the activity of type 7 adenylyl cyclase - Involvement of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 4552-4560.
- Nemet I, Saha PP, Gupta N, Zhu WF, Romano KA, Skye SM, Cajka T, Mohan ML, Li L, Wu YP, Funabashi M, Ramer-Tait AE, Prasad SVN, Fiehn O, Rey FE, Tang WHW, Fischbach MA, DiDonato JA & Hazen SL. (2020). A Cardiovascular Disease-Linked Gut Microbial Metabolite Acts via Adrenergic Receptors. *Cell* **180**, 862-877.
- Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, Hoflack B & Zerial M. (2000). Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *Journal of Cell Biology* **151**, 601-612.
- Nishimura A, Okamoto M, Sugawara Y, Mizuno N, Yamauchi J & Itoh H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes to Cells* **11**, 487-498.
- Nishino S, Arrigoni J, Shelton J, Kanbayashi T, Dement WC & Mignot E. (1997). Effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogs on daytime sleepiness and cataplexy in canine narcolepsy. *Journal of Neuroscience* **17**, 6401-6408.
- Nobes CD & Hall A. (1995). RHO, RAC and CDC42 GTPases - regulators of actin structures, cell-adhesion and motility. *Biochemical Society Transactions* **23**, 456-459.
- Nola S, Sebbagh M, Marchetto S, Osmani N, Nourry C, Audebert S, Navarro C, Rachel R, Montcouquiol M, Sans N, Etienne-Manneville S, Borg JP & Santoni MJ. (2008). Scrib regulates PAK activity during the cell migration process. *Human Molecular Genetics* **17**, 3552-3565.

- Novotny J, Krusek J, Drmota T & Svoboda P. (1999). Overexpression of the G protein G(11)alpha prevents desensitization of Ca²⁺ response to thyrotropin-releasing hormone. *Life Sciences* **65**, 889-900.
- Nowakowski BE, Okimura Y & Maurer RA. (1997). Characterization of DNA regions mediating the ability of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II to stimulate prolactin promoter activity. *Molecular and Cellular Endocrinology* **132**, 109-116.
- Nuche-Berenguer B, Ramos-Alvarez I & Jensen RT. (2016). The p21-activated kinase, PAK2, is important in the activation of numerous pancreatic acinar cell signaling cascades and in the onset of early pancreatitis events. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1862**, 1122-1136.
- Nussenzveig DR, Heinfliink M & Gershengorn MC. (1993a). Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing-hormone receptor is dependent on 2 domains in the receptor carboxyl terminus. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 2389-2392.
- Nussenzveig DR, Heinfliink M & Gershengorn MC. (1993b). Decreased levels of internalized thyrotropin-releasing-hormone receptors after uncoupling from guanine-nucleotide-binding protein and phospholipase-C. *Molecular Endocrinology* **7**, 1105-1111.
- O'Dowd BF, Lee DK, Huang W, Nguyen T, Cheng RG, Liu Y, Wang B, Gershengorn MC & George SR. (2000). TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology* **14**, 183-193.
- Offenhauser N, Borgonovo A, Disanza A, Romano P, Ponzanelli I, Iannolo G, Di Fiore PP & Scita G. (2004). The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 91-98.
- Offermanns S, Schultz G & Rosenthal W. (1989). Secretion-stimulating and secretion-inhibiting hormones stimulate high-affinity pertussis-toxin-sensitive GTPases in membranes of a pituitary cell-line. *European Journal of Biochemistry* **180**, 283-287.
- Ogasawara T, Itoh Y, Tamura M, Ukai Y, Yoshikuni Y & Kimura K. (1996). NS-3, a TRH-Analog, reverses memory disruption by stimulating cholinergic and noradrenergic systems. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **53**, 391-399.
- Ogasawara T, Ukai Y, Tamura M & Kimura K. (1995). NS-3 (CG3703), an analog of thyrotropin-releasing-hormone, ameliorates cognitive impairment in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **50**, 499-503.
- Ogawa N, Mizuno S, Mori A, Nukina I, Ota Z & Yamamoto M. (1984). Potential anti-depressive effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) and its analogs. *Peptides* **5**, 743-746.
- Ohbu S, Yoshioka N, Honda M, Andoh Y, Sato Y, Takao N, Fukuda H & Wakayama Y. (1995). TRH stimulation test in healthy elderly - paradoxical response of growth-hormone is abnormal in normal aging. *Internal Medicine* **34**, 148-152.
- Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto T, Zhang ZX, Hirota K & Miyake A. (1994a). Dopamine inhibits TRH-induced MAP kinase activation in dispersed rat anterior-pituitary-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 642-648.
- Ohmichi M, Sawada T, Kanda Y, Koike K, Hirota K, Miyake A & Saltiel AR. (1994b).

- Thyrotropin-releasing-hormone stimulates MAP kinase-activity in GH3 cells by divergent pathways - evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 3783-3788.
- Oka M, Itoh Y, Ukai Y, Yoshikuni Y & Kimura K. (1996). Protein kinases are involved in prolonged acetylcholine release from rat hippocampus induced by thyrotropin-releasing hormone analogue NS-3. *Journal of Neurochemistry* **66**, 1889-1893.
- Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y & Akiyama T. (2003). RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 9920-9927.
- Okada M. (1991). Effects of a new thyrotropin-releasing-hormone analog, YM-14673, on the *in vivo* release of acetylcholine as measured by intracerebral dialysis in rats. *Journal of Neurochemistry* **56**, 1544-1547.
- Okada T, Ernst OP, Palczewski K & Hofmann KP. (2001). Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 318-324.
- Oride A, Kanasaki H, Mutiara S, Purwana IN & Miyazaki K. (2008). Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) by perifused thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulation in rat pituitary GH3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **296**, 78-86.
- Ostasov P, Krusek J, Durchankova D, Svoboda P & Novotny J. (2008). Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G(11)alpha protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochemistry and Function* **26**, 264-274.
- Ostrom RS, Naugle JE, Hase M, Gregorian C, Swaney JS, Insel PA, Brunton LL & Meszaros JG. (2003). Angiotensin II enhances adenylyl cyclase signaling via Ca²⁺/calmodulin - G(q-)G(s) cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 24461-24468.
- Palomero T, Barros F, del Camino D, Vilorio CG & de la Pena P. (1998). A G protein beta gamma dimer-mediated pathway contributes to mitogen-activated protein kinase activation by thyrotropin-releasing hormone receptors in transfected COS-7 cells. *Molecular Pharmacology* **53**, 613-622.
- Pan Q, Qiao F, Gao C, Norman B, Optican L & Zelenka PS. (2011). Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75). *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 3425-3436.
- Paradis JS, Ly S, Blondel-Tepaz E, Galan JA, Beaufrais A, Scott MGH, Enslin H, Marullo S, Roux PP & Bouvier M. (2015). Receptor sequestration in response to beta-arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E5160-E5168.
- Park YG, Zhao XH, Lesueur F, Lowy DR, Lancaster M, Pharoah P, Qian XL & Hunter KW. (2005). Sip1 is a candidate for underlying the metastasis efficiency modifier locus Mtes1. *Nature Genetics* **37**, 1055-1062.
- Parnetti L, Ambrosoli L, Abate G, Azzini C, Balestreri R, Bartorelli L, Bordin A, Crepaldi G,

- Cristianini G, Cucinotta D, Cuzzupoli M, Decandia O, Fabris F, Maggioni M, Scarpa R, Villardita C, Girardello R, Poli A & Senin U. (1995). Posatirelin for the treatment of late-onset alzheimers-disease - a double-blind multicenter study vs citicoline and ascorbic-acid. *Acta Neurologica Scandinavica* **92**, 135-140.
- Parnetti L, Ambrosoli L, Agliati G, Caratozzolo P, Fossati L, Frattola L, Martucci N, Murri L, Nappi G, Puca FM, Poli A, Girardello R & Senin U. (1996). Posatirelin in the treatment of vascular dementia: A double-blind multicentre study vs placebo. *Acta Neurologica Scandinavica* **93**, 456-463.
- Pasqualato S, Renault L & Cherfils J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Reports* **3**, 1035-1041.
- Paulssen EJ, Paulssen RH, Gautvik KM & Gordeladze JO. (1992a). Cross-talk between phospholipase-c and adenylyl cyclase involves regulation of G-protein levels in GH3 rat pituitary-cells. *Cellular Signalling* **4**, 747-755.
- Paulssen EJ, Paulssen RH, Gautvik KM & Gordeladze JO. (1992b). Hypothalamic hormones modulate-G protein-levels and 2nd messenger responsiveness in GH3 rat pituitary-tumor cells. *Biochemical Pharmacology* **44**, 471-477.
- Paulssen RH, Paulssen EJ, Gautvik KM & Gordeladze JO. (1992c). The thyroliberin receptor interacts directly with a stimulatory guanine-nucleotide-binding protein in the activation of adenylyl cyclase in GH3 rat pituitary-tumor cells - evidence obtained by the use of antisense RNA inhibition and immunoblocking of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein. *European Journal of Biochemistry* **204**, 413-418.
- Pedraza N, Cemeli T, Monserrat MV, Garí E & Ferrezuelo F. (2019). Regulation of small GTPase activity by G1 cyclins. *Small GTPases* **10**, 47-53.
- Perlman JH, Colson AO, Jain R, Czyzewski B, Cohen LA, Osman R & Gershengorn MC. (1997a). Role of the extracellular loops of the thyrotropin-releasing hormone receptor: Evidence for an initial interaction with thyrotropin-releasing hormone. *Biochemistry* **36**, 15670-15676.
- Perlman JH, Colson AO, Wang W, Bence K, Osman R & Gershengorn MC. (1997b). Interactions between conserved residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 11937-11942.
- Perlman JH, Laakkonen L, Osman R & Gershengorn MC. (1994a). A model of the thyrotropin-releasing-hormone (TRH) receptor-binding pocket - evidence for a 2nd direct interaction between transmembrane helix-3 and TRH. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23383-23386.
- Perlman JH, Laakkonen LJ, Guarnieri F, Osman R & Gershengorn MC. (1996). A refined model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket. Experimental analysis and energy minimization of the complex between TRH and TRH receptor. *Biochemistry* **35**, 7643-7650.
- Perlman JH, Thaw CN, Laakkonen L, Bowers CY, Osman R & Gershengorn MC. (1994b). Hydrogen-bonding interaction of thyrotropin-releasing-hormone (TRH) with transmembrane tyrosine-106 of the trh receptor. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1610-1613.
- Perlman JH, Wang W, Nussenzveig DR & Gershengorn MC. (1995). A disulfide bond between

- conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing-hormone receptor is critical for binding. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 24682-24685.
- Personnic N, Lakisic G, Gouin E, Rousseau A, Gautreau A, Cossart P & Bierne H. (2014). A role for Ral GTPase-activating protein subunit beta in mitotic regulation. *FEBS Journal* **281**, 2977-2989.
- Pesanova Z, Novotny J, Cerny J, Milligan G & Svoboda P. (1999). Thyrotropin-releasing hormone-induced depletion of G(q)alpha/G(11)alpha proteins from detergent-insensitive membrane domains. *FEBS Letters* **464**, 35-40.
- Peterson YK & Luttrell LM. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacological Reviews* **69**, 256-297.
- Petrou C, Chen LC & Tashjian AH. (1997). A receptor-G protein coupling-independent step in the internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2326-2333.
- Petrou C & Tashjian AH. (1998). The thyrotropin-releasing hormone-receptor complex and G(11 alpha) are both internalised into clathrin-coated vesicles. *Cellular Signalling* **10**, 553-559.
- Pfeffer SR. (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Molecular Biology of the Cell* **28**, 712-715.
- Philip JL, Razzaque MA, Han M, Li J, Theccanat T, Xu X & Akhter SA. (2015). Regulation of mitochondrial oxidative stress by β -arrestins in cultured human cardiac fibroblasts. *Disease Models & Mechanisms* **8**, 1579-1589.
- Piccini A, Castroflorio E, Valente P, Guarnieri FC, Aprile D, Michetti C, Bramini M, Giansante G, Pinto B, Savardi A, Cesca F, Bachi A, Cattaneo A, Wren JD, Fassio A, Valtorta F, Benfenati F & Giovedi S. (2017). APACHE Is an AP2-Interacting Protein Involved in Synaptic Vesicle Trafficking and Neuronal Development. *Cell Reports* **21**, 3596-3611.
- Pickett CA, Manning N, Akita Y & Gutierrez-Hartmann A. (2002). Role of specific protein kinase C isozymes in mediating epidermal growth factor, thyrotropin-releasing hormone, and phorbol ester regulation of the rat prolactin promoter in GH4/GH4C1 pituitary cells. *Molecular Endocrinology* **16**, 2840-2852.
- Pitts LH, Ross A, Chase GA & Faden AI. (1995). Treatment with thyrotropin-releasing-hormone (TRH) in patients with traumatic spinal-cord injuries. *Journal of Neurotrauma* **12**, 235-243.
- Puniak MA, Freeman GM, Agresta CA, Van Newkirk L, Barone CA & Salzman SK. (1991). Comparison of a Serotonin Antagonist, Opioid Antagonist, and TRH Analog for the Acute Treatment of Experimental Spinal Trauma. *Journal of Neurotrauma* **8**, 193-203.
- Radha V, Mitra A, Dayma K & Sasikumar K. (2011). Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor. *Bioscience Reports* **31**, 231-244.
- Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R & Zabihollahi R. (2018). Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratislava Medical Journal-Bratislavske Lekarske Listy* **119**, 701-705.
- Rajput SK, Krishnamoorthy S, Pawar C, Kaur N, Monga V, Meena CL, Jain R & Sharma SS. (2009). Antiepileptic potential and behavioral profile of L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-

- ProNH(2), a newer thyrotropin-releasing hormone analog. *Epilepsy & Behavior* **14**, 48-53.
- Rajput SK, Siddiqui MA, Kumar V, Meena CL, Pant AB, Jain R & Sharma SS. (2011). Protective effects of L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-ProNH(2), a newer thyrotropin releasing hormone analog in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Peptides* **32**, 1225-1231.
- Rangamani P, Levy MG, Khan S & Oster G. (2016). Paradoxical signaling regulates structural plasticity in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E5298-E5307.
- Rapsomaniki MA, Kotsantis P, Symeonidou IE, Giakoumakis NN, Taraviras S & Lygerou Z. (2012). easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics* **28**, 1800-1801.
- Reboldi G, Parnetti L, Santeusano F, Ambrosoli L, Palumbo B, Cherubini A, Girardello R, Poli A, Lowenthal DT & Senin U. (1996). Pharmacokinetic profile and endocrine effects of posatirelin treatment in healthy elderly subjects. *Journal of Clinical Pharmacology* **36**, 823-831.
- Richnau N & Aspenstrom P. (2001). RICH, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35060-35070.
- Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K & Honing S. (2002). Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *Journal of Cell Biology* **156**, 791-795.
- Robinson MS & Bonifacino JS. (2001). Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 444-453.
- Romano D, Magalon K, Ciampini A, Talet C, Enjalbert A & Gerard C. (2003). Differential involvement of the Ras and Rap1 small GTPases in vasoactive intestinal and pituitary adenylyl cyclase activating polypeptides control of the prolactin gene. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51386-51394.
- Rosano L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, Salvati E, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A. (2009). beta-Arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2806-2811.
- Rosano L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Spadaro F, Salvati E, Biroccio AM, Natali PG & Bagnato A. (2013). beta-arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced beta-catenin signaling. *Oncogene* **32**, 5066-5077.
- Rosethorne EM, Nahorski SR & Challiss RAJ. (2008). Regulation of cyclic AMP response-element binding-protein (CREB) by G(q/11)-protein-coupled receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* **75**, 942-955.
- Sah N, Rajput SK, Singh JN, Meena CL, Jain R, Sikdar SK & Sharma SS. (2011). L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-ProNH2 attenuates 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and sodium current: a possible action of new thyrotropin-releasing hormone analog for its anticonvulsant potential. *Neuroscience* **199**, 74-85.
- Saitoh O, Kubo Y, Odagiri M, Ichikawa M, Yamagata K & Sekine T. (1999). RGS7 and RGS8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Journal of*

Biological Chemistry **274**, 9899-9904.

- Salim S, Sinnarajah S, Kehrl JH & Dessauer CW. (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 15842-15849.
- Sallese M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L & De Blasi A. (2000). Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: Direct interaction of kinase N terminus with activated G alpha q. *Molecular Pharmacology* **57**, 826-831.
- Sanchez AMJ, Candau RB, Csibi A, Pagano AF, Raibon A & Bernardi H. (2012). The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **303**, C475-C485.
- Sanchez-Fernandez G, Cabezudo S, Garcia-Hoz C, Tobin AB, Mayor F & Ribas C. (2013). ERK5 Activation by Gq-Coupled Muscarinic Receptors Is Independent of Receptor Internalization and beta-Arrestin Recruitment. *PLoS One* **8**, e84174.
- Sanders SS, De Simone FI & Thomas GM. (2019). mTORC1 Signaling Is Palmitoylation-Dependent in Hippocampal Neurons and Non-neuronal Cells and Involves Dynamic Palmitoylation of LAMTOR1 and mTOR. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **13**, 115.
- Sanz-Garcia M, Lopez-Sanchez I & Lazo PA. (2008). Proteomics Identification of Nuclear Ran GTPase as an Inhibitor of Human VRK1 and VRK2 (Vaccinia-related Kinase) Activities. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 2199-2214.
- Saroz Y, Kho DT, Glass M, Graham ES & Grimsey NL. (2019). Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *Acs Pharmacology & Translational Science* **2**, 414-428.
- Sastre-Perona A, Riesco-Eizaguirre G, Zaballos MA & Santisteban P. (2016). beta-catenin signaling is required for RAS-driven thyroid cancer through PI3K activation. *Oncotarget* **7**, 49435-49449.
- Sato M, Cismowski MJ, Toyota E, Smrcka AV, Lucchesi PA, Chilian WM & Lanier SM. (2006). Identification of a receptor-independent activator of G protein signaling (AGS8) in ischemic heart and its interaction with G beta gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 797-802.
- Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai YZ, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM & Ishikawa Y. (2011). Identification of Transcription Factor E3 (TFE3) as a Receptor-independent Activator of G alpha(16) gene regulation by nuclear G alpha subunit and its activator. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 17766-17776.
- Schaaf MJM & Cidlowski JA. (2003). Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: The importance of ligand affinity. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1922-1934.
- Schioth HB & Fredriksson R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology* **142**, 94-101.
- Schlessinger K, Hall A & Tolwinski N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes & Development* **23**, 265-277.
- Schoneborn H, Raudzus F, Coppey M, Neumann S & Heumann R. (2018). Perspectives of RAS

- and RHEB GTPase Signaling Pathways in Regenerating Brain Neurons. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 4052.
- Schoppe J, Schubert E, Apelbaum A, Yavavli E, Birkholz O, Stephanowitz H, Han YP, Perz A, Hofnagel O, Liu F, Piehler J, Raunser S & Ungermann C. (2021). Flexible open conformation of the AP-3 complex explains its role in cargo recruitment at the Golgi. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 101334.
- Schulte G & Shenoy SK. (2011). beta-Arrestin and dishevelled coordinate biased signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 19839-19840.
- Schultess J, Danielewski O & Smolenski AP. (2005). Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood* **105**, 3185-3192.
- Schürmann B, Bermingham DP, Kopeikina KJ, Myczek K, Yoon S, Horan KE, Kelly CJ, Martinde-Saavedra MD, Forrest MP, Fawcett-Patel JM, Smith KR, Gao R, Bach A, Burette AC, Rappoport JZ, Weinberg RJ, Martina M & Penzes P. (2020). A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Molecular Psychiatry* **25**, 2000-2016.
- Sengupta P, Philip F & Scarlata S. (2008). Caveolin-1 alters Ca²⁺ signal duration through specific interaction with the G alpha(q) family of G proteins. *Journal of Cell Science* **121**, 1363-1372.
- Sequera C, Manzano S, Guerrero C & Porras A. (2018). How Rap and its GEFs control liver physiology and cancer development. C3G alterations in human hepatocarcinoma. *Hepatic Oncology* **5**, HEP05.
- Shen JX & Cooper DMF. (2013). AKAP79, PKC, PKA and PDE4 participate in a G(q)-linked muscarinic receptor and adenylate cyclase 2 cAMP signalling complex. *Biochemical Journal* **455**, 47-56.
- Shen JX, Wachten S, Halls ML, Everett KL & Cooper DMF. (2012). Muscarinic receptors stimulate AC2 by novel phosphorylation sites, whereas G beta gamma subunits exert opposing effects depending on the G-protein source. *Biochemical Journal* **447**, 393-405.
- Shimizu A, Mammoto A, Italiano JE, Pravda E, Dudley AC, Ingber DE & Klagsbrun M. (2008). ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 27230-27238.
- Singer AU, Waldo GL, Harden TK & Sondek J. (2002). A unique fold of phospholipase C-beta mediates dimerization and interaction with G alpha q. *Nature Structural Biology* **9**, 32-36.
- Skrabalova J, Karlovska I, Hejnova L & Novotny J. (2018). Protective Effect of Morphine Against the Oxidant-Induced Injury in H9c2 Cells. *Cardiovascular Toxicology* **18**, 374-385.
- Smith J, Yu R & Hinkle PM. (2001). Activation of MAPK by TRH requires clathrin-dependent endocytosis and PKC but not receptor interaction with beta-arrestin or receptor endocytosis. *Molecular Endocrinology* **15**, 1539-1548.
- Smith JS, Nicholson LT, Suwanpradid J, Glenn RA, Knape NM, Alagesan P, Gundry JN, Wehrman TS, Atwater AR, Gunn MD, MacLeod AS & Rajagopal S. (2018). Biased agonists of the chemokine receptor CXCR3 differentially control chemotaxis and inflammation. *Science*

Signaling **11**, eaaq1075.

- Smolen GA, Schott BJ, Stewart RA, Diederichs S, Muir B, Provencher HL, Look AT, Sgroi DC, Peterson RT & Haber DA. (2007). A Rap GTPase interactor, RADIL, mediates migration of neural crest precursors. *Genes & Development* **21**, 2131-2136.
- Song GJ & Hinkle PM. (2005). Regulated dimerization of the thyrotropin releasing hormone receptor affects receptor trafficking but not signaling. *Molecular Endocrinology* **19**, 2859-2870.
- Song GJ, Jones BW & Hinkle PM. (2007). Dimerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor potentiates hormone-dependent receptor phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18303-18308.
- Song Q, Ji Q & Li Q. (2018). The role and mechanism of beta-arrestins in cancer invasion and metastasis. *International Journal of Molecular Medicine* **41**, 631-639.
- Spearman P. (2018). Viral interactions with host cell Rab GTPases. *Small GTPases* **9**, 192-201.
- Spencer JPE. (2007). The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes and Nutrition* **2**, 257-273.
- Steinberg GR & Carling D. (2019). AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 527-551.
- Steiner D, Saya D, Schallmach E, Simonds WF & Vogel Z. (2006). Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G(beta gamma) subunits. *Cellular Signalling* **18**, 62-68.
- Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW & Mancini MA. (2001). FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nature Cell Biology* **3**, 15-23.
- Sterne-Marr R, Tesmer JJG, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JAE, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL & Wedegaertner PB. (2003). G protein-coupled receptor kinase 2/G alpha(q/11) interaction - A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6050-6058.
- Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC. (1990). Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9514-8.
- Strungs EG, Luttrell LM. (2014). Arrestin-dependent activation of ERK and Src family kinases. *Handbook of Experimental Pharmacology* **219**, 225-257.
- Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang TH, Chu KT, Bokoch GM & Hahn KM. (2000). Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9725-9733.
- Sun YH, Zupan B, Raaka BM, Toth M & Gershengorn MC. (2009). TRH-Receptor-Type-2-Deficient Mice are Euthyroid and Exhibit Increased Depression and Reduced Anxiety Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1601-1608.
- Sureban SM, May R, Qu DF, Weygant N, Chandrakesan P, Ali N, Lightfoot SA, Pantazis P, Rao CV, Postier RG & Houchen CW. (2013). DCLK1 Regulates Pluripotency and Angiogenic Factors via microRNA-Dependent Mechanisms in Pancreatic Cancer. *PLOS One* **8**,

e73940.

- Svoboda P, Kim GD, Grassie MA, Eidne KA & Milligan G. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of G(11 alpha): Analysis of agonist regulation of coexpressed G(11 alpha) species variants. *Molecular Pharmacology* **49**, 646-655.
- Swerdlow RH. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging* **2**, 347-359.
- Szabo M, Stachura ME, Paleologos N, Bybee DE & Frohman LA. (1984). Thyrotropin-releasing-hormone stimulates growth-hormone release from the anterior-pituitary of hypothyroid rats invitro. *Endocrinology* **114**, 1344-1351.
- Sztul E, Chen PW, Casanova JE, Cherfils J, Decks JB, Lambright DG, Lee FJS, Randazzo PA, Santy LC, Schurmann A, Wilhelmi I, Yohe ME & Kahn RA. (2019). ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges. *Molecular Biology of the Cell* **30**, 1249-1271.
- Takahashi T, Minami S, Tsuchiya Y, Tajima K, Sakai N, Suga K, Hisanaga S, Ohbayashi N, Fukuda M & Kawahara H. (2019). Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6. *EMBO Reports* **20**, e46794.
- Takesono A, Cismowski MJ, Ribas C, Bernard M, Chung P, Hazard S, Duzic E & Lanier SM. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 33202-33205.
- Tall GG, Krumins AM & Gilman AG. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G alpha protein guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8356-8362.
- Tan X, Jiao PL, Sun JC, Wang W, Ye P, Wang YK, Leng YQ & Wang WZ. (2021). β -Arrestin1 Reduces Oxidative Stress via Nrf2 Activation in the Rostral Ventrolateral Medulla in Hypertension. *Frontiers in Neuroscience* **15**, 657825.
- Tang T, Gao MH, Lai NC, Firth AL, Takahashi T, Guo T, Yuan JXJ, Roth DM & Hammond HK. (2008). Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation* **117**, 61-69.
- Tang WJ & Gilman AG. (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G-protein beta-gamma-subunits. *Science* **254**, 1500-1503.
- Tashjian AH, Barowsky NJ & Jensen DK. (1971). Thyrotropin releasing hormone - direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43**, 516-523.
- Taussig R & Gilman AG. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 1-4.
- Thirunarayanan N, Nir EA, Raaka BM & Gershengorn MC. (2013). Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Type 1 (TRH-R1), not TRH-R2, Primarily Mediates Taltirelin Actions in the CNS of Mice. *Neuropsychopharmacology* **38**, 950-956.
- Thirunarayanan N, Raaka BM & Gershengorn MC. (2012). Taltirelin is a superagonist at the human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* **3**, 120.

- Tobon AL, Suresh M, Jin J, Vitriolo A, Pietralla T, Tedford K, Bossenz M, Mahnken K, Kiefer F, Testa G, Fischer KD & Puschel AW. (2018). The guanine nucleotide exchange factor Arhgef7/beta Pix promotes axon formation upstream of TC10. *Scientific Reports* **8**, 8811.
- Tolias KF, Duman JG & Um K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Progress in Neurobiology* **94**, 133-148.
- Traub LM. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 583-596.
- Trinquet E, Fink M, Bazin H, Grillet F, Maurin F, Bourrier E, Ansanay H, Leroy C, Michaud A, Durroux T, Maurel D, Malhaire F, Goudet C, Pin JP, Naval M, Hernout O, Chretien F, Chapleur Y & Mathis G. (2006). D-myo-inositol 1-phosphate as a surrogate of D-myo-inositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation. *Analytical Biochemistry* **358**, 126-135.
- Tsu RC & Wong YH. (1996). G(i)-mediated stimulation of type II adenylyl cyclase is augmented by G(q)-coupled receptor activation and phorbol ester treatment. *Journal of Neuroscience* **16**, 1317-1323.
- Vallentin A, Lo TC & Joubert D. (2001). A single point mutation in the V3 region affects protein kinase C alpha targeting and accumulation at cell-cell contacts. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3351-3363.
- Vargas MA, Cisneros M, Joseph-Bravo P & Charli JL. (2002). Thyrotropin-releasing hormone-induced down-regulation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity involves L-type calcium channels and cam kinase activities in cultures of adenohypophyseal cells. *Journal of Neuroendocrinology* **14**, 184-193.
- Vargiu P, De Abajo R, Garcia-Ranea JA, Valencia A, Santisteban P, Crespo P & Bernal J. (2004). The small GTP-binding protein, Rhes, regulates signal transduction from G protein-coupled receptors. *Oncogene* **23**, 559-568.
- Vasco VRL. (2021). Phosphoinositide Signal Transduction Pathway and Osteosarcoma Metastases. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology* **12**, e116225.
- Vidali S, Knuever J, Lerchner J, Giesen M, Biro T, Klinger M, Kofler B, Funk W, Poeggeler B & Paus R. (2014). Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Hormones Stimulate Mitochondrial Function and Biogenesis in Human Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology* **134**, 33-42.
- Villaruel-Campos D, Bronfman FC & Gonzalez-Billault C. (2016). Rab GTPase Signaling in Neurite Outgrowth and Axon Specification. *Cytoskeleton* **73**, 498-507.
- Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang XY, Montell C, Kozasa T, Sondek J & Harden TK. (2010). Kinetic Scaffolding Mediated by a Phospholipase C-beta and G(q) Signaling Complex. *Science* **330**, 974-980.
- Wang SE, Xian B, Guix M, Olivares MG, Parker J, Chung CH, Pandiella A & Arteaga CL. (2008). Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 5605-5620.
- Wang TL, Dowal L, El-Maghrabi MR, Rebecchi M & Scarlata S. (2000a). The pleckstrin homology

- domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of G beta gamma to activation of the catalytic core. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7466-7469.
- Wang W & Gershengorn MC. (1999). Rat TRH receptor type 2 exhibits higher basal signaling activity than TRH receptor type 1. *Endocrinology* **140**, 4916-4919.
- Wang YH, Jue SF & Maurer RA. (2000b). Thyrotropin-releasing hormone stimulates phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in GH(3) pituitary cells. *Molecular Endocrinology* **14**, 1328-1337.
- Wang YH & Maurer RA. (1999). A role for the mitogen-activated protein kinase in mediating the ability of thyrotropin-releasing hormone to stimulate the prolactin promoter. *Molecular Endocrinology* **13**, 1094-1104.
- Wayman GA, Impey S, Wu ZL, Kindsvogel W, Prichard L & Storm DR. (1994). Synergistic activation of the type-i adenylyl-cyclase by Ca²⁺ and G(s)-coupled receptors in-vivo. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 25400-25405.
- Wayman GA, Wei J, Wong S & Storm DR. (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 6075-6082.
- Wei J, Wayman G & Storm DR. (1996). Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 24231-24235.
- Wei J, Zhao AZ, Chan GCK, Baker LP, Impey S, Beavo JA & Storm DR. (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* **21**, 495-504.
- Weitmann S, Schultz G & Kleuss C. (2001). Adenylyl cyclase type II domains involved in G beta gamma stimulation. *Biochemistry* **40**, 10853-10858.
- Welch HC. (2015). Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **6**, 49-70.
- Wennerberg K, Rossman KL & Der CJ. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843-846.
- Willars GB. (2006). Mammalian RGS proteins: Multifunctional regulators of cellular signalling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**, 363-376.
- Won SY, Park JJ, Shin EY & Kim EG. (2019). PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis. *Experimental and Molecular Medicine* **51**, 1-9.
- Xiaofeng Ding SX. (2018). Endocytosis and human innate immunity. *Journal of Immunological Sciences* **2**, 65-70.
- Xu W, Reith MEA, Liu-Chen LY & Kortagere S. (2019). Biased signaling agonist of dopamine D3 receptor induces receptor internalization independent of beta-arrestin recruitment. *Pharmacological Research* **143**, 48-57.
- Xu X, Zeng WH, Popov S, Berman DM, Davignon I, Yu K, Yowe D, Offermanns S, Muallem S & Wilkie TM. (1999). RGS proteins determine signaling specificity of G(q)-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 3549-3556.
- Yamamoto M, Shimizu M & Okamiya H. (1990). Pharmacological actions of a new TRH analog,

- YM-14673, in rats subjected to cerebral-ischemia and anoxia. *European Journal of Pharmacology* **181**, 207-214.
- Yamamoto M, Sudoh K & Sasamata M. (1991). Effects of YM-14673, a new thyroid-releasing hormone analog, on neurological deficits in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* **192**, 165-167.
- Yi FS, Kong RR, Ren JQ, Zhu L, Lou JZ, Wu JY & Feng W. (2016). Noncanonical Myo9b-RhoGAP Accelerates RhoA GTP Hydrolysis by a Dual-Arginine-Finger Mechanism. *Journal of Molecular Biology* **428**, 3043-3057.
- Yorimitsu T, Sato K & Takeuchi M. (2014). Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers in Plant Science* **5**, 411.
- Yoshimura M, Ikeda H & Tabakoff B. (1996). μ -Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase. *Molecular Pharmacology* **50**, 43-51.
- Young KA, Biggins L & Sharpe HJ. (2021). Protein tyrosine phosphatases in cell adhesion. *Biochemical Journal* **478**, 1061-1083.
- Yu D, Makkar G, Strickland DK, Blanpied TA, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Sarkar R & Monahan TS. (2015). Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase Substrate (MARCKS) Regulates Small GTPase Rac1 and Cdc42 Activity and Is a Critical Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration in Intimal Hyperplasia Formation. *Journal of the American Heart Association* **4**, e002255.
- Yu R & Hinkle PM. (1998). Signal transduction, desensitization, and recovery of responses to thyrotropin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Molecular Endocrinology* **12**, 737-749.
- Yuan CJ, Sato M, Lanier SM & Smrcka AV. (2007). Signaling by a non-dissociated complex of G protein beta gamma and alpha subunits stimulated by a receptor-independent activator of G protein signaling, AGS8. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19938-19947.
- Zamboni V, Jones R, Umbach A, Ammoni A, Passafaro M, Hirsch E & Merlo GR. (2018). Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1821.
- Zarate A, Garcia IC, Moran C & Fonseca ME. (1986). Impaired glucose-tolerance coincides with abnormal release of growth-hormone following a glucose-load as well as in response to TRH in acromegaly. *Hormone and Metabolic Research* **18**, 400-401.
- Zhang JH, Sato M, Duzic E, Kubalak SW, Lanier SM & Webb JG. (1997). Adenylyl cyclase isoforms and vasopressin enhancement of agonist-stimulated cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **273**, H971-H980.
- Zhao HF, Wang J & To SST. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology* **47**, 429-436.
- Zheng C, Chen GQ, Tan Y, Zeng WQ, Peng QW, Wang J, Cheng C, Yang XM, Nie SK, Xu Y, Zhang ZT, Papa SM, Ye KQ & Cao XB. (2018a). TRH Analog, Taltirelin Improves Motor Function of Hemi-PD Rats Without Inducing Dyskinesia via Sustained Dopamine

Stimulating Effect. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**, 417.

Zheng C, Chen GQ, Tan Y, Zeng WQ, Peng QW, Wang J, Cheng C, Yang XM, Nie SK, Xu Y, Zhang ZT, Papa SM, Ye KQ & Cao XB. (2018b). TRH Analog, Taltirelin Protects Dopaminergic Neurons From Neurotoxicity of MPTP and Rotenone. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**, 485.

Zhou W, Li XB & Premont RT. (2016). Expanding functions of GIT Arf GTPase-activating proteins, PIX Rho guanine nucleotide exchange factors and GIT-PIX complexes. *Journal of Cell Science* **129**, 1963-1974.

Zhu CC, Cook LB & Hinkle PM. (2002). Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 28228-28237.

Zimmermann G & Taussig R. (1996). Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein alpha and beta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27161-27166.

10. Přílohy – Seznam publikací *in extenso*

10.1 Příloha A

Moravcová, R., Melkes, B., Novotný, J. 2018. TRH receptor mobility in the plasma membrane is strongly affected by agonist binding and by interaction with some cognate signaling proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*; 38:1; 20-26. (IF=2,092)

10.2 Příloha B

Drastichová Z., Trubačová R., Novotný, J. 2022. β -Arrestin2 is critically involved in the differential regulation of phosphosignaling pathways by thyrotropin-releasing hormone and taltirelin. *Cells*; 11:9; 1473. (IF=6,600)

10.1 Příloha A

TRH receptor mobility in the plasma membrane is strongly affected by agonist binding and by interaction with some cognate signaling proteins

2018

Journal of Receptors and Signal Transduction Research, 38:1, 20-26

Moravcová, R., Melkes, B., Novotný, J.

RESEARCH ARTICLE



TRH receptor mobility in the plasma membrane is strongly affected by agonist binding and by interaction with some cognate signaling proteins

Radka Moravcova, Barbora Melkes and Jiri Novotny

Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Objectives: Extensive research has been dedicated to elucidating the mechanisms of signal transduction through different G protein-coupled receptors (GPCRs). However, relatively little is known about the regulation of receptor movement within the cell membrane upon ligand binding. In this study we focused our attention on the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor that typically couples to $G_{q/11}$ proteins.

Methods: We monitored receptor diffusion in the plasma membrane of HEK293 cells stably expressing yellow fluorescent protein (YFP)-tagged TRH receptor (TRHR-YFP) by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).

Results: FRAP analysis indicated that the lateral movement of the TRH receptor was markedly reduced upon TRH binding as the value of its diffusion coefficient fell down by 55%. This effect was prevented by the addition of the TRH receptor antagonist midazolam. We also found that siRNA-mediated knock-down of $G_{q/11\alpha}$, $G\beta$, β -arrestin2 and phospholipase $C\beta 1$, but not of $G\alpha 1$, β -arrestin1 or G protein-coupled receptor kinase 2, resulted in a significant decrease in the rate of TRHR-YFP diffusion, indicating the involvement of the former proteins in the regulation of TRH receptor behavior. The observed partial reduction of the TRHR-YFP mobile fraction caused by down-regulation of $G\alpha 1$ and β -arrestin1 suggests that these proteins may also play distinct roles in TRH receptor-mediated signaling.

Conclusion: These results demonstrate for the first time that not only agonist binding but also abundance of some signaling proteins may strongly affect TRH receptor dynamics in the plasma membrane.

ARTICLE HISTORY

Received 30 May 2017
Revised 4 October 2017
Accepted 11 October 2017

KEYWORDS

TRH receptor; $G_{q/11}$ protein; β -arrestin; phospholipase $C\beta 1$; lateral mobility; FRAP

Introduction


G protein-coupled receptors (GPCRs) initiate multiple signaling pathways controlling a variety of cellular responses. Initial events, fundamental to all types of GPCR-mediated signaling, occur at the plasma membrane via protein–protein interactions and lead to activation of heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins). An understanding of the role of GPCRs requires characterization of their organization and behavior in the plasma membrane. It has been proposed earlier that the lateral mobility of membrane-bound receptors has an important role in cellular signaling [1]. GPCRs must interact with their cognate G proteins in order to effect signal transduction and hence are necessary mobile within the plane of the membrane. Receptor movement within the plasma membrane is determined not only by receptor type but also by cellular context [2,3].

The diffusion of proteins can be monitored by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). However, so far only a few studies have dealt with analysis of GPCR movement using this approach. Barak et al. [4] investigated β_2 -adrenergic receptor diffusibility on live cell membranes and demonstrated that real-time optical measurements of receptor interactions and dynamics on living cells are feasible.

By using FRAP, Pucadyil et al. [5] found that the cell surface dynamics of serotonin_{1A} receptor is modulated in a G protein-dependent manner. Besides that, it has been reported that μ -opioid receptor diffusion can be regulated by heterologous activation of other GPCRs, namely by α_2 -adrenergic or NPFF₂ receptors [6]. There is also some evidence to suggest that agonists may affect receptor movement in the plasma membrane [7,8]. We have recently shown that the lateral mobility of μ -opioid receptor can be diversely influenced by biased agonists [9].

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors belong to the GPCR superfamily. Upon exposure to agonist, these receptors stimulate phospholipase $C\beta$ through coupling to $G_{q/11}$ proteins, leading to the activation of phosphoinositide metabolism. Similarly as for other GPCRs, TRH receptor function can be regulated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and β -arrestin (β Arr) [10,11]. We have previously demonstrated that the signal transduction efficiency through TRH receptors is dependent on cholesterol content in the plasma membrane [12]. Interestingly, Brejchova et al. [13] recently reported that TRH receptor mobility was only slightly altered by cholesterol depletion. Nevertheless, decrease of cholesterol level impaired the functional coupling between the receptor and its cognate $G_{q/11}$ proteins.

CONTACT Jiri Novotny jiri.novotny@natur.cuni.cz Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

At present, there is no information about the possible effect of ligand binding to the TRH receptor on the lateral mobility of this receptor. Likewise, it has not been determined whether the interaction of the TRH receptor with its cognate signaling molecules may affect receptor movement in the plasma membrane. In this study, we sought to address these issues. For this purpose we used HEK293 cells stably expressing yellow fluorescent protein (YFP)-tagged TRH receptor (TRHR-YFP) and performed a series of FRAP experiments under different conditions. Our analyses revealed a significant decrease in TRH receptor diffusion rate upon agonist binding, as well as in cells with diminished expression of $G_{q/11\alpha}$, $G\beta$, β -arrestin2 or phospholipase C β 1 (PLC β 1). To the best of our knowledge, these results constitute the first report on the effect of different cognate signaling proteins on receptor mobility.

Materials and methods

Cell culture, plasmid construction and stable transfection

Human embryonic kidney (HEK293) cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

The expression vector was constructed using pcDNA3-YFP plasmid (Addgene plasmid no. 13033, a gift from Doug Golenbock, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) and the DNA sequence encoding the human TRH receptor (Source BioScience, Nottingham, UK). YFP tag was attached to the C-terminus of the receptor sequence using standard molecular biology techniques and In Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA). The sequence of the resulting construct (TRHR-YFP) was verified by DNA sequencing.

HEK293 cells were transfected with the above-mentioned plasmid using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Two weeks posttransfection, the cells were sorted on a BD Influx TM cell sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), and thereupon grown for 6 weeks in the presence of geneticin (800 µg/ml). This resulted in the isolation of several cell clones harboring the introduced plasmid DNA. One of these clones stably expressing TRHR-YFP, designated TRY-1, was used for all subsequent experiments. The expression level of TRHR-YFP in these cells (as assessed by immunoblotting) was comparable to endogenous expression of TRH receptors in pituitary GH1 cells. The specificity of TRHR antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc-11574) used for this purpose was confirmed elsewhere [14].

Agonist/antagonist treatment and siRNA knockdown experiments

To investigate the effect of ligand binding to the TRH receptor on its mobility in the plasma membrane, TRY-1 cells were incubated for 5 min with either 10 µM TRH (agonist) or 100 µM midazolam (antagonist) alone or in the presence of both these ligands min prior to commencing selective

photobleaching experiments. When these ligands were used together, midazolam was added 5 min before TRH. Cells were always imaged for a maximum of 15 min upon ligand addition.

Specific gene silencing was performed using appropriately designed siRNAs (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), which were directed against individual mRNAs encoding selected signaling proteins. TRY-1 cells seeded in glass bottom-wells were transfected with the appropriate siRNA (25 pmol) or the negative control siRNA (25 pmol) using Lipofectamine RNAiMax transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA). The list of the siRNA sequences is displayed in Supplementary Table S1. The silenced cells were used for further analysis 48 h after transfection. The relative expression levels of target proteins after siRNA knockdown were monitored by Western blotting using the following primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX): $G_{q/11\alpha}$ (sc-392), G_{i2} (sc-391), $G\beta$ 1 (sc-379), $G\beta$ 2 (sc-380), β Arr1 (sc-9182), β Arr2 (sc-13140), GRK2 (sc-562) and PLC β 1 (sc-9050).

FRAP measurements and analysis

The presumed effects of ligand binding to the TRH receptor, as well as the consequences of knockdown of its cognate signaling molecules on lateral diffusion of the receptor in the plasma membrane were examined by confocal microscopy and FRAP. Live-cell microscopy was performed at 37°C in 5% CO₂ on a Zeiss LSM 880 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) equipped with 40x/1.2 W DICIII C Apochromat objective lens and back-thinned CCD camera (Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Photobleaching was accomplished on a defined region of interest of 2 µm diameter using the 488 and 514-nm lines from 40-mW Argon laser operating at 100% power as described previously [9]. Each bleaching lasted 300 ms (six iterations). For imaging, the laser power was attenuated to 2% of the bleach intensity. Images were acquired in 512 × 512 format with a scan speed of 500 Hz. Fifteen pre-bleach images were collected and immediately after photobleaching 400 successive postbleach images were recorded for monitoring the fluorescence redistribution. Background subtraction and bleaching correction were performed before fluorescence quantification. FRAP recovery curves were fitted with a two-component diffusion model and apparent diffusion coefficients and mobile fractions were calculated. The data were analyzed using easyFRAP, a MATLAB platform-based tool [15].

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). All data sets were checked for normality of distribution using the Shapiro-Wilk test. Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test. The Bonferroni correction was taken into account to adjust for any multiple comparisons issues. Differences were considered to be significant at p values of <.05. Results are presented as means ± SEM and are representative of at least three independent experiments.

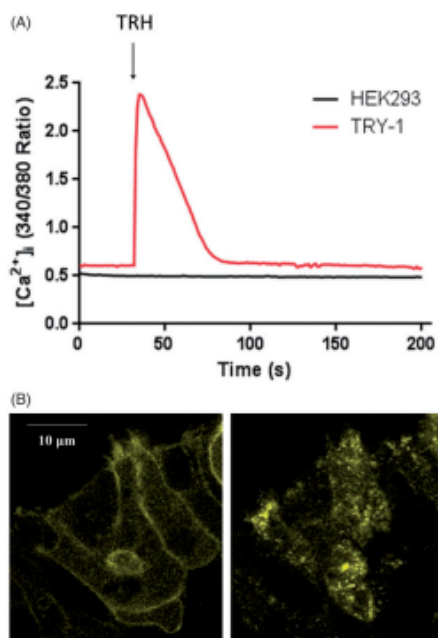


Figure 1. Characterization of the TRY-1 cell line. (A) Calcium response to TRH in HEK293 and TRY-1 cells. Intracellular Ca^{2+} release upon receptor stimulation was recorded as previously described [16]. The curves represent the change in fluorescence intensity of the Ca^{2+} indicator Fura-2/AM detected in non-transfected HEK293 cells (black) or cells transfected with TRHR-YFP (red) after uniform stimulation with 10 mM TRH. The increase of the fluorescence intensity corresponds to the rise in cytoplasmic free Ca^{2+} levels. (B) Representative fluorescence confocal microscopy images of TRY-1 cells. Microphotographs show the subcellular distribution of the yellow color corresponding to the fluorescence signal of TRHR-YFP in the middle plane (cytoplasmic cross-section) of resting TRY-1 cells (left) and of cells treated with 10 μM TRH (right) for 10 min. TRH induced substantial translocation of TRHR-YFP from the plasma membrane to the inside of the cell. Scale bar, 10 μm .

Results and discussion

The FRAP technique provides a powerful means to quantitatively study molecular diffusion. Here we applied this approach to monitor lateral movement of TRH receptors within the plasma membrane of living TRY-1 cells (HEK293 cells stably expressing fluorescently labeled TRH receptor). The presence of functional TRH receptors in this cell line was confirmed by the ability of TRH to elicit intracellular calcium transients (Figure 1(A)) that were similar to those observed in HEK293 cells expressing exogenously introduced untagged TRH receptors [16]. TRH receptor mobility in the plasma membrane was characterized through determination of the apparent diffusion coefficients and mobile fractions.

We first investigated the cellular distribution of TRHR-YFP in TRY-1 cells. Whereas TRHR-YFP was almost exclusively localized in the plasma membrane under resting conditions, stimulation with TRH resulted in a pronounced translocation of the receptor into the cell interior (Figure 1(B)). This finding is compatible with a relatively fast internalization of TRH

receptors induced by agonist treatment of GH3 or VTGP1 cells [17,18]. Next, we determined the mobility and dynamics of TRHR-YFP by FRAP of 2- μm diameter areas on the basal membrane of TRY-1 cells (Figure 2(A)). It is known that FRAP measurements based on use of a focal plane through the center of the cell can be affected by the movement of the cell (or the membrane) and a relatively high signal-to-noise ratio can be encountered under these conditions. Therefore, we decided to measure FRAP at the bottom cell membrane where the whole bleach spot represents the membrane. This region is quite commonly used for determining the lateral movement of membrane proteins [19,20]. Moreover, in a previous study, Brejchova et al. [13] did not reveal any significant differences between the values of the diffusion coefficients of the TRH receptor determined in plasma membrane areas adjacent to the glass support and in plasma membrane areas corresponding to optical sections through the middle of the cells.

FRAP experiments were performed on control (naïve) cells, as well as on cells treated with either the receptor agonist TRH or antagonist midazolam alone, or in the presence of both these ligands in the culture medium. Typical fluorescence recovery curves obtained in control and TRH-exposed cells are shown in Figure 2(B). Our analysis of TRHR-YFP mobility by confocal FRAP before and after adding TRH or midazolam indicated that the agonist and antagonist exerted diverse effects on the receptor. Whereas the antagonist midazolam did not affect TRHR-YFP movement, TRH markedly reduced (by 55%) the diffusion rate of the receptor in the plasma membrane (Figure 3(A)). The apparent diffusion coefficient (D) decreased from $0.36 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in control cells to $0.16 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in TRH-exposed cells. This significant decrease in D induced by agonist binding to the receptor was prevented by midazolam. In the absence of added ligand, TRHR-YFP exhibited similar mobility as observed for some other GPCRs under resting conditions. For example the D values for β_2 -adrenergic, neurokinin NK2 and μ -opioid receptors were found to range from 0.2 to $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [4,6,7]. Interestingly, Brejchova et al. [13] recently reported that VSV-epitope and eGFP-tagged version of TRH receptor in HEK293 cells possessed a somewhat slower mobility ($D \approx 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$). The observed slower rate of receptor movement can apparently be explained by different type of its modification that might have affected receptor behavior. The mobile fraction (M_f) of TRHR-YFP (i.e. the percentage of available mobile protein), which represented roughly 85% of the total receptor population in control cells, was not significantly affected by TRH, but decreased in the presence of midazolam (Figure 3(B)). The fraction of mobile GPCRs usually comprises about 70–90% of the receptors [6,7,13,21], indicating that these receptors have a substantial fraction free to diffuse in the membrane. This is in good agreement with the values determined for TRHR-YFP in our experiments.

The observed marked decrease in TRHR-YFP mobility (reduction of the D value by 55%) caused by TRH binding corresponds to results of some earlier studies. Similar decrease in receptor mobility was previously detected after agonist binding to some GPCR (estrogen, glucocorticoid and NMDA glutamate GluR1) as well as non-GPCR (TrkA or

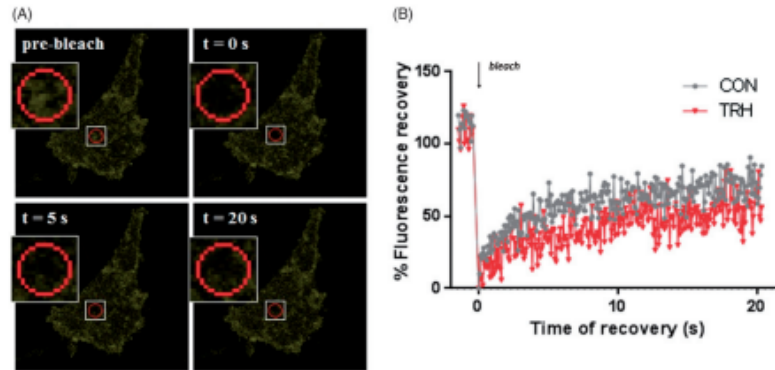


Figure 2. A schematic representation of a typical FRAP experiment. (A) Photobleaching analysis of fluorescence of TRH-R-YFP cells. Images were acquired by focusing on the basal cell membrane and show the distribution of TRH-R-YFP fluorescence signal in a single cross-section before the photobleaching (pre-bleach), at the end of photobleaching ($t = 0$ s), and at the indicated time points after photobleaching. The bleach spot is indicated by a red circle. All experiments were conducted at 37°C . Changes in fluorescence intensity incurred by photobleaching are discernible in expanded sections of the microphotographs. (B) Representative recovery curves of TRH-R-YFP corrected for fluorescence decay. The plot shows the time course of fluorescence intensity changes in the bleach region of interest of one control cell (CON) and cell treated with TRH.

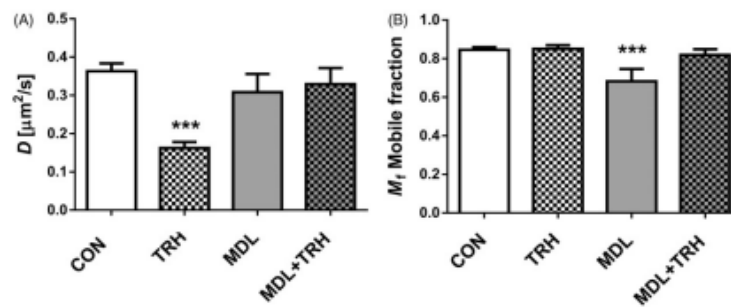


Figure 3. Effect of receptor agonist and antagonist binding on the lateral mobility of TRH-R-YFP. Photobleaching experiments were performed with control (unstimulated) TRH-R-YFP cells (CON) and with cells exposed to $10\ \mu\text{M}$ TRH (agonist) or $100\ \mu\text{M}$ midazolam (MDL, antagonist). Both these ligands were added to the culture medium 5 min before starting the experiments and cells were kept in this medium throughout the analysis. When these two agents were used in combination, MDL was applied 5 min before TRH. The values of diffusion coefficients (A) and mobile fractions (B) of TRH-R-YFP were calculated from confocal FRAP by fitting the FRAP data with a two-component model. Data are means \pm SEM ($N = 104$ for CON, $N = 71$ for TRH, $N = 15$ for MDL, $N = 35$ for MDL + TRH), *** $p < .001$ versus control (unstimulated) cells.

TRPV1) receptors [8,22–25]. On the other hand, agonist stimulation increased the mobility of CRF2 or GABA_B receptors and had no effect on the mobility of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors [26,27]. Stimulation of NK2 receptors with agonist reduced the diffusion rate of these receptors and enhanced their mobile fraction [7]. Following P2X1 receptor activation the rate of FRAP was doubled, while the immobile fraction of receptors was unaffected [28]. These diverse data indicate that the lateral movement of different receptors in the plasma membrane may be differently affected by agonist binding. It is still not clear why receptor mobility changes in an unpredictable way upon agonist occupancy. Unfortunately, only little information is available about the effect of antagonists on receptor membrane dynamics. It has previously been shown that the opioid antagonist naloxone did not change μ -OR lateral mobility [6,9]. Here we observed that midazolam binding to the TRH receptor did not affect

the diffusion coefficient of the receptor, but significantly decreased its mobile fraction (Figure 3(B)). This may suggest that antagonist binding could at least partially restrict TRH receptor movement within the plasma membrane.

Finally, we aimed to investigate the possible effect of presumed cognate and noncognate signaling molecules on TRH-R-YFP mobility. For this purpose gene expression of G α_q , G α_{i1} , G β , β -arrestin1 and 2 (β Arr1 and β Arr2), GRK2 or PLC β 1 in TRH-R-YFP cells was silenced with appropriately designed siRNAs. The relative abundances of selected signaling proteins before and after siRNA-mediated knockdown were monitored by immunoblotting. Immunoblot data indicated that the targeted gene knockdown was successful and substantial down-expression of selected genes was achieved (Figure 4). Down-regulation of some of these proteins significantly influenced TRH-R-YFP mobility. In some cases, the receptor mobile fraction was partially altered and the

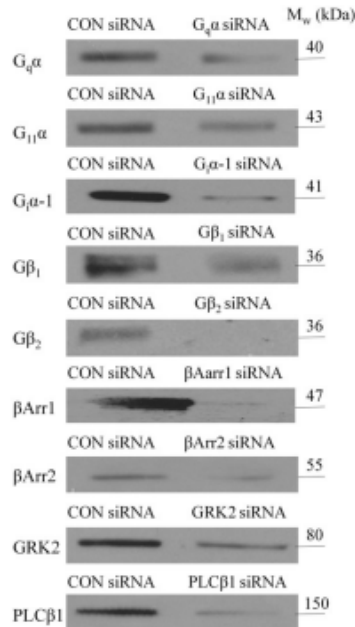


Figure 4. Identification of selected signaling proteins in TRY-1 cells. To suppress the expression of selected proteins, the cells were transfected with appropriate siRNAs as described in Materials and Methods. Two days posttransfection, total cell lysates (20 μ g per lane) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with suitable antibodies. Proteins detected by immunoblotting are indicated at the left of each panel. Transfection of TRY-1 cells with nonsilencing (CON) or specific siRNA is indicated at the top of each panel.

diffusion coefficient was reduced to different extent (Table 1). The most pronounced decrease (by about 30%) in the D value was detected in cells with diminished expression of $G_{q/11}\alpha$ and $G\beta$. Interestingly, down-regulation of β Arr2 and $PLC\beta 1$, in contrast to $G_{i2}\alpha 1$, β Arr1 and $GRK2$, also reduced the rate of TRH-YFP diffusion. Under all these conditions, TRH-YFP movement was slowed down even further by the addition of TRH (Table 1). Likewise, cholesterol depletion by β -cyclodextrin (performed according to [12]) resulted in reduction of the D value, which was further augmented by agonist occupancy (data not shown). All these results indicate that agonist binding functions as much stronger regulatory factor limiting the rate of receptor lateral movement than the lack of certain signaling proteins or cholesterol. Our current findings also suggest that not only interaction of the TRH receptor with its cognate $G_{q/11}$ proteins but also with β Arr2 and $PLC\beta 1$ may strongly affect the receptor behavior in the plasma membrane.

Interestingly enough, down-regulation of $G_{q/11}\alpha$, $G_{i2}\alpha 1$, $G\beta$ or β Arr1, but not of β Arr2, $GRK2$ and $PLC\beta 1$, led to a partial reduction (by about 7–18%) of the receptor mobile fraction (Table 1), which is indicative of local confinement. Moreover, in cells with diminished expression of $G_{i2}\alpha 1$, the addition of TRH markedly reduced the M_f value (from 76 to 50%).

Table 1. Lateral diffusion characteristics of TRH-YFP in the plasma membrane of TRY-1 cells.

| Condition | D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | M_f (%) | N |
|---|----------------------------------|----------------------|-----|
| Control | 0.36 ± 0.02 | 85 ± 1 | 104 |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)}$ | $0.23 \pm 0.02^{***}$ | $77 \pm 3^{**}$ | 40 |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.15 \pm 0.02^{***\#\#}$ | $83 \pm 3^{\#}$ | 38 |
| $G_{11}\alpha^{(1)}$ | $0.23 \pm 0.03^{***}$ | $79 \pm 2^{\#}$ | 41 |
| $G_{11}\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.16 \pm 0.02^{***\#\#}$ | $85 \pm 3^{\#}$ | 38 |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)}$ | $0.25 \pm 0.03^{**}$ | $79 \pm 3^{\#}$ | 35 |
| $G_{q/11}\alpha^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.20 \pm 0.03^{***}$ | $89 \pm 3^{\#}$ | 31 |
| $G_{i2}\alpha 1^{(1)}$ | 0.35 ± 0.03 | $76 \pm 3^{**}$ | 34 |
| $G_{i2}\alpha 1^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.21 \pm 0.04^{**\#\#}$ | $50 \pm 6^{***\#\#}$ | 18 |
| $G\beta_1^{(1)}$ | $0.28 \pm 0.02^{\#}$ | 84 ± 3 | 53 |
| $G\beta_1^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.16 \pm 0.02^{***\#\#}$ | $91 \pm 2^{**\#\#}$ | 36 |
| $G\beta_2^{(1)}$ | $0.25 \pm 0.03^{**}$ | 88 ± 2 | 40 |
| $G\beta_2^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.12 \pm 0.02^{***\#\#}$ | 89 ± 3 | 38 |
| $G\beta_{1/2}^{(1)}$ | $0.25 \pm 0.02^{**}$ | $77 \pm 3^{\#}$ | 39 |
| $G\beta_{1/2}^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.19 \pm 0.02^{***\#\#}$ | $84 \pm 3^{\#}$ | 40 |
| β Arr1 ⁽¹⁾ | 0.41 ± 0.04 | $69 \pm 4^{***}$ | 32 |
| β Arr1 ^{(1)} + \text{TRH}} | $0.19 \pm 0.03^{***\#\#}$ | $66 \pm 6^{***}$ | 25 |
| β Arr2 ⁽¹⁾ | $0.27 \pm 0.02^{\#}$ | 83 ± 2 | 42 |
| β Arr2 ^{(1)} + \text{TRH}} | $0.17 \pm 0.03^{***\#\#}$ | $91 \pm 2^{**\#\#}$ | 43 |
| $GRK2^{(1)}$ | 0.30 ± 0.03 | 81 ± 2 | 43 |
| $GRK2^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.21 \pm 0.03^{***\#\#}$ | 81 ± 3 | 41 |
| $PLC\beta 1^{(1)}$ | $0.27 \pm 0.02^{**}$ | 84 ± 2 | 49 |
| $PLC\beta 1^{(1)} + \text{TRH}$ | $0.18 \pm 0.02^{***\#\#}$ | 83 ± 3 | 38 |

The values of apparent diffusion coefficients (D) and mobile fractions (M_f) of TRH-YFP were calculated from confocal FRAP data obtained from 15 to 104 independent measurements (N). All data are means \pm SEM.

* $p < .05$,

** $p < .01$,

*** $p < .001$ versus control (unstimulated) cells.

$p < .05$,

$p < .01$,

$p < .001$ versus corresponding siRNA-silenced cells.

⁽¹⁾siRNA knockdown.

Curiously, no such effect was observed in cells expressing lower levels of several other signaling proteins. The molecular mechanism behind this phenomenon is not clear. Importantly, $G_{i2}\alpha 1$ has not heretofore been considered as an intrinsic part of the TRH receptor signaling system. Notwithstanding, our observations indicate that the paucity of this allegedly noncognate protein may somehow affect the TRH receptor mobile fraction and thus possibly modulate signal transduction through this receptor. The distinct effects imparted on TRH-YFP mobility by substantial elimination of β Arr1 or β Arr2 suggest that there might be a special relationship between the TRH receptor and β Arr isoforms. It has been previously noted that β Arr1 and β Arr2 can 'reciprocally regulate' ERK signaling initiated via the angiotensin II type A1 receptor [29]. The distinct modes of interaction of the two β Arr isoforms with the TRH receptor may encourage speculation that dissimilar regulation at the β Arr level could perhaps exist also in the case of this receptor. However, this hypothesis must be experimentally corroborated.

Whereas the observed decline of TRH receptor mobility due to agonist occupancy can be quite satisfyingly explained, it is not readily evident why its mobility should decrease after the diminishing of some signaling proteins. It is known that agonist stimulation of the TRH receptor is followed by GRK-mediated receptor phosphorylation and β Arr recruitment [30]. Besides that these receptors can form dimers and we previously reported that agonist binding strongly promotes TRH receptor dimerization [14]. All these agonist-initiated events could well contribute to the reduction in TRH receptor

mobility. GRK2 is a cytosolic protein uniquely targeted to the membrane from the cytoplasm in a signaling-dependent manner [31]. Therefore, it is perhaps not too surprising that decreased GRK2 expression did not significantly affect TRH receptor movement in the plasma membrane under resting conditions. However, it is much less clear why down-regulation of other signaling proteins ($G_{q/11}\alpha$, $G_{i2}\alpha1$, $G\beta$, β Arr and PLC β 1) slowed down the rate of TRH receptor diffusion and/or reduced the receptor mobile fraction. It can be assumed that these proteins may have an indispensable role in TRH receptor organization in the plasma membrane and thus participate in the modulation of receptor lateral movement. Nonetheless, it remains to be determined why down-regulation of these proteins leads exclusively to a decrease in TRH receptor mobility. To sum up, this study indicates for the first time that the mobility of membrane-bound receptors can be distinctly affected by changes in abundance of different signaling proteins.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Jan Krusek for his assistance with calcium imaging experiments.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Charles University Grant Agency (project No 402214) and co-financed by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (CZ.1.05/4.1.00/16.0347).

References

- Peters R. Lateral mobility of proteins and lipids in the red cell membrane and the activation of adenylate cyclase by beta-adrenergic receptors. *FEBS Lett.* 1988;234:1–7.
- Fernandes CC, Berg DK, Gomez-Varela D. Lateral mobility of nicotinic acetylcholine receptors on neurons is determined by receptor composition, local domain, and cell type. *J Neurosci.* 2010;30:8841–8851.
- Ganguly S, Paila YD, Chattopadhyay A. Metabolic depletion of sphingolipids enhances the mobility of the human serotonin(1A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411:180–184.
- Barak LS, Ferguson SSG, Zhang J, et al. Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta(2)-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol.* 1997;51:177–184.
- Pucadyil TJ, Kalipatnapu S, Hirikumar KG, et al. G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin(1A) receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry.* 2004;43:15852–15862.
- Carayon K, Mouldous L, Combedazou A, et al. Heterologous regulation of mu-opioid (MOP) receptor mobility in the membrane of SH-SY5Y cells. *J Biol Chem.* 2014;289:28697–28706.
- Cezanne L, Lecat S, Lagane B, et al. Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane: improved frap analysis and biological relevance. *J Biol Chem.* 2004;279:45057–45067.
- Sharma K, Fong DK, Craig AM. Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci.* 2006;31:702–712.
- Melkes B, Hejnova L, Novotny J. Biased μ -opioid receptor agonists diversely regulate lateral mobility and functional coupling of the receptor to its cognate G proteins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2016;389:1289–1300.
- Jones BW, Hinkle PM. Beta-arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem.* 2005;280:38346–38354.
- Gehret AU, Jones BW, Tran PN, et al. Role of helix 8 of the thyrotropin-releasing hormone receptor in phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase. *Mol Pharmacol.* 2010;77:288–297.
- Ostasov P, Bourova L, Hejnova L, et al. Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via $G(q)/G(11)\alpha$ proteins. *J Recept Signal Transduct.* 2007;27:335–352.
- Brejchova J, Sykora J, Ostasov P, et al. TRH-receptor mobility and function in intact and cholesterol-depleted plasma membrane of HEK293 cells stably expressing TRH-R-eGFP. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848:781–796.
- Drastichova Z, Novotny J. Identification of a preassembled TRH receptor-G(q/11) protein complex in HEK293 cells. *Cell Struct Funct.* 2012;37:1–12.
- Rapsomaniki MA, Kotsantis P, Symeonidou IE, et al. easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics.* 2012;28:1800–1801.
- Ostasov P, Krusek J, Durchankova D, et al. Ca^{2+} responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of $G(11)\alpha$ protein over-expression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochem Funct.* 2008;26:264–274.
- Ashworth R, Yu R, Nelson EJ, et al. Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:512–516.
- Drmotova T, Novotny J, Gould GW, et al. 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. *Biochem J.* 1999;340:529–538.
- Lajoie P, Partridge EA, Guay G, et al. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol.* 2007;179:341–356.
- Maurel D, Banala S, Laroche T, et al. Photoactivatable and photoconvertible fluorescent probes for protein labeling. *ACS Chem Biol.* 2010;5:507–516.
- Beletkaia E, Fenz SF, Pomp W, et al. CXCR4 signaling is controlled by immobilization at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863:607–616.
- Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, et al. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol.* 2001;3:15–23.
- Schaaf MJM, Cidlowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1922–1934.
- Marchetti L, Callegari A, Luin S, et al. Ligand signature in the membrane dynamics of single TrkA receptor molecules. *J Cell Sci.* 2013;126:4445–4456.
- Senning EN, Gordon SE. Activity and Ca^{2+} regulate the mobility of TRPV1 channels in the plasma membrane of sensory neurons. *Elife.* 2015;2015:4.
- Milan-Lobo L, Gsandtner I, Gaubitzer E, et al. Subtype-specific differences in corticotropin-releasing factor receptor complexes detected by fluorescence spectroscopy. *Mol Pharmacol.* 2009;76:1196–1210.
- Calebiro D, Rieken F, Wagner J, et al. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals

- complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:743–748.
- [28] Lalo U, Ailsopp RC, Mahaut-Smith MP, et al. P2X1 receptor mobility and trafficking: regulation by receptor insertion and activation. *J Neurochem*. 2010;113:1177–1187.
- [29] Ahn S, Wei HJ, Garrison TR, et al. Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem*. 2004;279:7807–7811.
- [30] Song GJ, Jones BW, Hinkle PM. Dimerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor potentiates hormone-dependent receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18303–18308.
- [31] Li JL, Xiang B, Su WJ, et al. Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function *in vivo*. *J Biol Chem*. 2003;278:30219–30226.

10.2 Příloha B

β -Arrestin2 is critically involved in the differential regulation of phosphosignaling pathways by thyrotropin-releasing hormone and taltirelin



2022

Cells, 11:9, 1473

Drastichová, Z., Trubačová, R., Novotný, J.

Article

β-Arrestin2 Is Critically Involved in the Differential Regulation of Phosphosignaling Pathways by Thyrotropin-Releasing Hormone and Taltirelin

Zdenka Drastichova [†] , Radka Trubacova [†] and Jiri Novotny ^{*†} 

Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic;

zdenka.drastichova@natur.cuni.cz (Z.D.); radka.moravcova@natur.cuni.cz (R.T.)

* Correspondence: jiri.novotny@natur.cuni.cz; Tel.: +420-221951760

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Drastichova, Z.; Trubacova, R.; Novotny, J. β-Arrestin2 Is Critically Involved in the Differential Regulation of Phosphosignaling Pathways by Thyrotropin-Releasing Hormone and Taltirelin. *Cells* **2022**, *11*, 1473. <https://doi.org/10.3390/cells11091473>

Academic Editors: Majid Momeny, Vishnu Suresh Babu and Avisek Majumder

Received: 5 March 2022

Accepted: 25 April 2022

Published: 27 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In recent years, thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analogs, including taltirelin (TAL), have demonstrated a range of effects on the central nervous system that represent potential therapeutic agents for the treatment of various neurological disorders, including neurodegenerative diseases. However, the molecular mechanisms of their actions remain poorly understood. In this study, we investigated phosphosignaling dynamics in pituitary GH1 cells affected by TRH and TAL and the putative role of β-arrestin2 in mediating these effects. Our results revealed widespread alterations in many phosphosignaling pathways involving signal transduction via small GTPases, MAP kinases, Ser/Thr- and Tyr-protein kinases, Wnt/β-catenin, and members of the Hippo pathway. The differential TRH- or TAL-induced phosphorylation of numerous proteins suggests that these ligands exhibit some degree of biased agonism at the TRH receptor. The different phosphorylation patterns induced by TRH or TAL in β-arrestin2-deficient cells suggest that the β-arrestin2 scaffold is a key factor determining phosphorylation events after TRH receptor activation. Our results suggest that compounds that modulate kinase and phosphatase activity can be considered as additional adjuvants to enhance the potential therapeutic value of TRH or TAL.

Keywords: β-arrestin2; GH1 cells; small GTPase-mediated signaling; taltirelin; thyrotropin-releasing hormone; TRH receptor

1. Introduction

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is a tripeptide consisting of pyroglutamyl-histidyl-proline amide. It is produced by neurons in the hypothalamus and circulates through the hypophyseal portal system to the anterior pituitary, where it binds to its receptors and stimulates the release of other hormones [1,2]. TRH is thus a fundamental element involved in the regulation of many hormonal and metabolic functions. TRH has been reported to exert numerous beneficial effects due to its antiapoptotic [3–5] or neuro-protective [6,7] properties. This peptide is also considered a potential therapeutic agent for the treatment of neurodegenerative diseases, especially Parkinson's and Alzheimer's disease [8]. Because of TRH's short half-life in the bloodstream, low lipophilicity, long time to cross the blood brain barrier, and potent HPT axis-stimulating effects [9,10], a number of TRH analogs have been synthesized [11]. Among them, the superagonist taltirelin (TAL) seems to be a promising drug due to its much longer half-life and duration of action [12,13]. TAL has a 10–100 times stronger stimulatory effect on the central nervous system and an eight times longer time of action than TRH and was approved for the treatment of spinocerebellar degeneration [10].

The effects of TRH and TAL are mediated by the thyrotropin-releasing hormone receptor (TRH-R), which belongs to family A of G protein-coupled receptors (GPCRs). Two subtypes of TRH-R (TRH-R1 and TRH-R2) have been detected in rodents. TRH-R1

is highly expressed in the pituitary gland, whereas TRH-R2 is not detected or is detected at low levels in the anterior pituitary and was absent in the neurointermediate lobe of the pituitary [14,15]. TRH-R2 exhibits higher basal signaling activity and is internalized more rapidly than TRH-R1. Its long-term activation with TRH results in a lower induction of transcription of the reporter gene [15]. Agonist-bound TRH-R activates phospholipase C β via Gq/11 proteins, which subsequently triggers the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into two second messengers: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) [16]. IP3 then moves away from the membrane, binds to IP3 receptors on the endoplasmic reticulum, and allows the release of Ca²⁺ into the cytosol, where it modulates various signaling pathways. DAG remains near the cell membrane and activates protein kinase C [17]. Other signaling pathways triggered by TRH include MAPK signaling [18], phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling [8] and Rho and Ras signaling [19,20].

It has been well-established that TRH-R is phosphorylated and binds to β -arrestin after agonist exposure [21]. β -Arrestins are cytosolic proteins that are among the most important regulatory molecules. Upon binding to a phosphorylated receptor, β -arrestins serve as adaptors that link receptor molecules to components of the endocytic apparatus formed by clathrin and adapter protein-2, thereby arresting the signaling and acting as a negative regulator. This is consistent with the original idea describing the function of β -arrestins as key molecules for receptor internalization. There are two β -arrestin isoforms, β -arrestin1 and β -arrestin2, which are ubiquitously expressed [22] and able to interact with TRH-R [21]. β -Arrestins are also associated with a very hot topic in current molecular pharmacology called biased agonism. This term describes the process by which different agonists can activate different signaling pathways through one type of receptor by stabilizing different receptor conformations. This basically means functional selectivity of a particular ligand for one of two signaling pathways that lead either through G proteins or β -arrestin. This mechanism has been demonstrated for several GPCRs, including those coupled to Gq/11 [23–25]. However, to date, there is no direct evidence for biased agonism at TRH-R.

Currently, it is clear that the role of β -arrestins is much more diverse. These molecules can have a number of signaling functions, for example, they link Src kinases to receptors [26] or serve as scaffolds for binding individual components of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, such as Raf-1, MEK1, and ERK1/2 [27–29]. Interestingly, it appears that TRH-R does not require the recruitment of β -arrestin to activate MAPK signaling pathways [18]. The list of other proteins that interact with β -arrestin includes regulators of small GTPase activity, components of the JNK and p38 pathways, casein kinase 2, PI3K and components of the Wnt/ β -catenin pathway [30]. It is worth noting that these interactions can be strongly influenced by phosphorylation. The phosphorylation state of Src and the dishevelled proteins DVL1 and DVL2 determines their interactions with β -arrestin [30]. Protein phosphorylation is among the regulatory mechanisms that determine not only protein interactions but also their activation/deactivation, stability and subcellular localization. Phosphorylation and dephosphorylation events are mediated by kinases and phosphatases, respectively, and occur at serine (Ser), threonine (Thr), or tyrosine (Tyr) residues. Most kinases act on both serine and threonine residues (Ser/Thr kinases (STKs)), others act on tyrosine (Tyr kinases (TKs)), and some act on all three residues (dual-specificity kinases (DSKs)) [31].

It is known that β -arrestin2 regulates many signaling pathways in a positive or negative manner [30]. GPCR-dependent activation of Rho kinase signaling increased the association of arrestin with PTEN phosphatase, resulting in the recruitment of PTEN to the plasma membrane, its activation, and negative regulation of Akt signaling [30]. β -Arrestin negatively regulates PAR2 receptor-mediated Cdc42 activation [30]. It positively regulates assembly of the PP2A-Akt-GSK3 β complex and subsequent PI3K/Akt-dependent survival signaling or positively mediates Rac1 activation through Wnt5A [30].

There is some evidence that certain small GTPases may also be involved in TRH-R-mediated signaling [32]. Small GTPases are GTP-binding proteins that are divided into five

subfamilies: Ras (Ras, Ral, Rap), Rho (Rho, Rac, Cdc42), Rab, Arf, and Ran [30]. The activity of small GTPases is regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase activator proteins (GAPs). While GEFs stimulate the exchange of GDP for GTP to activate the small GTPases, GAPs promote GTP hydrolysis to inactivate them [33]. Most of the 150 identified GEFs and GAPs are expressed in the brain with specific spatial and temporal expression patterns, but their functions have not been fully elucidated [34]. Small GTPases and their regulators are modified by phosphorylation, which controls their stability and activity, subcellular localization, and interactions with binding partners [35–37].

In the present study, we investigated the phosphosignaling dynamics in rat pituitary GH1 cells treated with TRH or TAL. Moreover, our studies revealed a specific role of β -arrestin2 in determining phosphorylation events induced by TRH or TAL.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The GH1 cell line (CCL 82) was purchased from the American Tissue Type Collection (Rockville, MD, USA). Horse and fetal bovine sera were from Gibco (Carlsbad, CA, USA), Lipofectamine™ RNAiMAX and β -arrestin2 antibody were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were of the highest purity available.

2.2. Cell Culture, siRNA Inhibition and Drug Treatment

GH1 cells (ATCC CCL-82), the tumor cells from pituitary gland of *Rattus norvegicus*, were routinely grown in Ham's F-12 Nutrient Mixture supplemented with 15% horse serum, 2.5% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic solution at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. Before starting the experiment, growth medium was replaced with medium supplemented with 1% FBS.

For transfection with siRNA, cells were grown in 75 cm² tissue culture flasks, each sample in triplicate. At 50% confluence, cells were transfected with siRNA against β -arrestin2 or control siRNA using Lipofectamine™ RNAiMAX reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly, control or β -arrestin2 siRNA were mixed with an appropriate amount of Lipofectamine RNAiMAX in serum-free Opti-MEM medium and incubated for 5 min at room temperature to obtain siRNA-lipid complexes which were then added to each flask.

Then, 2 days after the transfection, cells were treated with or without 1 μ M TRH or 1 μ M taltirelin (TAL) to ensure that a maximal response to stimulation was elicited. After 30 min of incubation in the absence (control) or presence of ligands, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and subsequently harvested by centrifugation using Hettich Universal 320 centrifuge (1800 rpm, 10 min, 4 °C). Cell pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until use.

2.3. Western Blot Analysis

Harvested cells were resuspended in TMES buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂; pH 7.0) and briefly sonicated. Homogenates were solubilized in Laemmli buffer and separated in 10% polyacrylamide gels using the Mini-Protein II apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The resolved proteins were electrotransferred from the gel to a nitrocellulose membrane and stained with Ponceau S (0.1% (w/v) in 5% acetic acid (v/v)) to verify equivalent protein loading and normalize the data. After blocking with 5% reduced-fat milk in TBS-T buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v); pH 8.0), membranes were incubated with primary antibodies against β -arrestin1 or β -arrestin2 at 4 °C overnight. The next day, membranes were washed three times with TBS-T buffer, probed with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 1 h at room temperature and washed three times with TBS-T buffer. Blots were visualized with the enhanced chemiluminescence technique using Thermo Scientific SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate according to the manufacturer's instructions. The generated

images were scanned, and the signal intensities of the bands corresponding to β -arrestin1 or β -arrestin2 were quantified using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>, assessed on 15 May 2021). Data were analyzed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) from three independent experiments. Significant differences between groups were determined using Student's *t*-test. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

2.4. Protein Digestion

Cells (~500 μ g per sample) were homogenized by sonication using a micro probe sonicator (Bandelin Sonoplus) and lysed by boiling at 95 °C for 10 min in 100 mM Tris pH 8.5 containing 2% sodium deoxycholate. Chloroacetamide and Tris(2-carboxyethyl)phosphine to 40 mM and 10 mM final concentration, respectively, were added. The protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo) and 250 μ g of protein per sample was used for MS sample preparation. Proteins were digested by 5 μ g of trypsin per sample at 37 °C overnight. Phosphopeptides were enriched using TiO₂ according to Humphrey et al. [38].

2.5. Phosphoproteomic Analysis by nLC-MS2

Nano reversed-phase PepMap C18 chromatography columns (EASY-Spray column, 50 cm \times 75 μ m ID, 2 μ m particles, 100 Å pore size) were used for LC/MS analysis. The buffer of mobile phase A consisted of 0.1% formic acid dissolved in water, and mobile phase B consisted of 0.1% formic acid dissolved in acetonitrile. The loading buffer consisting of 2% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid, and water was used to load the samples onto the C18 PepMap100 trap column (5 μ m particle size, 300 μ m \times 5 mm, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)), and sample loading proceeded at 18 μ L/min for 4 min. The gradient of mobile phase B from 2% to 35% B was used to elute the peptides from the column. The eluted peptide cations were converted to gas-phase ions by electrospray ionization and then analyzed using a Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific). The Orbitrap was set to a resolution of 120 K (at 200 m/z) with an ion count of 1×10^6 to perform survey scans of peptide precursors from 350 to 1400 m/z . Tandem MS was performed by isolation at 1.5 Th with the quadrupole, higher energy collisional dissociation fragmentation with a normalized collision energy of 35, and rapid scan MS analysis in the ion trap. The maximum injection time was 150 ms, while the MS2 ion count target was set to 10^4 . For MS2, only the precursors with charge states 2–6 were scanned. The dynamic exclusion time was set to 30 s with a tolerance of 10 ppm for the selected precursor and its isotopes. The cycle time was set to 2 s and the selection of the monoisotopic precursor was activated during the measurement.

2.6. Data Analysis

MaxQuant software (version 1.6.3.4) was used to analyze and quantify the raw data [39]. The false discovery rate (FDR) was set to 1% for both peptides and proteins, while the minimum peptide length was set to seven amino acids. The Rattus norvegicus database was used to search the MS/MS spectra using the Andromeda search engine. Enzyme specificity was set for C-terminal Arg and Lys residues with cleavage at proline bonds. In parallel, a maximum of two failed cleavages were allowed. While carbamidomethylation of cysteine was selected as a fixed modification, N-terminal protein acetylation and methionine oxidation were considered as variable modifications. We used the “match between runs” feature of MaxQuant to transfer identifications based on their masses and retention times (deviation not exceeding 0.7 min) to other LC-MS/MS runs. This approach was also used for quantification experiments. Quantifications were performed using the label-free algorithm in MaxQuant and the Perseus 1.6.1.3 software was used for data analysis [40,41].

Only phosphosites of phosphoproteins whose fold change values were greater than or equal to ± 2 and whose intensities were simultaneously detected in at least two of three independent samples were considered for analysis. The differences between the mean

values of the intensities of the relevant groups were analyzed using GraphPad Prism 8. The significance level was set at $p \leq 0.05$. Phosphoproteins that met our above requirements were further analyzed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID). This bioinformatics database allowed the assignment of proteins to specific biological processes. From this database, the processes involved in signaling transduction associated with small GTPases and MAP kinases were selected and mapped using the String database.

3. Results

3.1. GO Enrichment Analysis of Differentially Phosphorylated Proteins

The aim of this study was to determine how TRH or its analog TAL might affect the phosphosignalosome in the context of biological processes and protein interactions in the pituitary gland, which TRH acts on directly to stimulate thyroid-stimulating hormone production. To this end, we used a rat pituitary tumor cell line (GH1) as a model. The first specific objective was to determine which phosphosignaling pathways are affected by TRH or TAL and what kind of differential changes in phosphosignaling dynamics underlying biased agonism for TRH-R are induced by the two ligands. The next objective was to determine the role of β -arrestin2 in regulating TRH- and TAL-induced phosphosignaling pathways. In the Results section, we focus on the detailed description of the changes induced by TRH or TAL in wild-type or β -arrestin2-deficient cells for each pathway found, including the analysis of the localization and function of some phosphosites. Some descriptive results seen in the figures are mentioned in the Supplementary Results. In the Discussion section, we attempted to relate the results of the different phosphosignaling pathways to more general conclusions to highlight phosphoproteins with significant variations.

To confirm the efficacy of siRNA targeting β -arrestin2, a Western blot analysis was performed with specific antibodies against β -arrestin2 (Figure S1). This analysis showed that transfection of GH1 cells with β -arrestin2 resulted in a reduction in β -arrestin2 expression by more than 60%, without significant parallel change in β -arrestin1 expression. Bioinformatic analysis of data obtained by label-free bottom-up mass spectrometry-based proteomics was performed using the MaxQuant and Perseus software platforms. Differences in phosphoproteomes of control or ligand-treated GH1 cells were sorted as qualitative and quantitative changes. A qualitative change was defined as evidence of presence or absence if certain proteins were detected in only one experimental group from the pairwise comparison and in at least two measured samples of the biological triplicates. A quantitative change was defined as at least twofold difference between two experimental groups and simultaneous detection of phosphopeptides in at least two measured samples of the biological triplicates. To specify the biological processes affected by knockdown of β -arrestin2 and/or treatment with TRH or TAL, the sets of altered phosphoproteins for each experimental group were examined in Gene Ontology (GO) enrichment analysis using the DAVID database v6.8 (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, ncicrf.gov, assessed on 5 November 2021). The GO terms enriched in the experimental groups are related to activation and regulation of GTPase activity (p -values ranging from 1.40×10^{-17} to 4.90×10^{-2}), protein and peptidyl-serine phosphorylation, and the MAPK cascade (p -values ranging from 1.40×10^{-6} to 4.60×10^{-2}).

3.2. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in GTPase-Mediated Signal Transduction and Protein Phosphorylation

The data sets of differentially phosphorylated proteins associated with small GTPase activity and protein phosphorylation consist of 571 phosphosites from 237 phosphoproteins in GH1 cells after siRNA knockdown of β -arrestin2 compared with control GH1 cells (pairwise comparison marked Arr/C) (Tables S1 and S6), 216 phosphosites of 113 phosphoproteins in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TRH compared with control GH1 cells (TRH/C) (Tables S2 and S7), 231 phosphosites of 131 phosphoproteins in GH1 cells after siRNA knockdown of β -arrestin2 and stimulation with 1 μ M TRH compared with GH1 cells

after siRNA knockdown of β -arrestin2 (Arr-TRH/Arr) (Tables S4 and S9), 305 phosphosites of 152 phosphoproteins in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TAL compared with control GH1 cells (TAL/C) (Tables S3 and S8), and 290 phosphosites of 157 phosphoproteins in GH1 cells after siRNA knockdown of β -arrestin2 and stimulation with 1 μ M TAL compared with GH1 cells after siRNA knockdown of β -arrestin2 (Arr-TAL/Arr) (Tables S5 and S10). According to the UniProt database, many phosphorylations were found in disordered regions of proteins. Only some of them were found in functional or binding domains and are directly mentioned below.

The altered phosphoproteins were sorted according to their association with classes of small GTPases. The classes of small GTPases most affected by β -arrestin2 knockdown and/or TRH/TAL were Ras and Rho/Rac/Cdc42. For clarity, the changes in phosphorylation and phosphoprotein associations for each class of small GTPases are shown in Figures 1–10. The altered phosphoproteins associated with catenin signaling are shown in Figure 11. All these figures were created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (assessed on 1 September 2021).

3.2.1. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Ras GTPase-Mediated Signal Transduction Associated with the PI3K/Akt/mTOR Pathway

The changes in phosphorylation of phosphoproteins involved in Ras GTPase signal transduction are shown in Figures 1 and 2 and listed in detail in Tables S1–S10. Figure 1 shows the changes in phosphorylation when the Ras/Raf and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways overlap. It was found that activation of TRH-R by TRH and TAL decreased phosphorylation at Ser94 of B-Raf, and knockdown of β -arrestin2 had no effect on phosphorylation of this phosphosite (Figure 1, Tables S7 and S8). The marked differences between the TRH- and TAL-initiated pathways were evident in the phosphorylation patterns of the upstream and downstream effectors of the mTOR complex. TRH treatment decreased phosphorylation at Ser1389 in the upstream effector TSC2 (Figure 1, Table S2) and at Ser603 in the downstream effector Rps6kc1 (Figure 1, Table S7) and increased phosphorylation at Ser300 in the downstream effector Cdk4 (Figure 1, Table S7), suggesting that phosphorylation at Ser1389 in TSC2 hierarchically precedes phosphorylation at Ser603 in Rps6kc1 and Ser300 in Cdk4. Treatment with TAL only affected the mTOR downstream effector Ulk1 by decreasing phosphorylation at Ser450 (Figure 1, Table S3). Whereas TRH treatment affected the phosphorylation pattern of Rptor, a protein that interacts with mTOR, regulates mTOR kinase activity, and mediates signal transduction through the downstream effector Rps6kc1 [42] by hyperphosphorylating Thr857 and hypophosphorylating Ser859 (Figure 1, Table S9); TAL treatment resulted in only a slight decrease at Ser859 (Figure 1, Table S8). Phosphorylation at Ser859 is known to be mediated by Ulk1 [43]. Rptor is also phosphorylated by 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), resulting in inhibition of mTORC1 [43]. In our study, the catalytic subunit of AMPK, Prkaa1, was hypophosphorylated by TRH at Ser486 and weakly by TAL (Figure 1, Tables S2 and S3). It appears that TRH and TAL act on the activity of the mTORC1 complex in different ways. Whereas TAL appears to act simultaneously on the phosphorylation of Rptor via Ulk1 and AMPK, TRH affects the phosphorylation of Rptor only via AMPK. The phosphosites Ser450 and Ser486 in Ulk1 and AMPK, respectively, are the key sites for regulating the phosphorylation and activity of Rptor. The phosphorylation pattern of Rptor can regulate the activity of the mTORC1 complex, leading to subsequent phosphorylation of various downstream effectors.

Knockdown of β -arrestin2 markedly affected phosphorylation of proteins involved in the Src/EGFR/Ras/PI3K/Akt pathway and downstream effectors of Akt kinase (Figure 1). The Src kinase was hyperphosphorylated at Ser75 (Figure 1, Table S1), which corresponds to Ser75 in human Src with ID P12931. Phosphorylation at this phosphosite is associated only with active Src and is mediated by Cdk5. It promotes ubiquitin-dependent degradation of Src and thus restricts the availability of active Src [44]. This correlates with our finding that knockdown of β -arrestin2 led to dissociation of the β -arrestin2/Src complex and active Src became freely available for phosphorylation at Ser75 and subsequent degradation.

Formation and activation of the β -arrestin/Src complex is essential for epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation and downstream activation of Akt [45]. After knockdown of β -arrestin2, EGFR was hyperphosphorylated at Ser1165 (Figure 1, Table S1), whose function is unknown. However, it seems that it may be related to the change in EGFR transactivation. In contrast to hyperphosphorylation at Ser75 in Src after β -arrestin2 knockdown, treatment with TRH or TAL of β -arrestin2-deficient cells induced hypophosphorylation at this phosphosite (Figure 1, Tables S4 and S5), suggesting that TRH and TAL can alter Src activity in β -arrestin2-deficient cells. However, only TAL induced hypophosphorylation at Ser1165 in EGFR in β -arrestin2-deficient cells (Figure 1, Table S5).

Phosphosite Ser181 in PAK4 is located in the region responsible for PAK4 binding to 14-3-3 proteins and its phosphorylation is promoted by PI3K signaling [46]. In the present study, PI3K was not differentially phosphorylated but PAK4 was hyperphosphorylated at Ser181 in β -arrestin2-deficient cells (Figure 1, Table S6). This phosphoresidue corresponds to Ser181 in human Pak4 with ID O96013. Akt1 kinase was hyperphosphorylated after knockdown of β -arrestin2 at Ser124, Ser126, and Ser129 (Figure 1, Table S1). These phosphosites are located in a linker region that is expected to play a role in regulating the conformational states of Akt1 [47]. The phosphosite Ser129 is an important target of casein kinase 2 and its phosphorylation can trigger subsequent phosphorylation at Ser126 of Akt [48]. In our study, both phosphosites in Akt1 were quantitatively hyperphosphorylated at the same level, with a fold change of 155.8 after knockdown of β -arrestin2 (Figure 1, Table S1), which correlates with subsequent hierarchical phosphorylation by casein kinase 2. Casein kinase 2 β (CK2 β) was hyperphosphorylated after knockdown of β -arrestin2 at Ser154 (Figure 1, Table S6). CK2 β , identified via UniProt ID A0A096MJD3, is a 164 amino acid isoform. When comparing the sequence with the human isoform via UniProt ID P67870, the Ser154 phosphosite in CK2 β corresponds to the Ser209 phosphosite in the human isoform, whose phosphorylation is associated with mitosis [49]. Phosphorylation at Ser129 in Akt1 (and possibly at Ser126) is responsible for Akt hyperactivation by CK2 β [48]. Whereas TRH treatment did not affect the phosphorylation pattern of Akt1 and CK2 β , TAL treatment induced hypophosphorylation of Akt1 on Ser124 and Ser126 with concomitant hypophosphorylation of CK2 β on Ser158 (Figure 1, Table S3). All altered phosphoresidues in Akt1 correspond to the same phosphoresidues at the same positions in human Akt with ID P31749.

The hyperphosphorylation pattern at phosphosites Ser124, Ser126, and Ser129 in Akt1 with its subsequent activation may correlate with changes in phosphorylation of downstream effectors such as MAP3K5, MAP3K9, Sik3, Tsc1/2, or proteins that interact with mTOR (Rptor, Rragc, and Lamtor1) and downstream effectors of the mTOR complex (Cdk4, Rps6kc1) (Figure 1, Tables S1 and S6). In β -arrestin2-deficient cells, both ligands induced hypophosphorylation at Ser26 in Lamtor1 (Figure 1, Tables S4 and S5), a component of the regulator complex that binds mTOR complex 1 to lysosomes [50], as well as at Ser94 in Rragc and Thr857 in Rptor (Figure 1, Tables S4 and S5), suggesting that the same putative kinase or phosphatase acts simultaneously on interacting proteins of the mTORC1 complex in β -arrestin2-deficient cells.

AMPK, which affects downstream and upstream effectors and associated proteins of mTOR, was differentially phosphorylated at its catalytic and regulatory subunits Prkaa1 and Prkab1, respectively. Knockdown of β -arrestin2 resulted in hyperphosphorylation at Thr488 in Prkaa1 and at Ser108 in Prkab1 (Figure 1, Table S6). The second phosphosite Ser108, corresponding to Ser108 in human Prkab1 with ID Q9Y478, is located in the carbohydrate-binding module (CBM) and is an autophosphorylation site or can be phosphorylated by Ulk1 [51,52]. Its phosphorylation stabilizes the interaction of the CBM with the kinase domain and increases AMPK activity and affinity for binding of allosteric drugs and metabolites [51–53], suggesting that knockdown of β -arrestin2 causes an increase in AMPK activity and phosphorylation of AMPK substrates, e.g., TSC1, TSC2, Thr857 in Rptor. In β -arrestin2-deficient cells, TRH treatment induced hyperphosphorylation at Thr526, whereas TAL treatment caused hyperphosphorylation at Thr526 and Ser527 and hypophos-

amino acid residues (S, serine; T, threonine; Y, tyrosine) and the number that determines the position in the amino acid sequence of the protein. Small up and down arrows represent an increase and a decrease in phosphorylation, respectively. Two or one arrows represent qualitative and quantitative changes, respectively. The five pairwise experimental groups are distinguished by color (β -arrestin2 knockdown to control, red; TRH to control, yellow; β -arrestin2 knockdown + TRH to control, brown; TAL to control, blue; β -arrestin2 knockdown + TAL to control, green). Associations between proteins are shown by arrows that determine stimulatory or inhibitory effects. Red arrows and crosses represent confirmed relationships between phosphorylation on the protein phosphosite and the phosphorylating kinase or downstream protein. Associations and interactions between proteins were ordered according to [44–48,50,52,54–72]. Abbreviations: AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase; CDK4: cyclin-dependent kinase 4; CK2 β : casein kinase 2 β ; EGFR: epidermal growth factor receptor; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1; GPCR: G-protein coupled receptor; Map3k: mitogen-activated protein kinase kinase kinase; Map4k: mitogen-activated protein kinase kinase kinase; MEK1/2: dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1; mTOR: mechanistic target of rapamycin; PAK4: serine/threonine p21-activated kinase 4; PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; RPS6K1: ribosomal protein S6 kinase C1; Stk3: serine/threonine protein kinase 3; Rptor: regulatory-associated protein of mTOR; Rragc: Ras-related GTP-binding protein C; Src: proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; Taok3: serine/threonine protein kinase thousand and one amino acid protein 3; TSC: tuberous sclerosis protein; Ulk1: Unc-51-like kinase 1.

3.2.2. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Ras GTPase-Mediated Signal Transduction Associated with the Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/ERK Pathway

Figure 2 shows the changes in phosphorylation of members of the Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways. Although the adapter protein Grb2, which mediates signal transduction from the activated membrane receptor to Ras, was not directly affected by the phosphorylation changes, its upstream and downstream interacting partners Gab1 and Sos1, respectively, were differentially phosphorylated. After TRH treatment, the docking protein Gab1 was hypophosphorylated at Ser438 (Figure 2, Table S7), which is located upstream near a Met-binding domain (MBD) [73] and corresponds to Ser439 in human Gab1 with ID Q13480. In contrast, the second interaction partner, Sos1, was affected to a greater extent, as β -arrestin2 knockdown caused differential phosphorylation of seven phosphosites (Ser1078, Ser1082, Thr1249, Ser1251, Thr1255, Ser1318, Ser1319) (Figure 2, Table S1) located in the C-terminal G domain containing the Grb2 binding site [74]. While Ser1078 and Ser1082 correspond to the same phosphoresidues at the same positions in human Sos1 with ID Q07889, Thr1249, Ser1251, Thr1255, Ser1318, and Ser1319 correspond to Thr1263, Ser1265, Thr1269, Ser1332, and Ser1333, respectively. Docking of this region in Sos1 to Grb2, which binds to the activated receptors, mediates the primary anchoring of Sos1 to the plasma membrane [75] suggesting that the presence of β -arrestin2 is essential for the formation and/or function of the Grb2/Sos1 complex. Whereas no change in phosphorylation of Sos1 was detected after TRH treatment, treatment with TAL resulted in a slight hypophosphorylation at Ser1078 and Ser1082 (Figure 2, Table S3). In contrast to this difference, phosphorylation patterns were very similar after TRH or TAL treatments of β -arrestin2-deficient cells. Both ligands caused hyperphosphorylation at Ser1072 and at Ser1082 and hypophosphorylation at Thr1255; only Ser1319 was hyperphosphorylated after treatment with TAL (Figure 2, Tables S4 and S5). It is evident that the presence of β -arrestin2 diversifies the signaling triggered by TRH receptors activated by TRH or TAL and that its absence abolishes the differences.

The MEK1/2 and ERK1/2 kinases were not directly affected in their phosphorylation patterns, but their interacting partners and downstream effectors were differentially phosphorylated. Two pseudokinases, the kinase suppressors of Ras 1 and 2 (KSR1 and KSR2), serve as scaffolds linking Raf isoforms and their substrates [76]. The KSR2 protein was hyperphosphorylated at Thr272 and Thr276 in β -arrestin2-deficient cells and

hypophosphorylated at Thr276 in TAL-treated cells and at Thr272 in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 2, Tables S1, S3 and S5). These phosphosites are located outside the binding sites with Raf, MEK, and ERK [77]. The interacting protein of KSR1, connector enhancer of kinase suppressor of Ras1 (Cnksr1), was hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells at Thr284 and Ser288 (Figure 2, Table S1). In contrast, phosphosite Thr284 was hypophosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 2, Table S5). These phosphosites in Cnksr1 are located in disordered regions outside the domain structures [78].

The activated ERK phosphorylates many substrates, including Rps6ka3 (Rsk2) [79], Rreb1 [80], and Cdk4 [64]. The data suggest that the transcription factor Rreb1, which is differentially phosphorylated in all five experimental groups, plays a key role in signaling triggered by TRH or TAL, and that β -arrestin2 is a mediator of this signaling, possibly affecting Rreb1 function.

Doublecortin-like kinase protein 1 (Dclk1) was found to be differentially phosphorylated on ten phosphosites with different phosphorylation patterns under different experimental conditions (Figure 2, Tables S1–S5). All phosphosites corresponding to the same residues at the same positions in human Dclk1 with ID O15075 are located in a Pro-Ser-rich linker targeted by calpain for proteolytic cleavage and involved in the regulation of Dclk1 kinase activity and tubulin polymerization [81–83]. Interestingly, knockdown of Dclk1 resulted in downregulation of KRas and Rreb1 [84], suggesting that if phosphorylation in the Pro-Ser-rich linker is related to Dclk1 proteolysis, expression of KRas and Rreb1 can also be affected. The Dclk1 and Rreb1 proteins represent other key points of differential effects of TRH and TAL on signaling pathways. Downregulation of Dclk1 resulted in increased expression of the miR-143/145 cluster and downregulation of its downstream targets KRas and Rreb1 [84]. The transcription factor Rreb1 is activated by the MAPK pathway and negatively regulates the miR-143/145 promoter by binding to the Ras responsive element (RRE), thereby increasing the expression of KRas and Rreb1 [85].

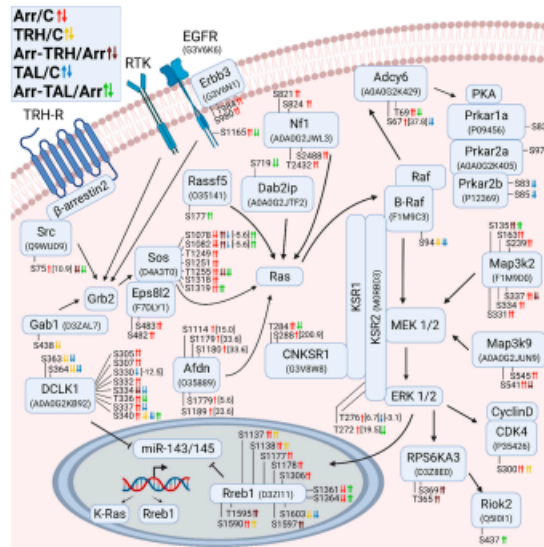


Figure 2. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Ras GTPase-mediated

signal transduction associated with Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/ERK. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [60,64,65,76,79,80,84–89]. Abbreviations: Afdn: afadin; Adcy6: adenylyl cyclase 6; Cnksr1: connector enhancer of kinase suppressor 1; Dab2ip: disabled homolog 2-interacting protein; Dclk1: doublecortin-like kinase 1; Eps8l2: epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2; Erbb3: receptor tyrosine-protein kinase erbB-3; Gab1: Grb2-associated-binding protein 1; Grb2: growth factor receptor-bound protein2; KSR: kinase suppressor of Ras; PKA: cAMP-dependent protein kinase A; Prkar: cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit; Rassf5: Ras association domain-containing protein 5; Nf1: neurofibromin 1; Riok2: serine/threonine protein kinase RIO2; RPS6KA3: ribosomal protein S6 kinase α 3; Rreb1: Ras-responsive element-binding protein 1; Sos: son of sevenless homolog 1.

3.2.3. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Rho GTPase-Mediated Signal Transduction

The second class of small GTPases affected by β -arrestin2 knockdown and/or TRH/TAL treatment is a Rho/Rac/Cdc42 class. The changes in phosphorylation occurred in guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs), and downstream effectors. For clarity, proteins with changes in phosphorylation were sorted according to their association with Rho GTPase (Figure 3), Rac GTPase (Figure 4), and Cdc42 GTPase (Figure 5). The proteins with GEF or GAP activities are highlighted in green and red, respectively. In many cases, phosphoproteins are phosphorylated at phosphosites that are close to each other, forming clusters of phosphosites that are usually phosphorylated with the same phosphorylation patterns.

When proteins with GEF or GAP activities were compared, the larger set of GEFs that activate Rho GTPases were found to be differentially phosphorylated. β -Arrestin2 knockdown resulted in hyperphosphorylation of GEFs and GAPs, whereas treatment of wild-type cells with TRH and TAL resulted in hypophosphorylation of GEFs and GAPs. Treatment with TAL had a more pronounced effect on differential phosphorylation of GEFs than treatment with TRH (Figure 3).

Of the phosphosites with changes in phosphorylation in GEFs, only one was in functional domains. Phosphosite Ser48 in dishevelled segment polarity protein 3 (Dvl3) was hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells (Figure 3, Table S1) and was located in the DIX domain in the N terminus that binds to the DIX domain in Dvl1 [90]. It corresponds to Ser48 in human Dvl3 with ID Q92997. Other phosphosites were located in disordered regions by determining their positions using the UniProt database.

All GAPs were also differentially phosphorylated at phosphosites located in disordered regions by determining their position using the UniProt database. The two GAPs, Myo9b and Arhgap35, were hypophosphorylated at several phosphosites after TRH or TAL treatments (Figure 3, Tables S2 and S3), but knockdown of β -arrestin2 abolished the decreased phosphorylation induced by TRH or TAL, except for hyperphosphorylation at Ser1982 in Myo9b after TAL treatment (Figure 3, Table S5). In addition to GEFs and GAPs, several Rho-GTP downstream effectors and their associated proteins were differentially phosphorylated (Figure 3).

Whereas TRH and TAL treatments caused hypophosphorylation of Rho downstream effectors in wild-type cells, they affected phosphorylation of effectors in both directions in β -arrestin2-deficient cells. The phosphosite Ser1124 in Rock2 was hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells and in wild-type cells treated with TRH or TAL, but hypophosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH or TAL (Figure 3, Tables S1–S5). Three downstream Map3 kinases (Map3k5, Zak, Map3k7) were differentially phosphorylated (Figure 3, Tables S6, S8 and S10). In β -arrestin2-deficient cells, TRH and TAL induced changes in phosphorylation of Ser/Thr protein kinase 1 (Pkn1) and protein kinase C ϵ (Figure 3, Tables S9 and S10). According to the UniProt database, the differentially phosphorylated phosphosite Ser920 in Pkn1 is located in the C-terminal domain of the AGC kinase and corresponds to Ser916 in human Pkn1 with ID Q16512. The most affected

protein kinase is protein kinase D1 (PKD1), which was differentially phosphorylated in three phosphorylation clusters.

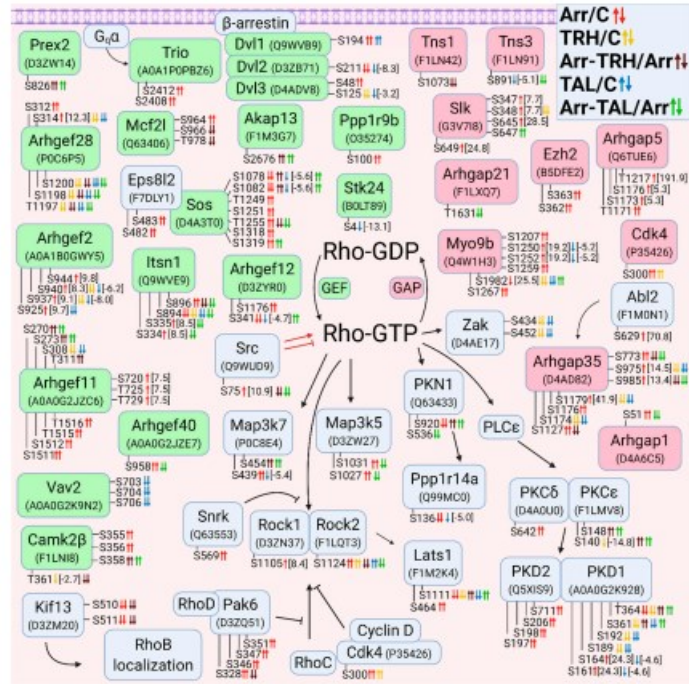


Figure 3. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Rho GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [44,69,91–117]. Abbreviations: Abl2: Abelson tyrosine-protein kinase 2; Akap13: A-kinase anchor protein 13; Arhgef: Rho guanine nucleotide exchange factor; Arhgap: Rho GTPase-activating protein; Camk2β: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit β; Dvl: dishevelled protein; Ezh2: histone-lysine N-methyltransferase; Kif13: kinesin family member 13A; Mcf2l: Mcf2-transforming sequence-like protein; Myo9b: unconventional myosin-Ixβ; Itsn: intersectin; Pak6, p21-activated kinase 6; PKN1: serine/threonine-protein kinase N1; PLCε: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase ε; PKCδ: protein kinase Cδ; PKCε: protein kinase Cε; PKD: serine/threonine-protein kinase D; Ppp1r14a: protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A; Ppp1r9b: neurabin-2; Prex2: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein; Rock: Rho-associated protein kinase; Silk: STE20-like serine/threonine-protein kinase; Snrk: SNF-related serine/threonine-protein kinase; Stk24: serin/threonine-protein kinase 24; Tns: tensin; Trio: Triple functional domain protein; Zak: leucine zipper- and sterile α motif-containing kinase.

3.2.4. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Rac GTPase-Mediated Signal Transduction

Overall, treatment with TRH and TAL induced hypophosphorylation of GEFs, GAPs, and downstream effectors of Rac GTPases (Figure 4). The number of GEFs and GAPs with changes in phosphorylation pattern was similar (Figure 4). Several GEFs that affect the activity of Rho GTPases (e.g., dishevelled proteins, Prex2, Camk2 β , Mcf2l, and Vav2) are also known to control the GTP/GDP cycle of Rac GTPases [94,95,101,110]. Treatment with TAL strongly affected the phosphorylation pattern of Vav2, Dvl1, Dvl2, and CK2 β (Figure 4, Tables S3 and S8). CK2 β is a subunit of casein kinase 2 that phosphorylates Dvl proteins, resulting in a change in the signaling function of Dvl and displacing it from the Rac1 pathway [118]. CK2 β was hyperphosphorylated and hypophosphorylated at Ser154 in β -arrestin2-deficient cells and after treatment with TAL, whereas phosphosite Ser158 was hypophosphorylated after treatment with TAL (Figure 4, Tables S6, S8 and S10). Comparison of the sequences in the UniProt database revealed that this phosphosite Ser158 in rat CK2 β with protein ID A0A096MJD3 corresponds to Ser209 in the C-terminal end of human CK2 β with ID P67870. Phosphorylation at Ser209 in human CK2 β is mediated by p34cdc2 (Cdk1) [49].

The most important Rac GEF appears to be Dock7, which was differentially phosphorylated in all five pairwise experimental groups (Figure 4, Tables S1–S5), resulting in different phosphorylation patterns. The GAP proteins were frequently affected by both TRH and TAL treatments (Figure 4, Tables S1–S5). The Ser/Thr protein kinase Wnk2 was differentially phosphorylated in the first phosphorylation cluster located in the N-terminus [119] in wild-type cells treated with TAL and in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH (Figure 4, Tables S3 and S4). However, treatment with TAL of β -arrestin2-deficient cells induced hypophosphorylation of Wnk2 (Figure 4, Table S5) in the region between the conserved region 3 and the WNK homology region III [119]. Wild-type cells treated with TRH exhibited changes in phosphorylation in both clusters (Figure 4, Table S2).

Several upstream and downstream Rac GTPase effectors were found to be differentially phosphorylated (Figure 4). The ErbB2 receptor was hypophosphorylated after treatment with TAL (Figure 4, Table S3). ErbB2-mediated signaling involves the PI3K-Rac-Pak pathway and stabilizes an actin cytoskeletal complex containing PI3K, Vav2, Rac1, and Pak1 [120]. In our study, treatment with TAL affected the phosphorylation patterns of ErbB2, Vav2, Pak1, and Pak2 (Figure 4, Tables S3 and S8), suggesting that Pak2 may be involved in this pathway. In contrast to Pak2, which was affected only by TAL, TRH treatment caused hypophosphorylation on Ser174, Ser219, and Ser228 in wild-type Pak1 but TAL only on Ser219 (Figure 4, Tables S7 and S8). This protein was also hypophosphorylated after TRH or TAL treatments of β -arrestin2-deficient cells, but with different phosphorylation patterns (Figure 4, Tables S9 and S10). Rac1 and PAK1 formed a complex with Arhgef7 [121], which is also a regulator of the Hippo pathway involving the Lats1 protein [122]. The downstream effector of Pak2, Map3k1, was hyperphosphorylated at Ser513 after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TAL (Figure 4, Table S10).

Another interacting partner of PI3K with the stimulating effect on Rac activity is the kinase Ptk2 β which was found to be hypophosphorylated at Ser389, Ser392, Ser394, Ser396, and Ser399 in wild-type cells after treatment with TRH or TAL and in β -arrestin2-deficient cells after treatment with TAL (Figure 4, Tables S2, S3 and S5). Two SRSF protein kinases, Srpk1 and Srpk2, involved in Rac1 alternative splicing [123] were found to be differentially phosphorylated (Figure 4).

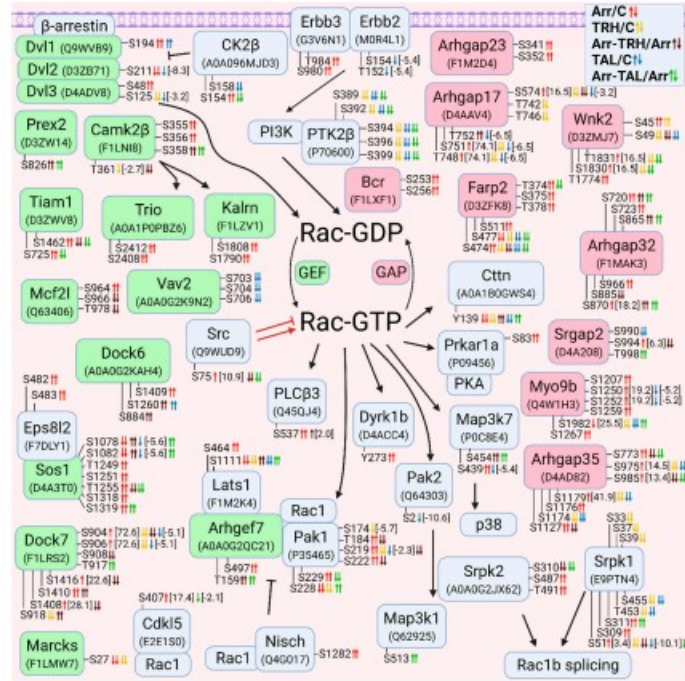


Figure 4. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Rac GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [44,72,94,98,100,102,110,111,114,117–119,121–145]. Abbreviations: Cdkl5: cyclin-dependent kinase-like 5; Cctn: Src substrate contactin; Dock: dedicator of cytokinesis protein; Dyrk1b: dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B; Farp2: FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 2; Kalm: kalirin; Marcks, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate; Nisch: nischarin; Pak1: p21-activated kinase 1; Pak2: p21-activated kinase 2; PLCβ3: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase β3; Ptk2β: protein-tyrosine kinase 2β; Srgap2: SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2; Srpk: SRSF protein kinase; Tiam1: TIAM Rac1-associated GEF 1; Wnk2: serine/threonine-protein kinase with no lysine 2.

3.2.5. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Cdc42 GTPase-Mediated Signal Transduction

Most Cdc42-GEFs were differentially phosphorylated compared with Cdc42-GAPs (Figure 5). Some Cdc42-GEFs also activate Rac (Dock6, Dock7, Tiam1, Marcks), Rho (Itsn1), or both Rac and Cdc42 (Dvl1–Dvl3, Prex2, Mefl2) (Figures 3–5). The Cdc42-GEF Farp2 is also a GAP for Rac (Figures 4 and 5). The long variant of Arhgef7 (βPIX, UniProt ID A0A0G2QC21) with 862 amino acids and a calponin homology (CH) domain at the N terminus was hyperphosphorylated at Thr159 in β-arrestin2-deficient cells treated with TRH or TAL and at Ser497 in β-arrestin2-deficient cells (Figure 5, Tables S1, S4 and S5). The phosphosite Thr159 is located between the domains CH and SH3 (according to the UniProt database). Comparison of the evolutionarily conserved sequence ASPRM³⁴⁰SGFIYQ [146] with the sequence position of differentially phosphorylated Ser497 revealed that phospho-

site Ser497 in the long variant of Arhgef7 with 862 amino acids corresponds to phosphosite Ser340 in the conserved sequence ASPRM340SGFIYQ. This phosphosite, corresponding to Ser518 in human Arhgef7 with ID Q14155, is located in the domain PH, which interacts with phosphatidylinositol lipid in membranes, PKC and Cdc42 and is involved in the regulation of GEF activity of Sos [146]. Phosphorylation of Ser340 is indirectly mediated by PKC and involved in the regulation of dopamine release [146].

Arhgef7 also interacts with several binding partners, such as Git1, Scribble, Pak kinases, Rac1, and Cblb [121,147]. Git1 was differentially phosphorylated in two phosphorylation clusters (Figure 5). The first cluster (Ser376, Ser379, Thr383) was affected in all five pairwise experimental groups. Whereas knockdown of β -arrestin2 or treatment with TAL induced hyperphosphorylation, treatment of wild-type and β -arrestin2-deficient cells with TRH caused hypophosphorylation (Figure 5, Tables S1–S5). The second cluster (Ser583, Ser587, Tyr589) was hyperphosphorylated after β -arrestin2 knockdown (Figure 5, Table S1). These three phosphoresidues correspond to Ser592, Ser596, and Tyr598 in human Git1 with ID Q9Y2X7. Comparison of the conserved sequences in Git1 [148], with the sequence location of the detected phosphosites with changes revealed that these phosphosites are located in the SLD domain that Git1 localizes to synapses [148]. Comparison of the two amino acid sequences revealed that the phosphosites Ser376, Ser379, Thr383 and Ser583, Ser587, Tyr589 found in Git1 (Figure 5) match Ser394, Ser397, Thr401 and Ser601, Ser605, Tyr607, respectively, in Git1 described by Webb et al. [148]. The putative kinases of Ser601 or Tyr607 (Ser583 and Tyr589 in the second cluster in our study) were determined to be PKC, PKA, GSK3, and EGFR, respectively [148]. In our study, EGFR, the regulatory subunits of PKA (Prkar1a, Prkar2a; Figure 2), and protein kinase C δ (PKC δ , Figure 3) were changed in β -arrestin2-deficient cells (Tables S1 and S6). Scrib was differentially phosphorylated in three phosphorylation clusters (Figure 5). The first and second clusters were affected in β -arrestin2-deficient cells with or without ligand treatment (Figure 5, Tables S1, S4 and S5). The phosphosite Ser1483 in the third cluster was hypophosphorylated after treatment with TAL (Figure 5, Table S3). All phosphosites are located outside the PDZ domain (protein ID A0A0G2QC21; UniProt database) through which Scrib binds to Arhgef7 [145]. The Scrib-Arhgef7-Git1 complex is involved in vesicle transport in neurons and its binding partners are Pak kinases activated by Cdc42 or Rac [145].

Cblb belongs to ubiquitin E3 ligases of the Cbl family, which bind to Arhgef7 after Cdc42 activation, leading to an increase in GEF activity of Arhgef7 in a positive feedback loop [147]. Cblb was hypophosphorylated at Ser476, Ser480, Ser483, and Ser484 after TRH or TAL treatment in wild-type cells, whereas these phosphosites were hyperphosphorylated in different phosphorylation patterns after TRH or TAL treatment in β -arrestin2-deficient cells (Figure 5, Tables S2–S5). Ser484 is phosphorylated by an unknown kinase and its phosphorylation creates a GSK3 consensus phosphorylation site on Ser480 [149]. Ser480 was found to be phosphorylated by GSK3, creating another GSK3 consensus phosphorylation site on Ser476, which in turn is phosphorylated by GSK3. Phosphorylation of both sites is required for maintenance of Cblb stability [149]. All four phosphoresidues correspond the same residues at the same positions in human Cblb with ID Q13191.

Only five Cdc42-GAPs were differentially phosphorylated (Figure 5, Tables S1–S5). All Cdc42-GAPs inactivated not only Cdc42 but also Rac and/or Rho GTPases (Figures 3–5). The affected Cdc42 downstream effectors included Pak kinases (Pak1, Pak2, and Pak6), Map3k7, Cdc42-binding protein kinases (Cdc42bpa, Cdc42bpb), and Cdc42 effector protein (Cdc42ep4) (Figure 5, Tables S1–S5).

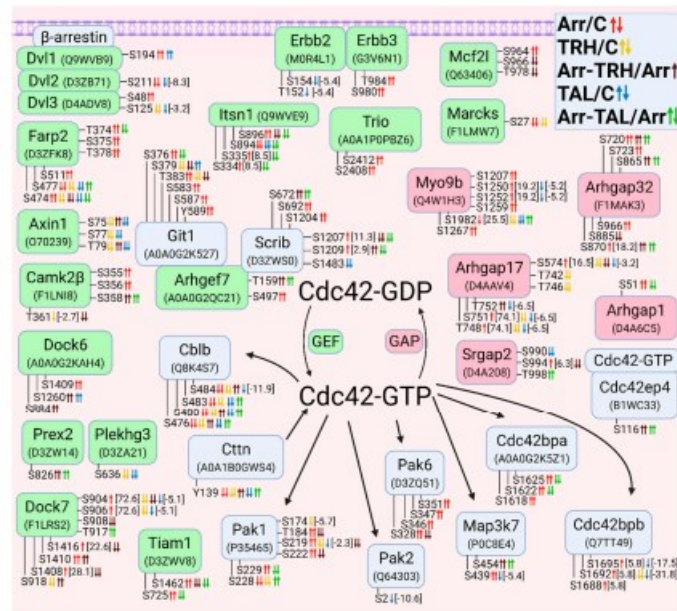


Figure 5. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Cdc42 GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were arranged according to [94,101,107,111,114,117,121,124,128,129,133,137,140,144,145,150–157]. Abbreviations: Cblb: E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B; Cdc42bpa: Cdc42-binding protein kinase α ; Cdc42bpb: Cdc42-binding protein kinase β ; Cdc42ep4: Cdc42 effector protein 4; Git1: ARF GTPase-activating protein GIT1; Plekhg3: pleckstrin homology domain-containing family G member 3; Scrib: protein scribble homolog.

3.2.6. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Arf GTPase-Mediated Signal Transduction

As mentioned above, Arhgef7 is a binding partner for Scrib and Git1 and a scaffold for members of the Hippo pathway (Lats1, Stk3). Git1/2 are proteins with GAP activity for Arf GTPases [147]. The Git1-Arhgef7 complex regulates the activity of Arf6 to control phospholipase C (PLC δ), which promotes vesicle fusion with the membrane [147]. In our study, PLC δ 1 was differentially phosphorylated in a phosphorylation cluster (Figure 6). While Ser454 and Ser460 were hyperphosphorylated in wild-type cells after ligand treatment, knockdown of β -arrestin2 abolished these increased phosphorylations and caused hyperphosphorylation at Thr457 only after treatment with TAL (Figure 6, Tables S2, S3 and S5).

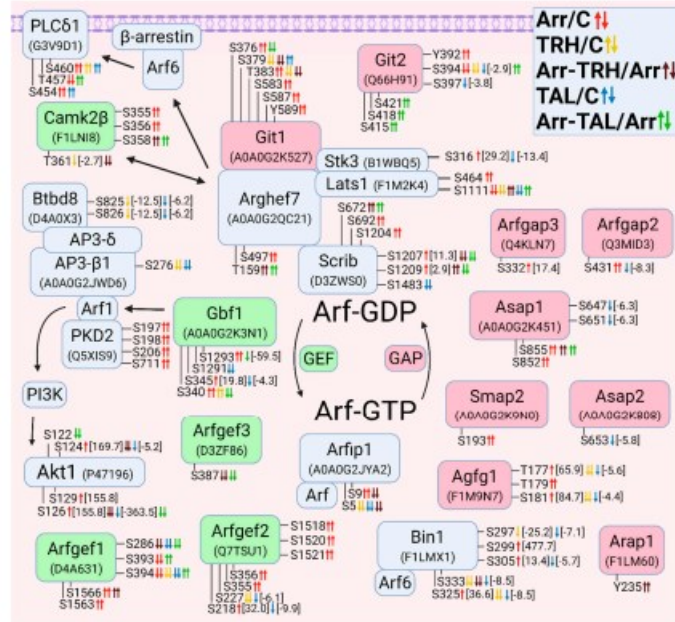


Figure 6. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Arf GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [145,147,158–164]. Abbreviations: Agfg1: Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1; AP3: adaptor complex protein 3; Arap1: Arf GAP with RhoGAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1; Arf GAP: ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein; Arfgef: Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein; Arfip1, arfaptin 1; Asap1: ArfGAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein; Bin1: Myc box-dependent-interacting protein 1; Btdb8: AP2-interacting clathrin-endocytosis protein; Gbf1: Golgi brefeldin A-resistant guanine nucleotide exchange factor 1; PLCδ1: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase δ1; Smap2: Small Arf GAP.

Five proteins with GEF activity for Arf proteins were found to have differential phosphorylation. Gbf1, an Arf1 GEF, was hyperphosphorylated after β-arrestin2 knockdown and after TRH treatment of wild-type cells and hypophosphorylated in wild-type and in β-arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 6, Tables S1–S3 and S5). Arf1 interacts with protein kinase D2 [158]. In our study, PKD2 was hyperphosphorylated after β-arrestin2 knockdown (Figure 6, Table S6). Arf1 activates PI3K with subsequent phosphorylation of Akt [159]. Arf1 interacts with AP3 complex via its β-subunit [160]. Btdb8 protein (APache, Kiaa1107) interacts with the δ subunit of AP3 [161]. Both AP3-β1 and Btdb8 were found to be hypophosphorylated in wild-type cells after treatment with TRH or TAL (Figure 6, Table S11).

Three Arfgef proteins were found to be differentially phosphorylated, Arfgef1 and Arfgef2 in three phosphorylation clusters. More Arf-GAPs were differentially phosphorylated than Arf-GEFs (Figure 6). Git2 was differentially phosphorylated in two phosphorylation clusters. In the first cluster (Tyr392, Ser394, and Ser397) it was differentially phosphorylated in β-arrestin2-deficient cells, hypophosphorylated after treatment with TRH or

TAL, and hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 6, Tables S1–S3 and S5). In the second cluster (Ser415, Ser418, and Ser421) it was hyperphosphorylated only in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 6, Table S5). By sequence comparison, Ser394 and Ser397 in *Git2* correspond to Ser376 and Ser379 in *Git1*, respectively (protein IDs A0A0G2K527 and Q66H91; UniProt Database) [148]. Tyr392 is phosphorylated by Src/FAK kinases and is required for binding to paxillin at focal adhesions and binding to the SH2-SH3 adaptor proteins Nck1 and Nck2 [147]. Phosphorylated Ser415 is a binding site for 14-3-3 proteins [147]. All six altered phosphoresidues in *Git2* correspond to the same residues at the same positions in human *Git2* with ID Q14161.

3.2.7. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Rab GTPase-Mediated Signal Transduction

Rab GTPases are important regulators of membrane transport and are involved in membrane fission, transport, tethering, docking, and fusion [165]. In our study, many phosphoproteins involved in membrane trafficking by Rab GTPases were differentially phosphorylated (Figure 7). The process of membrane trafficking begins with early endocytosis, which is regulated by Rab5 GTPases localized in early endosomes (EEs) [166]. Phosphorylation patterns of Rab5-associated proteins (Rabep1, Rabep2, Itsn2, Gapvd1, and PLC β 3) were markedly affected in β -arrestin2-deficient cells (Figure 7, Tables S1 and S6). Rabep1, Rabep2, Itsn2, and Ulk1 were hypophosphorylated in wild-type cells after treatment with TAL (Figure 7, Tables S3 and S8), and treatment with TRH had an effect only on Gapvd1 phosphorylation in wild-type and β -arrestin2-deficient cells (Figure 7, Tables S2 and S4). Rabep1, Rabep2, Gapvd1, and Ulk1 regulate Rab5 activity or localize and recruit Rab5 to different intracellular compartments and are thus involved in the formation of early endosomes [166–169]. Intersectin-2 (*Itsn2*) interacts with Rabep1 and stimulates Rabep1 degradation to regulate endocytosis and endosome transport [166]. Rabep1 was differentially phosphorylated in the Rabapin domain (protein ID G3V9J7; UniProt Database). The phosphoresidues Ser407 and Thr408 correspond to Ser407 and Thr408 in human Rabep1 with ID Q15276. Rabep1 was shown to be a downstream effector of phospholipase C β 3 (PLC β 3). Activation of the G α q protein via the protease-activated receptor induces phosphorylation of PLC β 3 at Ser537, which is located in the X-Y linker that is close to the C-terminal coiled-coil domain of PLC β 3 and the N-terminus of the G α q protein in the crystal structure of the complex [170,171] and corresponds to the same phosphoresidue at the same position in human PLC β 3 with ID Q01970. At the same time, Rabep1 was found to be hypophosphorylated at Ser407, in parallel with hyperphosphorylation of protein kinase D1 at Ser745 and Ser910 [171]. In our study, these two phosphosites in Rabep1 were differentially phosphorylated after knockdown of β -arrestin2, but Ser407 was slightly hyperphosphorylated (Figure 7) and protein kinase D1 was not differentially phosphorylated at Ser745 and Ser910 (Figure 3), suggesting that activation of G α q protein via TRH-R and subsequent PLC β 3 phosphorylation at Ser537 involves the other downstream mechanism of Rabep1 phosphorylation. The data suggest that TAL and, to a lesser extent, TRH regulate Rab5 activity and early endosome formation and that this effect is abolished by β -arrestin2 deficiency.

Rabenosyn (*Rbsn*) serves as a molecular link between Rab5 and a specific phosphatidylinositol 3-kinase called hVPS45 and is recruited to early endosomes in a PI3K-dependent manner [172]. It also binds to Rab4 [173]. In our study, it was differentially phosphorylated in wild-type cells after treatment with TAL and after knockdown of β -arrestin2 without or with subsequent ligand treatment (Figure 7, Tables S1 and S3–S5). The differentially phosphorylated phosphosites Ser208, Ser216, and Ser218 are located in the FYVE finger domain [173], which is essential for the rabenosyn recruitment to PI3P-enriched Rab5 endosomes [172]. They correspond to Ser209, Ser217, and Ser219 in human Rabenosyn with ID Q9H1K0.

The other interacting Rab protein, nischarin (*Nisch*), interacts with Rab4, Rab9, and Rab14 localized to endosomes and can be localized to endosomes by binding PI3P through

its PX domain [130]. In our present study, Nisch was hyperphosphorylated at Ser1282 after knockdown of β -arrestin2 (Figure 7, Table S1). This phosphosite is located in the C-terminal domain (CTD) responsible for interaction with Rab14, Rab4, Rab9, and GTP-Rac1 [130] and corresponds to Ser1284 in human Nischarin with ID Q9Y2I1.

The early endosomes can be recycled to the plasma membrane via recycling endosomes [174]. Dennd6a (FAM116A) has GEF activity toward Rab14 and, to a lesser extent, Rab35, and is required for recruitment of Rab14 to recycling endosomes [175]. In our study, Dennd6a was hyperphosphorylated or hypophosphorylated at N-terminal phosphosites after β -arrestin2 knockdown and after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TAL (Figure 7, Tables S1 and S5). Rab11 and Rab35 are the essential Rabs involved in endosome recycling to the plasma membrane [165]. Three proteins associated with Rab35 were found to be differentially phosphorylated. Dennd1a, which was hyperphosphorylated and hypophosphorylated in the disordered region at Ser521 after β -arrestin2 knockdown and in wild-type cells treated with TAL (Figure 7, Table S1 and S3), is a Rab35-GEF that recruits Rab35 to clathrin-coated pits in early endosomes and activates Rab35 primarily to enable the formation of membrane carriers that mediate recycling of selective cargo [176]. Tbc1d10a and Tbc1d10b are Rab35 GAPs that control the formation of recycling carriers from endosomes [176]. While Tbc1d10a was differentially phosphorylated only at Ser45 in the N-terminal disordered region after treatment with TRH or TAL and by β -arrestin2 knockdown (Figure 7, Tables S1–S3), Tbc1d10b was differentially phosphorylated at eight phosphosites, with TAL treatment of wild-type or β -arrestin2-deficient cells having the greatest effect (Figure 7, Tables S1–S3 and S5).

Rabgap1 and Tbc1d9b have GAP activity to Rab11 [177,178]. Phosphosites Ser988 and Thr992 in Rabgap1 were hypophosphorylated after β -arrestin2 knockdown and after treatment with TRH or TAL and hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 7, Tables S1–S3 and S5). Tbc1d9b was hypophosphorylated at Ser1084 after treatment with TRH and hyperphosphorylated at Ser1089 in β -arrestin2-deficient cells after treatment with TAL (Figure 7, Tables S2 and S5), suggesting that TRH treatment and β -arrestin2 knockdown may affect GTP hydrolysis of Rab11. Rab11fip proteins serve as effectors of Rab11 and regulate trafficking by recycling endosomes [179]. In wild-type cells, both Rab11fip1 and Rab11fip5 were hypophosphorylated after treatment with TRH and TAL; however, knockdown of β -arrestin2 had an effect only on Rab11fip1 phosphorylation (Figure 7, Tables S1–S5). Phosphoresidues Thr972, Ser973, and Ser978 correspond to Thr974, Ser975, and Ser980, respectively, in human Pdzd8 with ID Q8NEN9.

Rab7 regulates cargo transport from early endosomes to late endosomes and subsequently for degradation in lysosomes [180]. An interacting Rab7 protein, PDZD8, was found to be differentially phosphorylated in two phosphorylation clusters (Figure 7). The phosphosites in the second cluster are located in the area between regions C1 and CC, which is responsible for the interaction of GTP-Rab7 with late endosomes [181].

Autophagy is responsible for the degradation of intracellular components by transporting them to lysosomes to maintain cellular homeostasis [180]. Rab12 is an autophagic regulator that controls the degradation of an amino acid transporter [182]. In our study, Rab12 was hyperphosphorylated at Ser20 and Ser24 in its N-terminal disordered region (Figure 7, Table S1). One of the major sensors of intracellular amino acid levels is mTORC1 [183], whose components and associated proteins were differentially phosphorylated (Figure 1). mTORC1 activity is regulated by Rab12 [182]. Ulk1, which is regulated by mTORC1, is involved in the initiation of autophagosome formation and autophagosome-lysosome fusion [184,185]. However, it is not clear whether phosphorylation of Ulk1 on Ser450 and of Rab12 on Ser20 and Ser24 has effects on autophagy processes.

Several Rab proteins are associated with the Golgi network [165,183]. Dennd5a was hyperphosphorylated after β -arrestin2 knockdown at Thr1079 and Ser1085 but hypophosphorylated in β -arrestin2-deficient cells after treatment with TAL (Figure 7, Tables S1 and S5). Dennd5a binds to Rab11 and Rab6 [186]. Both altered phosphosites are located between the PLAT and RUN2 domains (protein ID G3V7Q0; UniProt Database), outside the uDENN

(upstream DENN) module interacting with Rab11 [186], suggesting that the altered phosphorylation pattern may be associated with Rab6 in the Golgi rather than Rab11. They correspond to the same residues at the same positions in human Dennd5a with ID Q6IQ26. A vesicle transport pathway from the trans-Golgi network to the plasma membrane is mediated by secretory vesicles via Rab3 and Rab27, whose activities are influenced by Madd [180,187].

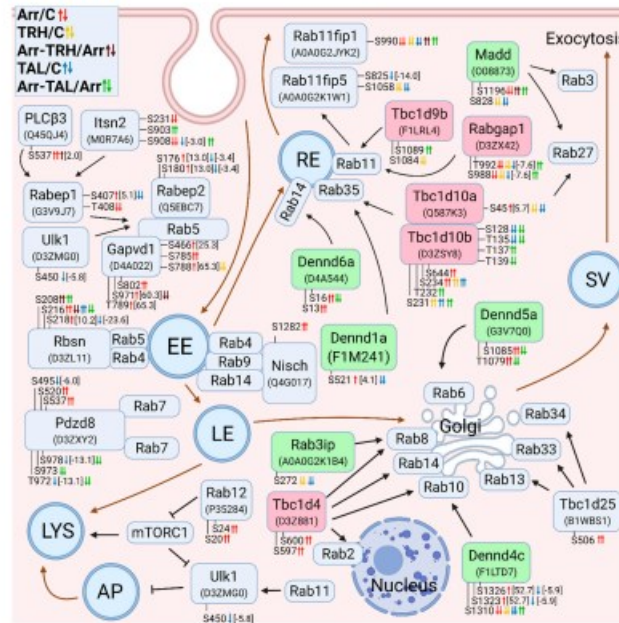


Figure 7. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Rab GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [130,165–167,169,172,173,176,178,179,181–183,187–193]. Abbreviations I: AP: autophagosomes; EEs: early endosomes; LEs: late endosomes; LYS: lysosomes; REs: recycling endosomes; SVs: secretory vesicles. Abbreviations II: Dennd: DENN domain-containing proteins; Gapvd1: GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1; Madd: MAP kinase-activating death domain protein; Pdzd8: PDZ domain-containing protein 8; Rabep: Rab GTPase-binding effector protein; Rabgap: Rab GTPase-activating protein 1; Rab3ip: Rab-3A-interacting protein; Rab11fip: Rab11 family-interacting proteins; Rbsn: rabenosyn-5; Tbc1d: TBC1 domain family members.

3.2.8. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Ral GTPase-Mediated Signal Transduction

Although only a few proteins associated with Ral GTPases were found to be differentially phosphorylated, some alterations might be associated with a variety of signaling pathways and biological processes. Ralgs2, a GEF protein for RalA [194], was differentially phosphorylated on several phosphosites in sequence from Ser293 to Ser329 in all five pairwise comparisons, with greater effect of TAL than TRH in both cells (Figure 8, Tables S1–S5). The phosphosite Ser329, corresponding to Ser329 in human Ralgs2 with ID Q86X27, is

located in the sequence ³²¹LLPXTPP³²⁹SP with PXXP motif (protein ID Q0VGGK1; UniProt Database) which is required for Grb2 binding and regulation in Ralgs1 [195], suggesting Ralgs2 might also bind Grb2 and this interaction might be regulated by phosphorylation at Ser329.

Ral-binding protein 1 (Ralbp1/Rlip76) was found to be differentially phosphorylated in its N-terminal domain in three phosphorylation clusters (Figure 8, Tables S1 and S3–S5). All phosphoresidues correspond to the same residues at the same positions in human Ralbp1 with ID Q15311. In the first cluster, Ser29 and Ser30 were hyperphosphorylated after knockdown of β -arrestin2 (Figure 8, Table S1). After treatment of β -arrestin2-deficient cells with TRH and TAL, phosphosites Ser30 and Ser34 were hypophosphorylated and hyperphosphorylated, respectively (Figure 8, Tables S4 and S5). Phosphosites Ser29 and Ser30 are responsible for binding ARNO, the ArfGEF that activates Arf6 [196]. In the second cluster, Ser48 and Ser62 were hyperphosphorylated after knockdown of β -arrestin2 and hypophosphorylated after treatment with TAL (Figure 8, Tables S1 and S3). It was shown that phosphorylation at Ser48 was not detected in peptides lacking Ser62, suggesting that phosphorylation of Ser62 is mandatory for Ser48 to be phosphorylated or that Ser62 is constitutively phosphorylated [197]. In the third cluster, Ser92, Ser93, and Ser99 were hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells after treatment with TRH or TAL (Figure 8, Tables S4 and S5). Phosphorylation of Ser99 was not detected in peptides that were not phosphorylated at Ser92 and Ser93, which were always modified simultaneously [197]. Computationally derived putative kinases include MAPK, CK2, and cyclin-dependent kinase [197], suggesting that changes in Ralbp1 phosphorylation may be associated with phosphorylation changes in CK2 and MAPK signaling pathways (Figures 2–4). The N-terminal sequence of Ralbp1 (residues 1–190) is involved in an interaction with Ras GTPase that leads to ARNO and subsequent activation of Arf6 [196]. Arf6 can regulate Rac1 activity by interacting with kalirin [198]. Arf6-dependent membrane trafficking is associated with the dynamics of Cdc42-positive vesicles and controls the localization of Cdc42 and Arhgef7 [199]. This sequence of Ralbp1 also interacts with the interdomain linker of the μ 2-subunit of the clathrin adaptor complex, AP2, resulting in receptor-mediated endocytosis of EGFR [196]. The α 1-subunit of AP2, which interacts with the μ 2-subunit and differentially phosphorylates Btd8, was hypophosphorylated after knockdown of β -arrestin2 and hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 8, Table S11).

The μ 2-subunit of AP2 can be phosphorylated by the adaptor-associated kinase AAK1, which is colocalized with many components of the endocytic machinery such as clathrin, AP2, and dynamin 1 [200]. In our study, AAK1 was hyperphosphorylated after β -arrestin2 knockdown at Thr608 and at Ser626 after treatment of wild-type and β -arrestin2-deficient cells with TRH (Figure 8, Tables S6, S7, and S9). After treatment with TAL, it was hypophosphorylated at Ser622 (Figure 8, Table S8). Comparing this AAK1 isoform with a sequence of 963 amino acids (protein ID F1LRI7; UniProt Database) with the AAK1 isoform with 962 amino acids (protein ID P0C1X8; UniProt Database), the phosphosite Thr622 in AAK1 with 963 AA corresponds to Thr621 in AAK1 with 962 AA. The putative kinase that phosphorylates Thr621 in AAK1 is ERK1 according to ScanSite 4.0 (<https://scansite4.mit.edu>, accessed on 9 December 2021). The cyclin G-associated kinase (Gak) has a region between 752 and 979 amino acids with interaction sites for clathrin, AP2, and dynamin [201]. Gak was hypophosphorylated or hyperphosphorylated at both Ser824 and Ser827 after β -arrestin2 knockdown or after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TRH (Figure 8, Tables S6 and S9).

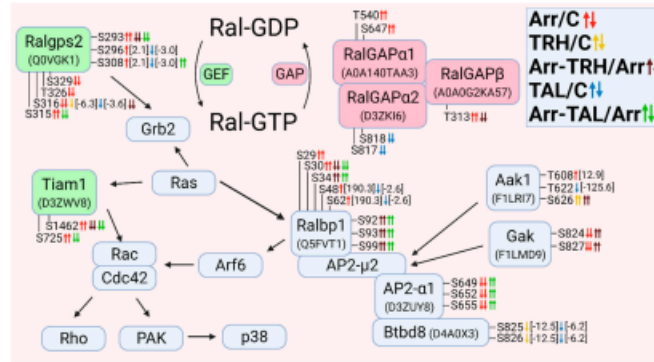


Figure 8. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Ral GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [71,160,161,194,202–205]. Abbreviations: Aak1: AP2-associated protein kinase 1; AP2: adaptor protein complex 2; Gak: cyclin-G-associated kinase; Ralbp1: RalA-binding protein 1; RalGAP: Ral GTPase-activating protein; Ralgps2: Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS2.

3.2.9. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Ran GTPase-Mediated Signal Transduction

RanGAP1 with the GAP activity for Ran was hyperphosphorylated at Ser427 after treatment of wild-type cells with TRH and after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TRH or TAL (Figure 9, Tables S2, S4 and S5). This phosphosite, corresponding to Ser428 in human RanGAP1 with ID P46060, is located in the 50-amino acid sequence between 420 and 470, which is required for its SUMO-1 modification and subsequent exposure or creation of the Ranbp2 (Nup358) binding site leading to the localization of RanGAP1 at the nuclear pore complex [206]. Ranbp2 was found differentially phosphorylated at six phosphosites in three phosphorylation clusters (Figure 9, Tables S1–S5). Two phosphosites, Ser2511 and Ser2735, are located in a 455 amino acid-long segment between Ran-binding domains three and four (protein ID D4A054; UniProt Database). This segment in the Ranbp2 isoform of 3059 amino acids corresponds to a 470 amino acid long fragment in the Nup358 isoform of 3224 amino acids [206]. The phosphoresidue Ser2511 corresponds to Ser2668 in human Ranbp2 with ID P49792. It binds specifically to SUMO-1-modified RanGAP1 [206]. TRH caused hyperphosphorylation in the third cluster on Ser2088, Ser2092, Ser2096, and Ser2097, but TAL induced hypophosphorylation at Ser2092 and Ser2097 (Figure 9, Tables S2 and S3). These phosphosites are located in the region between Ran-binding domains two and three (protein ID D4A054; UniProt Database) and correspond to Ser2242, Ser2246, Ser2250, and Ser2251 in human Ranbp2 with ID P49792. The RanGAP1-Ranbp2 molecular complex is one of the key points in the signaling pathways on which TRH and TAL act in different ways.

RanGAP1 physically interacts with a RanGEF Mycbp2, inhibits its E3 ubiquitin ligase activity and transports it to the nucleus. At the same time, Mycbp2 was a weak inhibitor of the GAP activity of RanGAP1 [207]. Mycbp2 was hyperphosphorylated in two phosphorylation clusters (Ser2644 and Ser2646 in the first cluster and Thr3791 and Ser3792 in the second cluster), which were located in disordered regions after knockdown of β -arrestin2 (Figure 9, Table S1; protein ID D4A2D3; UniProt Database).

Ran-binding proteins coordinate with Ran to regulate nuclear import and export [208]. In addition to Ranbp2, other Ran-binding proteins (Ranbp1, Ranbp3, Ranbp9, and Ranbp10) were also differentially phosphorylated (Figure 9).

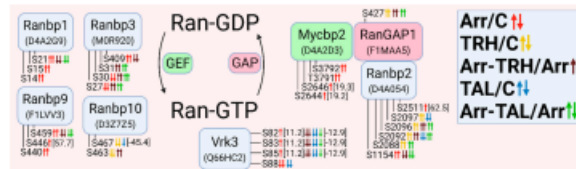


Figure 9. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Ran GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [207,209–211]. Abbreviations: Mycbp2: RCR-type E3 ubiquitin transferase; Ranbp: Ran-binding protein; RanGAP: Ran GTPase-activating protein; Vrk3: serine/threonine-protein vaccinia-related kinase 3.

3.2.10. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in Rap GTPase-Mediated Signal Transduction

Rapgef1 (C3G) was hyperphosphorylated at Ser375 after knockdown of β -arrestin2 and hypophosphorylated at Ser239 after treatment with TAL (Figure 10, Tables S1 and S3). This protein targets members of the Ras GTPases (Rap1, Rap2, and R-Ras) and Rho GTPases [212]. Other interacting proteins include Src kinase, Grb2, and Crk. The interaction of Crk and Rapgef1 is influenced by the Cbl-b protein and the Bcr-Abl2 complex [212]. Bcr and Abl2 proteins were hyperphosphorylated after knockdown of β -arrestin2 (Figure 10, Tables S1 and S6), concomitant with phosphosite Ser375 in Rapgef1. Crk was hyperphosphorylated after treatment with TAL, concomitant with hypophosphorylation of Ser239 in Rapgef1 (Figure 10, Tables S3 and S8). Cbl-b was hypophosphorylated after β -arrestin2 knockdown and in wild-type cells treated with TRH or TAL but hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH or TAL (Figure 10, Tables S1–S5).

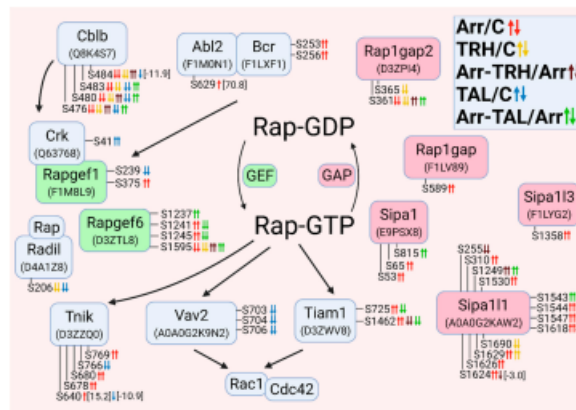


Figure 10. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in Rap GTPase-mediated signal transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [212–218]. Abbreviations: Bcr: breakpoint cluster region protein; Crk: adapter molecule crk; Radil: Ras-associating and dilute domain-containing protein; Rap1gap: Rap1 GTPase-activating protein 1; Rapgef: Rap guanine nucleotide exchange factor; Sipa: signal-induced proliferation-associated proteins; Tnik: TRAF2 and NCK-interacting protein kinase.

3.2.11. Alterations in Phosphorylation of Phosphoproteins Involved in the β -Catenin Signaling Pathway

Stimulation of TRH-R also resulted in altered phosphorylation of phosphoproteins involved in the β -catenin signaling pathway. The β -arrestin complex with GPCR interacts with Src and EGFR or axin and GSK3 β to affect phosphorylation or stabilization of β -catenin [219]. While both EGFR and Src were affected by β -arrestin2 knockdown or by treatment of these cells with TAL, the complex of axin1 and GSK3 β was affected in wild-type cells treated with both agonists or in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH (Figure 11). GSK3 β was hypophosphorylated at Ser389 in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH or in wild-type cells treated with TAL (Figure 11, Tables S3 and S4). Axin was hypophosphorylated at Ser75, Ser77, and Thr79 in wild-type cells treated with TRH or TAL and hyperphosphorylated at Ser75 and Thr79 in β -arrestin2-deficient cells after treatment with TRH (Figure 11, Tables S2–S4). The phosphoresidues Ser75, Ser77, and Thr79 in rat axin correspond to the same residues at the same positions in human axin-1 with ID O15169. Comparison of the sequences of the N-terminal segment of axin with the sequence of the detected axin with protein ID O70239 indicated that phosphosite Ser75 is located in the second peptide segment that interacts with tankyrase, an enzyme that modifies target proteins with mono- or poly-ADP-ribose [220]. Tankyrase 1-binding protein 1 (Tnks1bp1) was found to be differentially phosphorylated at nine phosphosites with distinct phosphorylation patterns for each of the five experimental groups (Figure 11 and Figure S11).

β -Catenin was differentially phosphorylated at Ser191 and Ser552, which was hypophosphorylated after β -arrestin2 knockdown or in wild-type cells treated with TAL and hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TAL (Figure 11, Table S11). Both phosphoresidues correspond to the same residues at the same positions in human β -catenin with ID P35222. β -Catenin interacts with presenilin 1 (Psen1) which inhibits β -catenin signaling [71,221]. In the present study, Psen1 was hyperphosphorylated in β -arrestin2-deficient cells treated with TRH or TAL (Figure 11, Tables S4 and S5). The altered phosphosites Ser366, Ser368, Thr371, and Ser372 are located in the 322–450 amino acid sequence required for the association of Psen1 with β -catenin [221]. While the phosphoresidues Ser366 and Ser368 correspond to Ser365 and Ser367, respectively, in human presenilin-1 with ID P49768, Thr371 and Ser372 correspond to the nonphosphorylated residues Ala370 and Gly371.

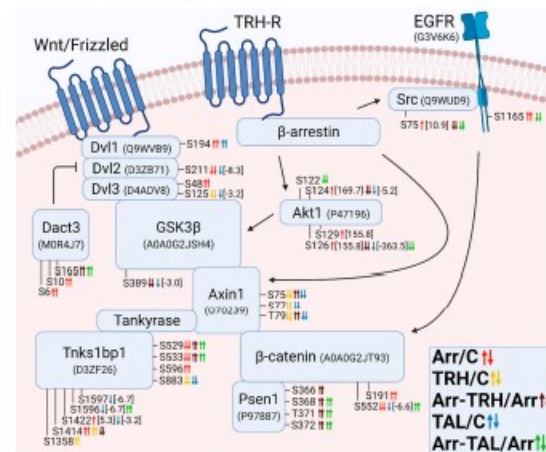


Figure 11. Alterations in phosphorylation of phosphoproteins involved in β -catenin-mediated signal

transduction. The description of the figure is the same as in Figure 1. Associations and interactions between proteins were ordered according to [117,219–226]. Abbreviations: Dact3: dishevelled-binding antagonist of β -catenin 3; GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β ; Psen1: presenilin 1; Tnks1bp1: 182 kDa tankyrase-1-binding protein 1.

Activation of β -catenin signaling is mediated by PI3K/Akt or Wnt/Frizzled signaling pathways [222]. Frizzled receptors activated by Wnt ligand affect the GSK3 β /axin complex via Dvl proteins that were differentially phosphorylated after β -arrestin2 knockdown or TRH and TAL treatments in wild-type cells (Figure 11, Tables S1–S3). The protein Dact3, a negative regulator of Wnt/ β -catenin signaling via inhibition of the Dvl2 protein [223], was hyperphosphorylated at Ser6 and Ser10 after β -arrestin2 knockdown and at Ser165 after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TRH or TAL (Figure 11, Table S11).

4. Discussion

In this study, we investigated the changes in the phosphoproteome induced by the activation of the TRH receptor in pituitary GH1 cells as well as in cells lacking β -arrestin2. There were hundreds of alterations in the phosphoproteome in each experimental group. Detailed analysis revealed that only some altered phosphosites were located in functional domains with enzyme activity or interaction sites with other proteins. According to the UniProt database, most phosphosites were located in disordered regions of phosphoproteins. The intrinsically disordered proteins, which lack stable tertiary structure, undergo stabilization or destabilization of transient secondary structure and more global disorder-to-order or order-to-disorder transitions upon ligand binding or post-translational modifications, including phosphorylation [227,228]. Our results support the hypothesis established by predicting protein phosphorylation sites using the web-based tool DISPHOS, which assumes that protein phosphorylations occur predominantly in intrinsically disordered protein regions [229]. The extensive alterations in the phosphoproteome of pituitary cells induced by TRH receptor activation or β -arrestin2 deficiency might be related to structural changes in phosphoproteins mediating distinct biological functions.

Although GPCRs are known to initiate signaling cascades through β -arrestin [230], this important regulator has mainly been studied in the context of TRH receptor desensitization, trafficking, and resensitization [17,231]. Interestingly, the β -arrestin–receptor interaction is not required for MAPK activation by TRH [18]. Both TRH and TAL have been shown to act via MAPK signaling [10,18]. TAL induced an increase in phosphorylation of ERK1/2 in the substantia nigra and striatum [10]. Treatment of pituitary GH3 cells with TRH at a concentration of 100 nM induced ERK phosphorylation and activation within 10 min, which lasted up to 60 min [232]. In our study, phosphorylation of ERK was not detected, which may be due to different experimental conditions, particularly a higher TRH concentration (1 μ M) than in Oride's study. However, we observed that both TRH and TAL can affect the function of the ERK upstream effector B-Raf by hypophosphorylating it. In addition, the components of the Raf/MEK/ERK scaffold, KSR2 and Cnksr1, were affected by β -arrestin2 knockdown or TAL treatment of wild-type and β -arrestin2-depleted cells (Figure 1). Comparison of amino acid sequences revealed that the phosphosite Thr276 in KSR2 (protein ID M0RBD3; UniProt Database) corresponds to Thr260 in KSR1 [233], which is one of the residues phosphorylated by activated ERK [234]. Docking of activated ERK to the KSR1 complex accelerates phosphorylation of these phosphosites in response to growth factor treatment [235], suggesting that TRH or TAL do not directly alter the phosphorylation and activity of ERK but likely affect the spatial distribution of Raf, MEK, ERK, and their scaffold via phosphorylation of their components. The distinct effect on phosphorylation of KSR2 and Cnksr1 has a knockdown of β -arrestin2, supporting the previous studies that reported the scaffold of β -arrestin with the Raf/MEK/ERK signaling cascade [236,237].

β -Arrestin interacts directly with some small GTPases and their regulatory or binding proteins [238]. It affects signaling pathways mediated by Ras, Ral, Rap, Rho, Rac, Cdc42, Arf, and Rab [30]. Our data confirm these associations and add Ran GTPase to the list (Figures 1–10). Activation of the TRH receptor by TRH or TAL induced alterations in phosphorylation of proteins interacting with these GTPases (Figures 1–10). Previously, only the Rho and Ras pathways were found to be involved in TRH signaling [19,20]. Our results also show that activation of the TRH receptor or absence of β -arrestin2 affects small GTPases via phosphorylation of their GEFs and GAPs (Figures 3–10). The alterations in phosphorylation of some proteins after activation of the TRH receptor were abolished in β -arrestin2-deficient cells, e.g., B-Raf, which is scaffolded by β -arrestin2 (Figure 1), or Dvl proteins, which interact with β -arrestin (Figure 3). This effect occurred to a greater extent in the class of Rab GTPases and was observed for Rabep1, Rabep2, Rab3ip, Rab11fip5, Dennd1a, Tbd1d10a, and Ulk1 (Figure 7), suggesting that β -arrestin2 plays a role in the mechanism of endocytic and exocytic processes triggered by GPCR activation. There were few proteins for which TRH- and TAL-induced alterations in phosphorylation occurred in opposite directions in wild-type and β -arrestin2-deficient cells, such as Rptor (Figure 1), Rock2, Lats1, Myo9b, and PKD1 (Figure 3), Cbl-b and Farp2 (Figure 5), and Rab11fip1, Dennd4c, and Itsn2 (Figure 7). At the same time, there were only few proteins whose TRH- or TAL-induced alterations in phosphorylation were not affected by β -arrestin2 downregulation at least at some phosphosites, such as Arhgef28 (Figure 3), Ptk2 β , Wnk2 (Figure 4), Git1, Farp2 (Figure 5), Tbc1d10b, Rabgap1 (Figure 7), Aak1 (Figure 8), and RanGAP1, and Vrk3 (Figure 9). These data suggest that β -arrestin scaffolds many cellular proteins and that its deficiency can cause major changes in the scaffolding of multiprotein complexes. Alternatively, it may be that β -arrestin assembles some proteins into multiple complexes and that the reduced scaffolding capacity of β -arrestin is reflected in components of other signaling pathways. The altered scaffolding capacity of β -arrestin affects the conformation and localization of many proteins, including protein kinases and phosphatases. This alters the accessibility of protein kinases and phosphatases to their substrates and subsequently the differential phosphorylation of proteins, leading to changes in protein function and cellular processes.

Some proteins were found to be associated with multiple small GTPases, so that there are multiple cross-talks between the signaling pathways of the members of the small GTPases. The crucial cross-talk is represented by a complex consisting of Arhgef7, Git1, and Scrib associated with Arf and Cdc42 signaling pathways that overlap with Rac and Ras signaling pathways via Lats1 (Figures 1 and 4–6). Akt1 kinase overlaps with Ras and Arf signaling pathways (Figures 1 and 6). The Ulk1, Src, and CK2 β proteins connect the Ras signaling pathway to the Rab, Rho, and Rac signaling pathways, respectively (Figures 1, 3, 4 and 7). A strongly affected Cblb protein mediates a cross-talk between the Cdc42 and Rap signaling pathways (Figures 5 and 10). Another important cross-talk protein is Ralbp1 (Figure 8), a component of the Ral pathway that interacts with Ras GTPases and activates Arf6 [196].

Not only MEK and ERK, but also other MAP kinases (Map3k1, Map3k2, Map3k5, Map3k9, Map4k4) were not affected by TRH or TAL in wild-type GH1 cells. On the other hand, Map3k7 (TAK1) was slightly hypophosphorylated after TAL treatment and Map3k4 (MEKK4) and Map4k1 were markedly hypophosphorylated after TRH or TAL treatments of wild-type cells (Figures 1 and 3, Table S11). All the above MAP kinases were affected in both untreated and ligand-treated β -arrestin2-deficient cells (Figures 1–5), suggesting that β -arrestin2 scaffolded many MAP kinases and its deficiency altered MAPK signaling and activation induced by TRH or TAL. In addition to the Raf/MEK/ERK scaffold, β -arrestin also binds the component kinases of the JNK3 and p38 cascades, ASK1-MKK4/7-JNK3 and ASK1-MKK3/6-p38 [30]. We also detected alterations in the phosphorylation pattern of Map3k5 (ASK1) in β -arrestin2-deficient cells as well as in these cells treated with TAL (Figure 1), supporting the association of β -arrestin2 with the JNK3 and p38 cascades. The JNK1/2/3 kinase can also be activated by MEKK4 [236], whose phosphorylation was not

affected by knockdown of β -arrestin2 but whose TRH/TAL-induced hypophosphorylation in wild-type cells was markedly suppressed in β -arrestin2-deficient cells (Table S11), suggesting that β -arrestin2 does not scaffold MEKK4 but mediates MEKK4 signaling triggered by TRH receptor activation. Increased expression of β -arrestin2 enhances the association of β -arrestin2 with TAK1 binding protein-1 (TAB1), leading to disruption of the TAK1-TAB1 interaction [239]. In our study, different phosphorylation patterns of Map3k7 (TAK1) were found in TAL-treated wild-type cells, in β -arrestin2-deficient cells and in TRH/TAL-treated β -arrestin2-deficient cells (Figure 3) supporting the notion that changes in β -arrestin2 expression may affect TAK1 signaling, as reflected by altered TAK1 phosphorylation. Map4k1 (HPK1) and Map4k4 (HGK) kinases are upstream kinases that phosphorylate TAK1 [235]. Map4k1 was hypophosphorylated after treatment of wild-type cells with TRH or TAL, similar to TAK1 after treatment with TAL (Figure 1), suggesting that at least TAL suppresses phosphorylation of key components of the HPK1-TAK1 pathway.

Map4k kinases were found to phosphorylate and activate Lats1/2 kinase, a component of the Hippo signaling pathway. Activated Lats1/2 in turn promotes inhibitory phosphorylation of the transcriptional co-activators YAP/TAZ [56]. Whereas Map4k4 kinase was hypophosphorylated in β -arrestin2-deficient cells and in TRH/TAL-treated wild-type cells and this phosphorylation pattern resembled phosphorylation at Ser1111 in Lats1/2, ligand binding to the TRH receptor in β -arrestin2-deficient cells abolished the phosphorylation of these two proteins (Figure 1). There is a cross-talk between the Hippo pathway and the Rho/Rac GTPase pathways. Receptors coupled to Gq/11, which include the TRH receptor, can inhibit Lats1/2 kinase activity via activation of Rho GTPase [55,56]. In addition to Map4k kinases, the Rho-ROCK-PAK or KRas-RASSF1A-MST1/2 signaling pathways can also mediate the changes in Lats1/2 activity [56]. Arhgef7 is a positive regulator of the Hippo pathway, acting as a scaffold for Lats1/2 and YAP/TAZ [127]. Some proteins from all three alternatives (Rock1, Rock2, Pak1, Pak2, MST2, and Arhgef7) were differentially phosphorylated at least in pairwise comparison (Figures 1, 3 and 4). Rock2 was also differentially phosphorylated in all five pairwise comparisons similar to Lats1/2, but in the opposite direction (Figure 3). The upstream KRas effectors Dclk1 and Rreb1 were also differentially phosphorylated in all five pairwise comparisons. These data suggest that multiple proteins may be involved in the regulation of Lats1/2 and that the Hippo pathway is one of the major signaling pathways affected by TRH receptor activation. To date, β -arrestins have not been found to affect the Hippo pathway. Only, re-expression of arrestin domain containing protein-3 (ARRDC3), which is structurally similar to β -arrestin, was able to attenuate GPCR-stimulated Hippo signaling [240]. β -Arrestin interacts with RhoA [238]. It appears that β -arrestin deficiency leads to disruption of the TRH receptor-mediated signaling pathway involving Gq-arrestin2-RhoA-Rock2-Lats1/2, when the signal is not transmitted from the Gq protein to RhoA. Our data support the idea that β -arrestin is a component of the Hippo signaling pathway and mediates the regulation of Lats1/2 function via its phosphorylation.

TRH has been reported to induce hyperphosphorylation of EGFR at tyrosine phosphosites and its transactivation via PLC β /PKC or G β γ /Src signaling pathways [241,242]. In our study, TRH or TAL did not induce alterations in phosphorylation of EGFR in wild-type cells. After knockdown of β -arrestin2, we detected hyperphosphorylation of EGFR at Ser1165 (Figure 2) but no alterations in phosphorylation of tyrosine phosphosites. Interestingly, treatment of β -arrestin2-deficient cells with TAL resulted in its hypophosphorylation (Figure 1). We detected changes in phosphorylation at Ser75 in Src (Figure 1). Hyperphosphorylation of Src is associated with its ubiquitin-dependent degradation, but its hypophosphorylation increases the availability of its active form [44]. Src hyperphosphorylation at Ser75 induced by knockdown of β -arrestin2, leading to degradation of active Src supports the idea that the interaction between β -arrestin2 and Src is constitutive [30]. β -Arrestins bind to activated GPCRs, stabilizing a state of high agonist affinity of the receptor [30]. The hypophosphorylation observed with active Src suggests that Src is active in a receptor-arrestin complex [26,30]. Here, we did not detect any alterations in

Src phosphorylation state after ligand binding to the TRH receptor, but hypophosphorylation at Ser75 was found after stimulation of β -arrestin2-deficient cells, suggesting that Src is active in the TRH receptor-arrestin complex and that the amount of cellular β -arrestin2 is a critical factor determining the change in Src activity after ligand binding to the TRH receptor. β -arrestin is recruited to the endothelin-A receptor (ETAR) as an integral component of two multimeric functional complexes involved in β -catenin signaling [219]. The multimeric ETAR/ β -arrestin complexes consist of Src and EGFR or axin and GSK3 β and result in β -catenin Tyr phosphorylation and stabilization, respectively [219]. The phosphorylation patterns of many proteins involved in the β -catenin signaling pathway were affected in β -arrestin2-deficient cells either treated or not treated with TRH/TAL. Knockdown of β -arrestin2 resulted in hyperphosphorylation of both EGFR and Src, which was abolished in β -arrestin2-deficient cells by TAL (Figure 11). The component of the second multimeric complex, axin, was hypophosphorylated by TRH or TAL in wild-type cells and this phosphorylation was abolished by TRH treatment of β -arrestin2-deficient cells (Figure 11). These data suggest that multimeric complexes consisting of β -arrestin2/Src/EGFR or β -arrestin2/axin are affected by TRH receptor activation and that TRH or TAL might induce a different conformation of the TRH receptor manifested by different regulation of these complexes in β -arrestin2-deficient cells. The next piece of evidence suggesting that TRH receptor activation affects β -catenin signaling is the differential phosphorylation of presenilin-1 (Figure 11), whose altered phosphosites are located in the region responsible for interaction with β -catenin [221]. β -Catenin is affected by the PI3K/Akt signaling pathway [71]. Activation of the TRH receptor can lead to a translocation of β -catenin via PKA α [243]. Here, we observed that the PI3K/Akt pathway was affected when both TRH and TAL treatment of β -arrestin2-deficient cells induced differential phosphorylation of Akt and presenilin-1 (Figure 11), whereas PKA α was not altered. Akt appears to be another downstream effector of the TRH receptor that affects β -catenin signaling. The phosphosite Ser552 in β -catenin was differentially phosphorylated both after β -arrestin2 knockdown and after treatment of wild-type or β -arrestin2-deficient cells with TAL (Figure 11). β -catenin is phosphorylated at Ser552 through Akt activation downstream from EGFR signaling and/or induced by Ras/PI3K [222,224,226]. Activated PI3K/Akt cooperates with the Wnt signaling pathway to activate β -catenin signaling [222]. In the absence of a Wnt ligand, the axin scaffold facilitates GSK3 β -mediated phosphorylation of cytoplasmic β -catenin, initiating its degradation [117]. In canonical Wnt signaling, Wnt ligands bind to Frizzled receptors, dishevelled (Dvl) proteins are activated, and the axin/GSK3 β effect on β -catenin is prevented, leading to increased β -catenin transcriptional activity [117]. In noncanonical Wnt signaling, Wnt ligands signal to Rho and Rac GTPases via Frizzled to promote changes in the actin cytoskeleton [117]. β -Arrestins and Dishevelled proteins are important mediators of Wnt signaling. In canonical Wnt signaling, β -arrestins bind to receptors via Dvl proteins to sequester axin and GSK3 β from β -catenin, leading to its stabilization [117]. In noncanonical Wnt signaling, β -arrestin forms a complex with Dvl proteins and AP2 to activate RhoA and Rac1, leading to activation of Rock and JNK, respectively [117]. In our study, EGFR and Akt involved in the Ras/PI3K/Akt pathway were affected in β -arrestin2-deficient cells and after TAL treatment of β -arrestin2-deficient cells, but Dvl proteins, axin and GSK3 β , were affected after TRH or TAL treatments of wild-type cells and TRH treatment of β -arrestin2-deficient cells (Figure 11). These results suggest that β -catenin signaling is differentially activated by TRH or TAL depending on the amount of β -arrestin2 and the differential TRH receptor activation.

The changes in phosphorylation of proteins involved in the Rab, Arf, and Ral signaling pathways suggest the effect of TRH, TAL, and β -arrestin2 deficiency on clathrin-dependent and -independent endocytosis and cargo transport between membrane-enclosed organelles [174,180,196]. The heterotetrameric adapter protein (AP) complexes are required at multiple endomembranes for cargo binding. AP2 is required for cargo recognition and transport between the plasma membrane and the early endosome, whereas AP3 is localized to the tubular endocytic compartment and trans-Golgi and requires Arf1 for

membrane binding [160]. The AP2-coated vesicles depend on clathrin for their formation but the AP3 vesicle formation does not require clathrin [160]. In our study, the α subunit of AP2 was differentially phosphorylated only after knockdown of β -arrestin2 and treatment of β -arrestin2-deficient cells with TAL (Figure 8). The β subunit of AP3 was differentially phosphorylated after treatments with TRH or TAL, whose effects were abolished in β -arrestin2-deficient cells. The same effect was observed in AP2-interacting clathrin-endocytosis proteins (Btd8) (Figure 6). These data suggest that both TRH and TAL affect cargo transport at the plasma membrane or Golgi and that β -arrestin2 is a key factor in mediating this effect. The AP2 complex is a component of clathrin-coated pits which have been shown to be not only isolated structures but often tightly interconnected to form clathrin plaques [244]. These plaques may be involved in adhesion or act as signaling platforms that concentrate activated GPCRs or RTKs. Clathrin-coated structures, including clathrin-coated pits and clathrin plaques, are essential for activation of several signaling pathways, including EGFR-mediated stimulation of AKT signaling, activation of the canonical Wnt pathway and β -arrestin2-mediated ERK signaling [244]. The α subunit of AP2 as well as EGFR, Akt1, components of ERK scaffold (KSR2 and Cnksr1) and β -catenin involved in the Wnt signaling pathway, were differentially phosphorylated in β -arrestin2-deficient cells and after treatment of β -arrestin2-deficient cells with TAL (Figures 1, 8 and 11), suggesting that β -arrestin2 functions as a component in clathrin-coated structures and that the altered phosphosites in these phosphoproteins may be regulatory sites that mediate signal transduction from clathrin-coated structures to their downstream signaling pathways.

There are two limitations in this study. The first limitation is the use of a cancer-derived cell line. It is known that cancer cell lines may alter signaling pathways. Therefore, the results of this study may correspond more to phosphosignaling processes in pituitary tumors than in normal pituitary cells. The second limitation is that β -arrestin2 silencing was not complete under our conditions. It is likely that different levels of β -arrestin2 may affect cell signaling and biological processes to different extent. Nonetheless, it is clear that deficiency of β -arrestin2 can have significant effects on biological processes, including TRH receptor-mediated signaling and it can trigger adaptive cellular processes via phosphosignaling to compensate for the changes in β -arrestin2 scaffolding and function.

Activation of the TRH receptor by TRH or TAL resulted in different phosphorylation patterns in the phosphoproteome observed in both wild-type GH1 cells and β -arrestin2-deficient cells (Figures 1–11). This suggests that TRH and TAL may act at least in part as biased agonists for the TRH receptor by promoting specific signaling pathways that mediate different cellular processes and may lead to different physiological consequences. The differences between the effects of TRH and TAL may be due to lower affinity of TAL for the receptor and the lower signaling effect compared with TRH [13]. Interestingly, TAL exhibits higher activity in stimulating CNS effects than TRH [13]. Since rat pituitary cells predominantly and perhaps exclusively express the TRH-R1 subtype [15] and the CNS effects of TAL in mice are mediated primarily, if not exclusively, by TRH-R1 [245], we hypothesize, that at least the effects of TAL on phosphosignaling dynamics are mediated entirely via TRH-R1 activation, and TRH induces phosphosignaling changes predominantly via TRH-R1 activation and marginally via TRH-R2 activation, leading to the observed differences between the effects of TRH and TAL on phosphosignaling dynamics. TRH can be implicated in neurodegenerative diseases associated with aging, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease [9]. TRH and its analogs, including TAL, have neuroprotective, neurotrophic, and anti-apoptotic effects [10]. We found TRH- or TAL-induced changes in some signaling pathways associated with neurodegenerative disease pathology. Alzheimer's disease neuropathology is associated with hyperactivation of the PI3K/Akt/mTor pathway, decreased activity of AMPK, increased activity of p38 MAPK, and inhibition of the Wnt pathway [246]; whereas Parkinson's disease neuropathology has been found to involve alterations in the autophagic/lysosomal pathway that include disruption of Rab7 function and intracellular trafficking and involvement of the p38/JNK

pathway [247,248]. Our results provide the molecular background of TRH and TAL effects depending on the amount of β -arrestin2 in cells of the nervous system, which should be taken into account when thinking about potential neuroprotective effects of these ligands in the treatment of neurodegenerative diseases.

5. Conclusions

In the present study, TRH and TAL were found to have a strong effect on the phosphorylation of GEFs, GAPs, and other members of the small GTPase signaling pathways. They affect the phosphorylation patterns of all small GTPase classes. Simultaneously, changes in the phosphorylation of MAP kinases, Ser/Thr protein kinases, Tyr protein kinases, members of the Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways were detected. The phosphorylation patterns triggered by TRH and TAL were found to be different, suggesting that these ligands exhibit biased agonism at the TRH receptor. It was also shown that β -arrestin2 is a key mediator that determines TRH- and TAL-induced phosphoregulation of several phosphosignaling pathways. Downregulation of β -arrestin2 resulted in alterations in the phosphorylation of EGFR and Src kinase with potential implications for their activities. These findings may be useful in the treatment of neurodegenerative disorders and neurological pathologies with TRH and TAL. Modulators of kinase and phosphatase activities and cellular levels of β -arrestin2 can be used as additives along with TRH and TAL to support their beneficial effects.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11091473/s1>, Supplementary Results. Figure S1. Downregulation of β -arrestin2 was performed using siRNA gene silencing technology. Figures S2–S21: Quantitative changes in phosphoproteins and networks of differentially phosphorylated proteins. Table S1. A list of differentially phosphorylated proteins involved in the regulation of small GTPase activity in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown. Table S2. A list of differentially phosphorylated proteins involved in the regulation of small GTPase activity in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TRH. Table S3. A list of differentially phosphorylated proteins related to regulation of small GTPase activity in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TAL. Table S4. A list of differentially phosphorylated proteins involved in the regulation of small GTPase activity in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown and stimulation with 1 μ M TRH. Table S5. A list of differentially phosphorylated proteins related to regulation of small GTPase activity in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown and stimulation with 1 μ M TAL. Table S6. A list of differentially phosphorylated proteins involved in MAP kinase-mediated signaling in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown. Table S7. A list of differentially phosphorylated proteins involved in MAP kinase-mediated signaling in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TRH. Table S8. A list of differentially phosphorylated proteins involved in MAP kinase-mediated signaling in GH1 cells after stimulation with 1 μ M TAL. Table S9. A list of differentially phosphorylated proteins involved in MAP kinase-mediated signaling in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown and stimulation with 1 μ M TRH. Table S10. A list of differentially phosphorylated proteins involved in MAP kinase-mediated signaling in GH1 cells after siRNA-mediated β -arrestin2 knockdown and stimulation with 1 μ M TAL. Table S11. A list of differentially phosphorylated proteins involved in regulation of small GTPase activity and MAPK signaling in GH1 cells after siRNA knockdown of β -arrestin2 and stimulation with 1 μ M TRH or TAL. References [79,89,101,162,164,186,205,211,213,214,217,249–255] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, funding acquisition and supervision, J.N.; methodology and investigation, Z.D. and R.T.; validation and formal analysis, R.T.; writing—original draft preparation, Z.D.; writing—review and editing, Z.D., R.T. and J.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Charles University Institutional Research Fund (no. SVV-260571/2020) and by the project BIOCEV—Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (no. CZ.1.05/1.1.00/02.0109), funded from the European Regional Development Fund.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: We thank Karel Harant and Pavel Talacko from Laboratory of Mass Spectrometry, Biocev, Charles University, Faculty of Science for performing LC/MS analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tashjian, A.H.; Barowsky, N.J.; Jensen, D.K. Thyrotropin releasing hormone—direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 516–523. [\[CrossRef\]](#)
2. Kanasaki, H.; Oride, A.; Mijiddorj, T.; Kyo, S. Role of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing cell models. *Neuropeptides* **2015**, *54*, 73–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Drastichova, Z.; Bourova, L.; Hejnova, L.; Jedelsky, P.; Svoboda, P.; Novotny, J. Protein Alterations Induced by Long-Term Agonist Treatment of HEK293 Cells Expressing Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor and G(11)alpha Protein. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109*, 255–264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Koo, K.B.; Suh, H.J.; Ra, K.S.; Choi, J.W. Protective Effect of Cyclo(His-Pro) on Streptozotocin-Induced Cytotoxicity and Apoptosis In Vitro. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *21*, 218–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Luo, L.; Luo, J.Z.; Jackson, I. Tripeptide amide L-pyroglutamyl-histidyl-L-prolineamide (L-PHP-thyrotropin-releasing hormone, TRH) promotes insulin-producing cell proliferation. *Curr. Aging Sci.* **2013**, *6*, 8–13. [\[CrossRef\]](#)
6. Faden, A.I.; Movsesyan, V.A.; Knoblach, S.M.; Ahmed, F.; Cernak, B. Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 410–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Faden, A.I.; Knoblach, S.M.; Movsesyan, V.A.; Lea, P.M.; Cernak, I. Novel neuroprotective tripeptides and dipeptides. *Neuroprot. Agents* **2005**, *1053*, 472–481.
8. Jaworska-Feil, L.; Jantas, D.; Leskiewicz, M.; Budziszewska, B.; Kubera, M.; Basta-Kaim, A.; Lipkowski, A.W.; Lason, W. Protective effects of TRH and its analogues against various cytotoxic agents in retinoic acid (RA)-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuropeptides* **2010**, *44*, 495–508. [\[CrossRef\]](#)
9. Daimon, C.M.; Chirdon, P.; Maudsley, S.; Martin, B. The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am. J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *1*. [\[CrossRef\]](#)
10. Zheng, C.; Chen, G.Q.; Tan, Y.; Zeng, W.Q.; Peng, Q.W.; Wang, J.; Cheng, C.; Yang, X.M.; Nie, S.K.; Xu, Y.; et al. TRH Analog, Taltirelin Protects Dopaminergic Neurons From Neurotoxicity of MPTP and Rotenone. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 485. [\[CrossRef\]](#)
11. Monga, V.; Meena, C.L.; Kaur, N.; Jain, R. Chemistry and biology of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analogs. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2718–2733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Fukuchi, I.; Asahi, T.; Kawashima, K.; Kawashima, Y.; Yamamura, M.; Matsuoka, Y.; Kinoshita, K. Effects of taltirelin hydrate (TA-0910), a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo dopamine release and turnover in rat brain. *Arzneimittelforschung* **1998**, *48*, 353–359. [\[PubMed\]](#)
13. Thirunarayanan, N.; Raaka, B.M.; Gershengorn, M.C. Taltirelin is a superagonist at the human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front. Endocrinol. Lausanne* **2012**, *3*, 120. [\[CrossRef\]](#)
14. O'Dowd, B.F.; Lee, D.K.; Huang, W.; Nguyen, T.; Cheng, R.G.; Liu, Y.; Wang, B.; Gershengorn, M.C.; George, S.R. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 183–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sun, Y.H.; Zupan, B.; Raaka, B.M.; Toth, M.; Gershengorn, M.C. TRH-Receptor-Type-2-Deficient Mice are Euthyroid and Exhibit Increased Depression and Reduced Anxiety Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34*, 1601–1608. [\[CrossRef\]](#)
16. Hsieh, K.P.; Martin, T.F. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1673–1681.
17. Hinkle, P.M.; Gehret, A.U.; Jones, B.W. Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front. Neurosci.* **2012**, *6*, 180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Smith, J.; Yu, R.; Hinkle, P.M. Activation of MAPK by TRH requires clathrin-dependent endocytosis and PKC but not receptor interaction with beta-arrestin or receptor endocytosis. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1539–1548.
19. Storey, N.M.; O'Bryan, J.P.; Armstrong, D.L. Rac and Rho mediate opposing hormonal regulation of the ether-a-go-go-related potassium channel. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)
20. Romano, D.; Magalon, K.; Ciampini, A.; Talet, C.; Enjalbert, A.; Gerard, C. Differential involvement of the Ras and Rap1 small GTPases in vasoactive intestinal and pituitary adenylyl cyclase activating polypeptides control of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51386–51394. [\[CrossRef\]](#)
21. Jones, B.W.; Hinkle, P.M. Beta-arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38346–38354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 455–465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

23. Mancini, A.D.; Bertrand, G.; Vivot, K.; Carpentier, E.; Tremblay, C.; Ghislain, J.; Bouvier, M.; Poirout, V. beta-Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 21131–21140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Sanchez-Fernandez, G.; Cabezedo, S.; Garcia-Hoz, C.; Tobin, A.B.; Mayor, F.; Ribas, C. ERK5 Activation by Gq-Coupled Muscarinic Receptors Is Independent of Receptor Internalization and beta-Arrestin Recruitment. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84174. [\[CrossRef\]](#)
25. Teixeira, L.B.; Parreiras-E-Silva, L.T.; Bruder-Nascimento, T.; Duarte, D.A.; Simoes, S.C.; Costa, R.M.; Rodriguez, D.Y.; Ferreira, P.A.B.; Silva, C.A.A.; Abrao, E.P.; et al. Ang-(1-7) is an endogenous beta-arrestin-biased agonist of the AT(1) receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11903. [\[CrossRef\]](#)
26. Luttrell, L.M.; Ferguson, S.S.G.; Daaka, Y.; Miller, W.E.; Maudsley, S.; Della Rocca, G.J.; Lin, F.T.; Kawakatsu, H.; Owada, K.; Luttrell, D.K.; et al. beta-arrestin-dependent formation of beta(2) adrenergic receptor Src protein kinase complexes. *Science* **1999**, *283*, 655–661. [\[CrossRef\]](#)
27. Luttrell, L.M.; Roudabush, F.L.; Choy, E.W.; Miller, W.E.; Field, M.E.; Pierce, K.L.; Lefkowitz, R.J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2449–2454. [\[CrossRef\]](#)
28. Coffa, S.; Breitman, M.; Hanson, S.M.; Callaway, K.; Kook, S.; Dalby, K.N.; Gurevich, V.V. The Effect of Arrestin Conformation on the Recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 Activation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28723. [\[CrossRef\]](#)
29. Cassier, E.; Gallay, N.; Bourquard, T.; Claeysen, S.; Bockaert, J.; Crepieux, P.; Poupon, A.; Reiter, E.; Marin, P.; Vandermoere, F. Phosphorylation of beta-arrestin2 at Thr(383) by MEK underlies beta-arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *eLife* **2017**, *6*, e23777. [\[CrossRef\]](#)
30. Peterson, Y.K.; Luttrell, L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69*, 256–297. [\[CrossRef\]](#)
31. Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Lo Muzio, L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 271–280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Miranda, P.; Giráldez, T.; de la Peña, P.; Manso, D.G.; Alonso-Ron, C.; Gómez-Varela, D.; Domínguez, P.; Barros, F. Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins for regulation of ERG K⁺ channels in GH3 rat anterior pituitary cells. *J. Physiol.* **2005**, *566*, 717–736. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Qu, L.; Pan, C.; He, S.M.; Lang, B.; Gao, G.D.; Wang, X.L.; Wang, Y. The Ras Superfamily of Small GTPases in Non-neoplastic Cerebral Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 121. [\[CrossRef\]](#)
34. Ba, W.; Nadif Kasri, N. RhoGTPases at the synapse: An embarrassment of choice. *Small GTPases* **2017**, *8*, 106–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Patel, M.; Karginov, A.V. Phosphorylation-mediated regulation of GEFs for RhoA. *Cell Adh. Migr.* **2014**, *8*, 11–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Shirakawa, R.; Horiuchi, H. Ral GTPases: Crucial mediators of exocytosis and tumorigenesis. *J. Biochem.* **2015**, *157*, 285–299. [\[CrossRef\]](#)
37. Walkup, W.G.; Washburn, L.; Sweredoski, M.J.; Carlisle, H.J.; Graham, R.L.; Hess, S.; Kennedy, M.B. Phosphorylation of Synaptic GTPase-activating Protein (synGAP) by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) and Cyclin-dependent Kinase 5 (CDK5) Alters the Ratio of Its GAP Activity toward Ras and Rap GTPases. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 4908–4927. [\[CrossRef\]](#)
38. Humphrey, S.J.; Karayel, O.; James, D.E.; Mann, M. High-throughput and high-sensitivity phosphoproteomics with the EasyPhos platform. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 1897–1916. [\[CrossRef\]](#)
39. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372. [\[CrossRef\]](#)
40. Tyanova, S.; Temu, T.; Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 2301–2319. [\[CrossRef\]](#)
41. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Meth.* **2016**, *13*, 731–740. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kim, D.H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. mTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **2002**, *110*, 163–175. [\[CrossRef\]](#)
43. Alers, S.; Löffler, A.S.; Wesselborg, S.; Stork, B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Pan, Q.; Qiao, F.; Gao, C.; Norman, B.; Optican, L.; Zelenka, P.S. Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75). *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 3425–3436. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Song, Q.; Ji, Q.; Li, Q. The role and mechanism of beta-arrestins in cancer invasion and metastasis. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 631–639. [\[PubMed\]](#)
46. Annunziata, M.C.; Parisi, M.; Esposito, G.; Fabbrocini, G.; Ammendola, R.; Cattaneo, F. Phosphorylation Sites in Protein Kinases and Phosphatases Regulated by Formyl Peptide Receptor 2 Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3818. [\[CrossRef\]](#)
47. Girardi, C.; James, P.; Zanin, S.; Pinna, L.A.; Ruzzene, M. Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 1865–1874. [\[CrossRef\]](#)
48. Di Maira, G.; Salvi, M.; Arrigoni, G.; Marin, O.; Sarno, S.; Brustolon, F.; Pinna, L.A.; Ruzzene, M. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 668–677. [\[CrossRef\]](#)

49. Litchfield, D.W.; Bosc, D.G.; Slominski, E. The protein kinase from mitotic human cells that phosphorylates Ser-209 on the casein kinase-II beta-subunit is P34(CDC2). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1995**, *1269*, 69–78. [\[CrossRef\]](#)
50. Sanders, S.S.; De Simone, F.I.; Thomas, G.M. mTORC1 Signaling Is Palmitoylation-Dependent in Hippocampal Neurons and Non-neuronal Cells and Involves Dynamic Palmitoylation of LAMTOR1 and mTOR. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 115. [\[CrossRef\]](#)
51. Li, X.D.; Wang, L.L.; Zhou, X.E.; Ke, J.Y.; De Waal, P.W.; Gu, X.; Tan, M.H.E.; Wang, D.Y.; Wu, D.H.; Xu, H.E.; et al. Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen. *Cell Res.* **2015**, *25*, 50–66. [\[CrossRef\]](#)
52. Steinberg, G.R.; Carling, D. AMP-activated protein kinase: The current landscape for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 527–551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Ovens, A.J.; Scott, J.W.; Langendorf, C.G.; Kemp, B.E.; Oakhill, J.S.; Smiles, W.J. Post-Translational Modifications of the Energy Guardian AMP-Activated Protein Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Chan, E.H.; Nousiainen, M.; Chalamalasetty, R.B.; Schafer, A.; Nigg, E.A.; Sillje, H.H.W. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* **2005**, *24*, 2076–2086. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Meng, Z.P.; Moroishi, T.; Guan, K.L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
56. Yamauchi, T.; Moroishi, T. Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. *Cells* **2019**, *8*, 398. [\[CrossRef\]](#)
57. Humbert, N.; Navaratnam, N.; Augert, A.; Da Costa, M.; Martien, S.; Wang, J.; Martinez, D.; Abbadie, C.; Carling, D.; de Launoit, Y.; et al. Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NAK1. *EMBO J.* **2010**, *29*, 376–386. [\[CrossRef\]](#)
58. Martelli, A.M.; Evangelisti, C.; Chiarini, F.; Grimaldi, C.; McCubrey, J.A. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cell biology. *Cancers* **2010**, *2*, 1576–1596. [\[CrossRef\]](#)
59. Schoneborn, H.; Raudzus, F.; Coppey, M.; Neumann, S.; Heumann, R. Perspectives of RAS and RHEB GTPase Signaling Pathways in Regenerating Brain Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4052. [\[CrossRef\]](#)
60. Young, K.A.; Biggins, L.; Sharpe, H.J. Protein tyrosine phosphatases in cell adhesion. *Biochem. J.* **2021**, *478*, 1061–1083. [\[CrossRef\]](#)
61. Lai, M.C.; Chang, C.M.; Sun, H.S. Hypoxia Induces Autophagy through Translational Up-Regulation of Lysosomal Proteins in Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153627. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhao, H.F.; Wang, J.; To, S.S.T. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 429–436. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Alsaqati, M.; Heine, V.M.; Harwood, A.J. Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation. *Mol. Autism* **2020**, *11*, 80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Goel, S.; DeCristo, M.J.; McAllister, S.S.; Zhao, J.J. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 911–925. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Won, S.Y.; Park, J.J.; Shin, E.Y.; Kim, E.G. PAK4 signaling in health and disease: Defining the PAK4-CREB axis. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
66. Kucerova, L.; Kubrak, O.I.; Bengtsson, J.M.; Strnad, H.; Nylin, S.; Theopold, U.; Nassel, D.R. Slowed aging during reproductive dormancy is reflected in genome-wide transcriptome changes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 50. [\[CrossRef\]](#)
67. Sanchez, A.M.J.; Candau, R.B.; Csibi, A.; Pagano, A.F.; Raibon, A.; Bernardi, H. The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2012**, *303*, C475–C485. [\[CrossRef\]](#)
68. Mihaylova, M.M.; Shaw, R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1016–1023. [\[CrossRef\]](#)
69. Fang, C.Y.; Lai, T.C.; Hsiao, M.; Chang, Y.C. The Diverse Roles of TAO Kinases in Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7463. [\[CrossRef\]](#)
70. Spencer, J.P.E. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr.* **2007**, *2*, 257–273. [\[CrossRef\]](#)
71. Cuesta, C.; Arevalo-Alameda, C.; Castellano, E. The Importance of Being PI3K in the RAS Signaling Network. *Genes* **2021**, *12*, 1094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Beck, T.N.; Nicolas, E.; Kopp, M.C.; Golemis, E.A. Adaptors for disorders of the brain? The cancer signaling proteins NEDD9, CASS4, and PTK2B in Alzheimer's disease. *Oncoscience* **2014**, *1*, 486–503. [\[CrossRef\]](#)
73. Lock, L.S.; Frigault, M.M.; Saucier, C.; Park, M. Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the met receptor kinase domain. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30083–30090. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Nakamura, Y.; Hibino, K.; Yanagida, T.; Sako, Y. Switching of the positive feedback for RAS activation by a concerted function of SOS membrane association domains. *Biophys. Physicobiol.* **2016**, *13*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Lepri, E.; De Luca, A.; Stella, L.; Rossi, C.; Baldassarre, G.; Pantaleoni, F.; Cordeddu, V.; Williams, B.J.; Caputo, V.; et al. SOS1 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Structural Insights on Pathogenic Effects, and Genotype-Phenotype Correlations. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 760–772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Lavoie, H.; Sahmi, M.; Maisonneuve, P.; Marullo, S.A.; Thevakumaran, N.; Jin, T.; Kurinov, I.; Sichi, F.; Therrien, M. MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* **2018**, *554*, 549–553. [\[CrossRef\]](#)
77. Dougherty, M.K.; Ritt, D.A.; Zhou, M.; Specht, S.I.; Monson, D.M.; Veenstra, T.D.; Morrison, D.K. KSR2 Is a Calcineurin Substrate that Promotes ERK Cascade Activation in Response to Calcium Signals. *Mol. Cell* **2009**, *34*, 652–662. [\[CrossRef\]](#)
78. Nishiyama, K.; Maekawa, M.; Nakagita, T.; Nakayama, J.; Kiyoi, T.; Chosei, M.; Murakami, A.; Kamei, Y.; Takeda, H.; Takada, Y.; et al. CNKSR1 serves as a scaffold to activate an EGFR phosphatase via exclusive interaction with RhoB-GTP. *Life Sci. Alliance* **2021**, *4*, e202101095. [\[CrossRef\]](#)

79. Cerezo, E.L.; Houles, T.; Lie, O.; Sarthou, M.K.; Audouy, C.; Lavoie, G.; Halladjian, M.; Cantaloube, S.; Froment, C.; Burlet-Schiltz, O.; et al. R1OK2 phosphorylation by RSK promotes synthesis of the human small ribosomal subunit. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009583. [\[CrossRef\]](#)
80. Deng, Y.N.; Xia, Z.J.; Zhang, P.; Ejaz, S.; Liang, S.F. Transcription Factor RREB1: From Target Genes towards Biological Functions. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 1463–1473. [\[CrossRef\]](#)
81. Agulto, R.L.; Rogers, M.M.; Tan, T.C.; Ramkumar, A.; Downing, A.M.; Bodin, H.; Castro, J.; Nowakowski, D.W.; Ori-McKenney, K.M. Autoregulatory control of microtubule binding in doublecortin-like kinase 1. *eLife* **2021**, *10*, e60126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Weygant, N.; Qu, D.F.; Berry, W.L.; May, R.; Chandrakesan, P.; Owen, D.B.; Sureban, S.M.; Ali, N.; Janknecht, R.; Houchen, C.W. Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 103. [\[CrossRef\]](#)
83. Patel, O.; Dai, W.W.; Mentzel, M.; Griffin, M.D.W.; Serindoux, J.; Gay, Y.; Fischer, S.; Sterle, S.; Kropp, A.; Burns, C.J.; et al. Biochemical and Structural Insights into Doublecortin-like Kinase Domain 1. *Structure* **2016**, *24*, 1550–1561. [\[CrossRef\]](#)
84. Sureban, S.M.; May, R.; Qu, D.F.; Weygant, N.; Chandrakesan, P.; Ali, N.; Lightfoot, S.A.; Pantazis, P.; Rao, C.V.; Postier, R.G.; et al. DCLK1 Regulates Pluripotency and Angiogenic Factors via microRNA-Dependent Mechanisms in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73940. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Kent, O.A.; Fox-Talbot, K.; Halusha, M.K. RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene* **2013**, *32*, 2576–2585. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Namba, T.; Funahashi, Y.; Nakamura, S.; Xu, C.; Takano, T.; Kaibuchi, K. Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 995–1024. [\[CrossRef\]](#)
87. Llaveró, F.; Arrazola Sastre, A.; Luque Montoro, M.; Martín, M.A.; Arenas, J.; Lucía, A.; Zugaza, J.L. Small GTPases of the Ras superfamily and glycogen phosphorylase regulation in T cells. *Small GTPases* **2021**, *12*, 106–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Llaveró, F.; Montoro, M.L.; Sastre, A.A.; Fernández-Moreno, D.; Lacerda, H.M.; Parada, L.A.; Lucía, A.; Zugaza, J.L. Epidermal growth factor receptor controls glycogen phosphorylase in T cells through small GTPases of the RAS family. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 4345–4358. [\[CrossRef\]](#)
89. Bok, S.; Shin, D.Y.; Yallowitz, A.R.; Eiseman, M.; Cung, M.; Xu, R.; Li, N.; Sun, J.; Williams, A.L.; Scott, J.E.; et al. MEK2 mediates aberrant ERK activation in neurofibromatosis type 1. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5704. [\[CrossRef\]](#)
90. Kishida, S.; Yamamoto, H.; Hino, S.; Ikeda, S.; Kishida, M.; Kikuchi, A. DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 4414–4422. [\[CrossRef\]](#)
91. Bros, M.; Haas, K.; Moll, L.; Grabbe, S. RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells* **2019**, *8*, 733. [\[CrossRef\]](#)
92. Li, Y.Y.; Shi, J.H.; Yang, J.; Ge, S.F.; Zhang, J.M.; Jia, R.B.; Fan, X.Q. Uveal melanoma: Progress in molecular biology and therapeutics. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920965852. [\[CrossRef\]](#)
93. Yi, F.S.; Kong, R.R.; Ren, J.Q.; Zhu, L.; Lou, J.Z.; Wu, J.Y.; Feng, W. Noncanonical Myo9b-RhoGAP Accelerates RhoA GTP Hydrolysis by a Dual-Arginine-Finger Mechanism. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3043–3057. [\[CrossRef\]](#)
94. Schlessinger, K.; Hall, A.; Tolwinski, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 265–277. [\[CrossRef\]](#)
95. Cook, D.R.; Rossman, K.L.; Der, C.J. Rho guanine nucleotide exchange factors: Regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **2014**, *33*, 4021–4035. [\[CrossRef\]](#)
96. Blangy, A. Tensins are versatile regulators of Rho GTPase signalling and cell adhesion. *Biol. Cell* **2017**, *109*, 115–126. [\[CrossRef\]](#)
97. Gong, X.W.; Didan, Y.; Lock, J.G.; Stromblad, S. KIF13A-regulated RhoB plasma membrane localization governs membrane blebbing and blebby amoeboid cell migration. *EMBO J.* **2018**, *37*, e98994. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Maiwald, S.; Motazacker, M.M.; van Capelleveen, J.C.; Sivapalaratnam, S.; van der Wal, A.C.; van der Loos, C.; Kastelein, J.J.P.; Ouwehand, W.H.; Hovingh, G.K.; Trip, M.D.; et al. A rare variant in MCF2L identified using exclusion linkage in a pedigree with premature atherosclerosis. *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24*, 86–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Akizu, N.; Martínez-Balbás, M.A. EZH2 orchestrates apical-basal polarity and neuroepithelial cell renewal. *Neurogenesis* **2016**, *3*, e1250034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Feng, X.D.; Degese, M.S.; Iglesias-Bartolome, R.; Vaque, J.P.; Molinolo, A.A.; Rodrigues, M.; Zaidi, M.R.; Ksander, B.R.; Merlino, G.; Sodhi, A.; et al. Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-Regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 831–845. [\[CrossRef\]](#)
101. Muller, P.M.; Rademacher, J.; Bagshaw, R.D.; Wortmann, C.; Barth, C.; van Unen, J.; Alp, K.M.; Giudice, G.; Eccles, R.L.; Heinrich, L.E.; et al. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 498–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Kim, S.I.; Kim, H.J.; Han, D.C.; Lee, H.B. Effect of lovastatin on small GTP binding proteins and on TGF-beta 1 and fibronectin expression. *Kidney Int.* **2000**, *58*, S88–S92. [\[CrossRef\]](#)
103. Shimizu, A.; Mammoto, A.; Italiano, J.E.; Pravda, E.; Dudley, A.C.; Ingber, D.E.; Klagsbrun, M. ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 27230–27238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Lartey, J.; Bernal, A.L. RHO protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction* **2009**, *138*, 407–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

105. Cossette, S.M.; Bhute, V.J.; Bao, X.; Harmann, L.M.; Horswill, M.A.; Sinha, I.; Gastonguay, A.; Pooya, S.; Bordas, M.; Kumar, S.N.; et al. Sucrose Nonfermenting-Related Kinase Enzyme-Mediated Rho-Associated Kinase Signaling is Responsible for Cardiac Function. *Circ.-Cardiovasc. Genet.* **2016**, *9*, 474–486. [\[CrossRef\]](#)
106. Fokin, A.I.; Klementeva, T.S.; Nadezhkina, E.S.; Burakov, A.V. SLK/LOSK kinase regulates cell motility independently of microtubule organization and Golgi polarization. *Cytoskeleton* **2016**, *73*, 83–92. [\[CrossRef\]](#)
107. Rangamani, P.; Levy, M.G.; Khan, S.; Oster, G. Paradoxical signaling regulates structural plasticity in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E5298–E5307. [\[CrossRef\]](#)
108. Durkin, C.H.; Leite, F.; Cordeiro, J.V.; Handa, Y.; Arakawa, Y.; Valderrama, F.; Way, M. RhoD Inhibits RhoC-ROCK-Dependent Cell Contraction via PAK6. *Dev. Cell* **2017**, *41*, 315–329. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Eisler, S.A.; Curado, F.; Link, G.; Schulz, S.; Noack, M.; Steinke, M.; Olayioye, M.A.; Hausser, A. A Rho signaling network links microtubules to PKD controlled carrier transport to focal adhesions. *eLife* **2018**, *7*, e35907. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Forrest, M.P.; Parnell, E.; Penzes, P. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 215–234. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Kurtzborn, K.; Kwon, H.N.; Kuure, S. MAPK/ERK Signaling in Regulation of Renal Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1779. [\[CrossRef\]](#)
112. Pedraza, N.; Cemeli, T.; Monserrat, M.V.; Gari, E.; Ferrezuelo, F. Regulation of small GTPase activity by G1 cyclins. *Small GTPases* **2019**, *10*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
113. Asih, P.R.; Prikas, E.; Stefanoska, K.; Tan, A.R.P.; Ahel, H.L.; Ittner, A. Functions of p38 MAP Kinases in the Central Nervous System. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, *13*, 570586. [\[CrossRef\]](#)
114. Schulte, G.; Shenoy, S.K. beta-Arrestin and dishevelled coordinate biased signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19839–19840. [\[CrossRef\]](#)
115. Clayton, N.S.; Ridley, A.J. Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 222. [\[CrossRef\]](#)
116. Toliás, K.F.; Duman, J.G.; Um, K. Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog. Neurobiol.* **2011**, *94*, 133–148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Kovacs, J.J.; Hara, M.R.; Davenport, C.L.; Kim, J.; Lefkowitz, R.J. Arrestin Development: Emerging Roles for beta-arrestins in Developmental Signaling Pathways. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 443–458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Bryja, V.; Schambony, A.; Cajanek, L.; Dominguez, L.; Arenas, E.; Schulte, G. beta-Arrestin and casein kinase 1/2 define distinct branches of non-canonical WNT signalling pathways. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 1244–1250. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
119. Moniz, S.; Jordan, P. Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 1265–1276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Arias-Romero, L.E.; Villamar-Cruz, O.; Pacheco, A.; Kosoff, R.; Huang, M.; Muthuswamy, S.K.; Chernoff, J. A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 5839–5849. [\[CrossRef\]](#)
121. Tobon, A.L.; Suresh, M.; Jin, J.; Vitriolo, A.; Pietralla, T.; Tedford, K.; Bossenz, M.; Mahnken, K.; Kiefer, F.; Testa, G.; et al. The guanine nucleotide exchange factor Arhgef7/beta Pix promotes axon formation upstream of TC10. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8811. [\[CrossRef\]](#)
122. Arash, E.H.; Song, K.M.; Song, S.; Shiban, A.; Attisano, L. Arhgef7 promotes activation of the Hippo pathway core kinase Lats. *EMBO J.* **2014**, *33*, 2997–3011. [\[CrossRef\]](#)
123. Fu, X.D. Both sides of the same coin: Rac1 splicing regulating by EGF signaling. *Cell Res.* **2017**, *27*, 455–456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Miyamoto, Y.; Yamauchi, J.; Sanbe, A.; Tanoue, A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 791–804. [\[CrossRef\]](#)
125. Lee, S.Y.; Kim, H.; Kim, K.; Lee, H.; Lee, S.; Lee, D. Arhgap17, a RhoGTPase activating protein, regulates mucosal and epithelial barrier function in the mouse colon. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26923. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Okabe, T.; Nakamura, T.; Nishimura, Y.N.; Kohu, K.; Ohwada, S.; Morishita, Y.; Akiyama, T. RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9920–9927. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
127. Harden, T.K.; Hicks, S.N.; Sondek, J. Phospholipase C isozymes as effectors of Ras superfamily GTPases. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S243–S248. [\[CrossRef\]](#)
128. Kichina, J.V.; Goc, A.; Al-Husein, B.; Somanath, P.R.; Kandel, E.S. PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 703–725. [\[CrossRef\]](#)
129. He, X.J.; Kuo, Y.C.; Rosche, T.J.; Zhang, X.W. Structural Basis for Autoinhibition of the Guanine Nucleotide Exchange Factor FARP2. *Structure* **2013**, *21*, 355–364. [\[CrossRef\]](#)
130. Kuij, C.; Pilli, M.; Alahari, S.K.; Janssen, H.; Khoo, P.S.; Ervin, K.E.; Calero, M.; Jonnalagadda, S.; Scheller, R.H.; Neefjes, J.; et al. Rac and Rab GTPases dual effector Nischarin regulates vesicle maturation to facilitate survival of intracellular bacteria. *EMBO J.* **2013**, *32*, 713–727. [\[CrossRef\]](#)
131. Lopez-Guerrero, A.M.; Espinosa-Bermejo, N.; Sanchez-Lopez, I.; Macartney, T.; Pascual-Caro, C.; Orantós-Aguilera, Y.; Rodríguez-Ruiz, L.; Perez-Oliva, A.B.; Mulero, V.; Pozo-Guisado, E.; et al. RAC1-Dependent ORAI1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6580. [\[CrossRef\]](#)
132. Vasco, V.R.L.L. Phosphoinositide Signal Transduction Pathway and Osteosarcoma Metastases. *Jentashapir J. Cell. Mol. Biol.* **2021**, *12*, e116225. [\[CrossRef\]](#)

133. Zamboni, V.; Jones, R.; Umbach, A.; Ammoni, A.; Passafaro, M.; Hirsch, E.; Merlo, G.R. Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1821. [\[CrossRef\]](#)
134. Wang, S.E.; Xian, B.; Guix, M.; Olivares, M.G.; Parker, J.; Chung, C.H.; Pandiella, A.; Arteaga, C.L. Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5605–5620. [\[CrossRef\]](#)
135. Manchanda, P.K.; Jones, G.N.; Lee, A.A.; Pringle, D.R.; Zhang, M.; Yu, L.; La Perle, K.M.D.; Kirschner, L.S. Rac1 is required for Prkar1a-mediated NF2 suppression in Schwann cell tumors. *Oncogene* **2013**, *32*, 3491–3499. [\[CrossRef\]](#)
136. Lopez-Haber, C.; Barrio-Real, L.; Casado-Medrano, V.; Kazanietz, M.G. Heregulin/ErbB3 Signaling Enhances CXCR4-Driven Rac1 Activation and Breast Cancer Cell Motility via Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *36*, 2011–2026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Nuche-Berenguer, B.; Ramos-Alvarez, I.; Jensen, R.T. The p21-activated kinase, PAK2, is important in the activation of numerous pancreatic acinar cell signaling cascades and in the onset of early pancreatitis events. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2016**, *1862*, 1122–1136. [\[CrossRef\]](#)
138. Mertens, A.E.; Roovers, R.C.; Collard, J.G. Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 11–16. [\[CrossRef\]](#)
139. Heo, J.; Thapar, R.; Campbell, S.L. Recognition and activation of rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6573–6585. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
140. Kukimoto-Niino, M.; Tsuda, K.; Ihara, K.; Mishima-Tsumagari, C.; Honda, K.; Ohsawa, N.; Shirouzu, M. Structural Basis for the Dual Substrate Specificity of DOCK7 Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Structure* **2019**, *27*, 741–748. [\[CrossRef\]](#)
141. Chen, Q.A.; Zhu, Y.C.; Yu, J.; Miao, S.; Zheng, J.; Xu, L.; Zhou, Y.; Li, D.; Zhang, C.; Tao, J.; et al. CDKL5, a Protein Associated with Rett Syndrome, Regulates Neuronal Morphogenesis via Rac1 Signaling. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 12777–12786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
142. Welch, H.C. Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **2015**, *6*, 49–70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
143. Offenhauser, N.; Borronovo, A.; Disanza, A.; Romano, P.; Ponzanelli, I.; Iannolo, G.; Di Fiore, P.P.; Scita, G. The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 91–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
144. Yu, D.; Makkar, G.; Strickland, D.K.; Blanpied, T.A.; Stumpo, D.J.; Blackshear, P.J.; Sarkar, R.; Monahan, T.S. Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase Substrate (MARCKS) Regulates Small GTPase Rac1 and Cdc42 Activity and Is a Critical Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration in Intimal Hyperplasia Formation. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e002255. [\[CrossRef\]](#)
145. Nola, S.; Sebbagh, M.; Marchetto, S.; Osmani, N.; Nourry, C.; Audebert, S.; Navarro, C.; Rachel, R.; Montcouquiol, M.; Sans, N.; et al. Scrib regulates PAK activity during the cell migration process. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 3552–3565. [\[CrossRef\]](#)
146. Shirafuji, T.; Ueyama, T.; Yoshino, K.; Takahashi, H.; Adachi, N.; Ago, Y.; Koda, K.; Nashida, T.; Hiramatsu, N.; Matsuda, T.; et al. The Role of Pak-Interacting Exchange Factor-beta Phosphorylation at Serines 340 and 583 by PKC gamma in Dopamine Release. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 9268–9280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Zhou, W.; Li, X.B.; Premont, R.T. Expanding functions of GIT Arf GTPase-activating proteins, PIX Rho guanine nucleotide exchange factors and GIT-PIX complexes. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 1963–1974. [\[CrossRef\]](#)
148. Webb, D.J.; Mayhew, M.W.; Kovalenko, M.; Schroeder, M.J.; Jeffery, E.D.; Whitmore, L.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Horwitz, A.F. Identification of phosphorylation sites in GIT1. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2847–2850. [\[CrossRef\]](#)
149. Tran, C.W.; Saibil, S.D.; Le Bihan, T.; Hamilton, S.R.; Lang, K.S.; You, H.; Lin, A.E.; Garza, K.M.; Elford, A.R.; Tai, K.; et al. Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Cbl-b and Constrains T Cell Activation. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 4056–4065. [\[CrossRef\]](#)
150. Richnau, N.; Aspenstrom, P. RICH, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35060–35070. [\[CrossRef\]](#)
151. Fortin, S.P.; Ennis, M.J.; Schumacher, C.A.; Zylstra-Diegel, C.R.; Williams, B.O.; Ross, J.T.D.; Winkles, J.A.; Loftus, J.C.; Symons, M.H.; Tran, N.L. Cdc42 and the Guanine Nucleotide Exchange Factors Ect2 and Trio Mediate Fn14-Induced Migration and Invasion of Glioblastoma Cells. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 958–968. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
152. Masaki, T. Polarization and myelination in myelinating glia. *ISRN Neurol.* **2012**, *2012*, 769412. [\[CrossRef\]](#)
153. Chen, Y.; Liang, Z.Y.; Fei, E.K.; Chen, Y.W.; Zhou, X.P.; Fang, W.Q.; Fu, W.Y.; Fu, A.K.Y.; Ip, N.Y. Axin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis through Cdc42-Dependent Signaling. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
154. Brudvig, J.J.; Cain, J.T.; Sears, R.M.; Schmidt-Grimminger, G.G.; Wittchen, E.S.; Adler, K.B.; Ghashghaei, H.T.; Weimer, J.M. MARCKS regulates neurogenesis and interacts with a CDC42 signaling network. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
155. Farrugia, A.J.; Calvo, F. The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 1709–1716. [\[CrossRef\]](#)
156. Boissier, P.; Huynh-Do, U. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: A Janus-faced molecule in cellular signaling. *Cell Signal.* **2014**, *26*, 483–491. [\[CrossRef\]](#)
157. Lai, F.P.L.; Szczodrak, M.; Oelkers, J.M.; Ladwein, M.; Acconcia, F.; Benesch, S.; Auinger, S.; Faix, J.; Small, J.V.; Polo, S.; et al. Cortactin Promotes Migration and Platelet-derived Growth Factor-induced Actin Reorganization by Signaling to Rho-GTPases. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3209–3223. [\[CrossRef\]](#)
158. Eiseler, T.; Wille, C.; Koehler, C.; Illing, A.; Seufferlein, T. Protein Kinase D2 Assembles a Multiprotein Complex at the Trans-Golgi Network to Regulate Matrix Metalloproteinase Secretion. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 462–477. [\[CrossRef\]](#)

159. Boulay, P.L.; Cotton, M.; Melancon, P.; Claing, A. ADP-ribosylation Factor 1 Controls the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway to Regulate Epidermal Growth Factor-dependent Growth and Migration of Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36425–36434. [\[CrossRef\]](#)
160. Schoppe, J.; Schubert, E.; Apelbaum, A.; Yavavli, E.; Birkholz, O.; Stephanowitz, H.; Han, Y.P.; Perz, A.; Hofnagel, O.; Liu, F.; et al. Flexible open conformation of the AP-3 complex explains its role in cargo recruitment at the Golgi. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101334. [\[CrossRef\]](#)
161. Piccini, A.; Castroroforio, E.; Valente, P.; Guarnieri, F.C.; Aprile, D.; Michetti, C.; Bramini, M.; Giansante, G.; Pinto, B.; Savardi, A.; et al. APACHE Is an AP2-Interacting Protein Involved in Synaptic Vesicle Trafficking and Neuronal Development. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 3596–3611. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
162. Schürmann, B.; Bermingham, D.P.; Kopeikina, K.J.; Myczek, K.; Yoon, S.; Horan, K.E.; Kelly, C.J.; Martin-de-Saavedra, M.D.; Forrest, M.P.; Fawcett-Patel, J.M.; et al. A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 2000–2016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
163. Monetta, P.; Slavin, F.; Romero, N.; Alvarez, C. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARR dynamics and COPI association. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2400–2410. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Sztul, E.; Chen, P.W.; Casanova, J.E.; Cherfils, J.; Decks, J.B.; Lambright, D.G.; Lee, F.J.S.; Randazzo, P.A.; Santy, L.C.; Schurmann, A.; et al. ARF GTPases and their GEFs and GAPs: Concepts and challenges. *Mol. Biol. Cell* **2019**, *30*, 1249–1271. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Villarroel-Campos, D.; Bronfman, F.C.; Gonzalez-Billault, C. Rab GTPase Signaling in Neurite Outgrowth and Axon Specification. *Cytoskeleton* **2016**, *73*, 498–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Xiaofeng, D.; Shuanglin, X. Endocytosis and human innate immunity. *J. Immunol. Sci.* **2018**, *2*, 65–70.
167. Lohr, N.L. Collateral development: The quest continues. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 591–593. [\[CrossRef\]](#)
168. Cezanne, A.; Lauer, J.; Solomatina, A.; Sbalzarini, I.F.; Zerial, M. A non-linear system patterns Rab5 GTPase on the membrane. *eLife* **2020**, *9*, e54434. [\[CrossRef\]](#)
169. Li, Z.; Zhao, K.; Lv, X.L.; Lan, Y.G.; Hu, S.Y.; Shi, J.C.; Guan, J.Y.; Yang, Y.W.; Lu, H.J.; He, H.B.; et al. Ulk1 Governs Nerve Growth Factor/TrkA Signaling by Mediating Rab5 GTPase Activation in Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus-Induced Neurodegenerative Disorders. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00325-18. [\[CrossRef\]](#)
170. Lyon, A.M.; Dutta, S.; Boguth, C.A.; Skiniotis, G.; Tesmer, J.J.G. Full-length G alpha(q)-phospholipase C-beta 3 structure reveals interfaces of the C-terminal coiled-coil domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 355–362. [\[CrossRef\]](#)
171. van den Eshof, B.L.; Hoogendijk, A.J.; Simpson, P.J.; van Alphen, F.P.J.; Zanivan, S.; Mertens, K.; Meijer, A.B.; van den Biggelaar, M. Paradigm of Biased PAR1 (Protease-Activated Receptor-1) Activation and Inhibition in Endothelial Cells Dissected by Phosphoproteomics. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 1891–1902. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
172. Nielsen, E.; Christoforidis, S.; Uttenweiler-Joseph, S.; Miaczynska, M.; Dewitte, F.; Wilm, M.; Hoflack, B.; Zerial, M. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 601–612. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
173. Eathiraj, S.; Pan, X.J.; Ritacco, C.; Lambright, D.G. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **2005**, *436*, 415–419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Grant, B.D.; Donaldson, J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 597–608. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
175. Linford, A.; Yoshimura, S.; Bastos, R.N.; Langemeyer, L.; Gerondopoulos, A.; Rigden, D.J.; Barr, F.A. Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Dev. Cell* **2012**, *22*, 952–966. [\[CrossRef\]](#)
176. Chaineau, M.; Ioannou, M.S.; McPherson, P.S. Rab35: GEFs, GAPs and Effectors. *Traffic* **2013**, *14*, 1109–1117. [\[CrossRef\]](#)
177. Fuchs, E.; Haas, A.K.; Spooner, R.A.; Yoshimura, S.L.; Lord, J.M.; Barr, F.A. Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 1133–1143. [\[CrossRef\]](#)
178. Gallo, L.L.; Liao, Y.; Ruiz, W.G.; Clayton, D.R.; Li, M.; Liu, Y.J.; Jiang, Y.; Fukuda, M.; Apodaca, G.; Yin, X.M. TBC1D9B functions as a GTPase-activating protein for Rab11a in polarized MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 3779–3797. [\[CrossRef\]](#)
179. Spearman, P. Viral interactions with host cell Rab GTPases. *Small GTPases* **2018**, *9*, 192–201. [\[CrossRef\]](#)
180. Tzeng, H.T.; Wang, Y.C. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J. Biomed. Sci.* **2016**, *23*, 70. [\[CrossRef\]](#)
181. Elbaz-Alon, Y.; Guo, Y.T.; Segev, N.; Harel, M.; Quinell, D.E.; Geiger, T.; Avinoam, O.; Li, D.; Nunnari, J. PDZD8 interacts with Protrudin and Rab7 at ER-late endosome membrane contact sites associated with mitochondria. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3645. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
182. Matsui, T.; Fukuda, M. Rab12 regulates mTORC1 activity and autophagy through controlling the degradation of amino-acid transporter PAT4. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 450–457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Nassari, S.; Del Olmo, T.; Jean, S. Rabs in Signaling and Embryonic Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1064. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
184. Zachari, M.; Ganley, I.G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Signal. Mech. Autophagy* **2017**, *61*, 585–596.
185. Wang, C.Y.; Wang, H.F.; Zhang, D.Y.; Luo, W.W.; Liu, R.L.; Xu, D.Q.; Diao, L.; Liao, L.J.; Liu, Z.X. Phosphorylation of ULK1 affects autophagosome fusion and links chaperone-mediated autophagy to macroautophagy. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3492. [\[CrossRef\]](#)

186. Marat, A.L.; Dokainish, H.; McPherson, P.S. DENN Domain Proteins: Regulators of Rab GTPases. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13791–13800. [\[CrossRef\]](#)
187. Kiral, F.R.; Kohrs, F.E.; Jin, E.J.; Hiesinger, P.R. Rab GTPases and Membrane Trafficking in Neurodegeneration. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R471–R486. [\[CrossRef\]](#)
188. Ghelfi, E.; Grondin, Y.; Millet, E.J.; Bartos, A.; Bortoni, M.; dos Santos, C.O.G.; Trevino-Villarreal, H.J.; Sepulveda, R.; Rogers, R. In vitro gentamicin exposure alters caveolae protein profile in cochlear spiral ligament pericytes. *Proteome Sci.* **2018**, *16*, 7. [\[CrossRef\]](#)
189. Morgan, N.E.; Cutrona, M.B.; Simpson, J.C. Multitasking Rab Proteins in Autophagy and Membrane Trafficking: A Focus on Rab33b. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3916. [\[CrossRef\]](#)
190. Takahashi, T.; Minami, S.; Tsuchiya, Y.; Tajima, K.; Sakai, N.; Suga, K.; Hisanaga, S.; Ohbayashi, N.; Fukuda, M.; Kawahara, H. Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6. *EMBO Rep.* **2019**, *20*, e46794. [\[CrossRef\]](#)
191. Ceresa, B.P. Regulation of EGFR endocytic trafficking by rab proteins. *Histol. Histopathol.* **2006**, *21*, 987–993.
192. Hermle, T.; Schneider, R.; Schapiro, D.; Braun, D.A.; van der Ven, A.T.; Warejko, J.K.; Daga, A.; Widmeier, E.; Nakayama, M.; Jobst-Schwan, T.; et al. GAPVD1 and ANKY1 Mutations Implicate RAB5 Regulation in Nephrotic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 2123–2138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
193. Escobar-Henriques, M.; Anton, V. Mitochondrial Surveillance by Cdc48/p97: MAD vs. Membrane Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6841. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
194. D'Aloia, A.; Berruti, G.; Costa, B.; Schiller, C.; Ambrosini, R.; Pastori, V.; Martegani, E.; Ceriani, M. RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells. *Exp. Cell Res.* **2018**, *362*, 349–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
195. Rebhun, J.F.; Chen, H.S.; Quilliam, L.A. Identification and characterization of a new family of guanine nucleotide exchange factors for the Ras-related GTPase Ral. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13406–13410. [\[CrossRef\]](#)
196. Cornish, J.; Owen, D.; Mott, H.R. RLIP76: A Structural and Functional Triumvirate. *Cancers* **2021**, *13*, 2206. [\[CrossRef\]](#)
197. Herlevsen, M.C.; Theodorescu, D. Mass spectroscopic phosphoprotein mapping of Ral binding protein 1 (RalBP1/Rip1/RLIP76). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 56–62. [\[CrossRef\]](#)
198. Koo, T.H.; Eipper, B.A.; Donaldson, J.G. Arf6 recruits the Rac GEF Kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation. *BMC Cell Biol.* **2007**, *8*, 29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
199. Osmani, N.; Peglion, F.; Chavrier, P.; Etienne-Manneville, S. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 1261–1269. [\[CrossRef\]](#)
200. Conner, S.D.; Schmid, S.L. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 921–929. [\[CrossRef\]](#)
201. Lee, D.W.; Wu, X.F.; Eisenberg, E.; Greene, L.E. Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3502–3512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
202. Ricotta, D.; Conner, S.D.; Schmid, S.L.; von Figura, K.; Honing, S. Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 791–795. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
203. Jullien-Flores, V.; Mahe, Y.; Mirey, G.; Leprince, C.; Meunier-Bisceuil, B.; Sorkin, A.; Camonis, J.H. RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: Involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 2837–2844. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
204. Fillatre, J.; Delacour, D.; Van Hove, L.; Bagarre, T.; Houssin, N.; Soulika, M.; Veitia, R.A.; Moreau, J. Dynamics of the subcellular localization of RalBP1/RLIP through the cell cycle: The role of targeting signals and of protein-protein interactions. *FASEB J.* **2012**, *26*, 2164–2174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
205. Personnic, N.; Lakisic, G.; Gouin, E.; Rousseau, A.; Gautreau, A.; Cossart, P.; Bierné, H. A role for Ral GTPase-activating protein subunit beta in mitotic regulation. *FEBS J.* **2014**, *281*, 2977–2989. [\[CrossRef\]](#)
206. Matunis, M.J.; Wu, J.A.; Blobel, G. SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 499–509. [\[CrossRef\]](#)
207. Dorr, A.; Pierre, S.; Zhang, D.D.; Henke, M.; Holland, S.; Scholich, K. MYCBP2 Is a Guanine Exchange Factor for Ran Protein and Determines Its Localization in Neurons of Dorsal Root Ganglia. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 25620–25635. [\[CrossRef\]](#)
208. Yoon, S.O.; Shin, S.; Liu, Y.; Ballif, B.A.; Woo, M.S.; Gygi, S.P.; Blenis, J. Ran-binding protein 3 phosphorylation links the Ras and PI3-kinase pathways to nucleocytoplasmic transport. *Mol. Cell* **2008**, *29*, 362–375. [\[CrossRef\]](#)
209. Bischoff, F.R.; Klebe, C.; Kretschmer, J.; Wittinghofer, A.; Ponstingl, H. RanGAP1 induced GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2587–2591. [\[CrossRef\]](#)
210. He, Y.J.; Yang, Z.G.; Zhao, C.S.; Xiao, Z.H.; Gong, Y.; Li, Y.Y.; Chen, Y.Q.; Du, Y.T.; Feng, D.Y.; Altman, A.; et al. T-cell receptor (TCR) signaling promotes the assembly of RanBP2/RanGAP1-SUMO1/Ubc9 nuclear pore subcomplex via PKC-theta-mediated phosphorylation of RanGAP1. *eLife* **2021**, *10*, e67123. [\[CrossRef\]](#)
211. Sanz-Garcia, M.; Lopez-Sanchez, I.; Lazo, P.A. Proteomics Identification of Nuclear Ran GTPase as an Inhibitor of Human VRK1 and VRK2 (Vaccinia-related Kinase) Activities. *Mol. Cell. Prot.* **2008**, *7*, 2199–2214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
212. Radha, V.; Mitra, A.; Dayma, K.; Sasikumar, K. Signalling to actin: Role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor. *Biosci. Rep.* **2011**, *31*, 231–244. [\[CrossRef\]](#)
213. Chen, X.; Shibata, A.C.E.; Hendi, A.; Kurashina, M.; Fortes, E.; Weillinger, N.L.; MacVicar, B.A.; Murakoshi, H.; Mizumoto, K. Rap2 and TNIK control Plexin-dependent tiled synaptic innervation in *C. elegans*. *eLife* **2018**, *7*, e38801. [\[CrossRef\]](#)

214. Smolen, G.A.; Schott, B.J.; Stewart, R.A.; Diederichs, S.; Muir, B.; Provencher, H.L.; Look, A.T.; Sgroi, D.C.; Peterson, R.T.; Haber, D.A. A Rap GTPase interactor, RADIL, mediates migration of neural crest precursors. *Gen. Dev.* **2007**, *21*, 2131–2136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
215. Sequera, C.; Manzano, S.; Guerrero, C.; Porras, A. How Rap and its GEFs control liver physiology and cancer development. C3G alterations in human hepatocarcinoma. *Hepatic Oncol.* **2018**, *5*, HEP05. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
216. Baker, M.J.; Pan, D.X.; Welch, H.C.E. Small GTPases and their guanine-nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins in neutrophil recruitment. *Curr. Opin. Hematol.* **2016**, *23*, 44–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
217. Schultess, J.; Danielewski, O.; Smolenski, A.P. Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood* **2005**, *105*, 3185–3192. [\[CrossRef\]](#)
218. Park, Y.G.; Zhao, X.H.; Lesueur, F.; Lowy, D.R.; Lancaster, M.; Pharoah, P.; Qian, X.L.; Hunter, K.W. Sip1 is a candidate for underlying the metastasis efficiency modifier locus Mtes1. *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 1055–1062. [\[CrossRef\]](#)
219. Rosano, L.; Cianfrocca, R.; Masi, S.; Spinella, F.; Di Castro, V.; Biroccio, A.; Salvati, E.; Nicotra, M.R.; Natali, P.G.; Bagnato, A. beta-Arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2806–2811. [\[CrossRef\]](#)
220. Eisemann, T.; McCauley, M.; Langelier, M.F.; Gupta, K.; Roy, S.; Van Duyn, G.D.; Pascal, J.M. Tankyrase-1 Ankyrin Repeats Form an Adaptable Binding Platform for Targets of ADP-Ribose Modification. *Structure* **2016**, *24*, 1679–1692. [\[CrossRef\]](#)
221. Murayama, M.; Tanaka, S.; Palacino, J.; Murayama, O.; Honda, T.; Sun, X.Y.; Yasutake, K.; Nihonmatsu, N.; Wolozin, B.; Takashima, A. Direct association of presenilin-1 with beta-catenin. *FEBS Lett.* **1998**, *433*, 73–77. [\[CrossRef\]](#)
222. Lee, G.; Goretsky, T.; Managlia, E.; Dirisina, R.; Singh, A.P.; Brown, J.B.; May, R.; Yang, G.Y.; Ragheb, J.W.; Evers, B.M.; et al. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Mediates beta-Catenin Activation in Intestinal Epithelial Stem and Progenitor Cells in Colitis. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 869–881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
223. Jiang, X.; Tan, J.; Li, J.S.; Kivimaa, S.; Yang, X.J.; Zhuang, L.; Lee, P.L.; Chan, M.T.W.; Stanton, L.W.; Liu, E.T.; et al. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 529–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
224. Sastre-Perona, A.; Riesco-Eizaguirre, G.; Zaballos, M.A.; Santisteban, P. beta-catenin signaling is required for RAS-driven thyroid cancer through PI3K activation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49435–49449. [\[CrossRef\]](#)
225. Mariotti, L.; Pollock, K.; Guettler, S. Regulation of Wnt/beta-catenin signalling by tankyrase-dependent poly(ADP-ribose)ylation and scaffolding. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 4611–4636. [\[CrossRef\]](#)
226. Fang, D.X.; Hawke, D.; Zheng, Y.H.; Xia, Y.; Meisenhelder, J.; Nika, H.; Mills, G.B.; Kobayashi, R.; Hunter, T.; Lu, Z.M. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 11221–11229. [\[CrossRef\]](#)
227. Bah, A.; Vernon, R.M.; Siddiqui, Z.; Krzeminski, M.; Muhandiram, R.; Zhao, C.; Sonenberg, N.; Kay, L.E.; Forman-Kay, J.D. Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **2015**, *519*, 106–109. [\[CrossRef\]](#)
228. Bah, A.; Forman-Kay, J.D. Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 6696–6705. [\[CrossRef\]](#)
229. Iakoucheva, L.M.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; O'Connor, T.R.; Sikes, J.G.; Obradovic, Z.; Dunker, A.K. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1037–1049. [\[CrossRef\]](#)
230. van Gestel, J.; Hendrickx, J.O.; Leysen, H.; Santos-Otte, P.; Luttrell, L.M.; Martin, B.; Maudsley, S. beta-Arrestin Based Receptor Signaling Paradigms: Potential Therapeutic Targets for Complex Age-Related Disorders. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1369. [\[CrossRef\]](#)
231. Jones, B.W.; Hinkle, P.M. Arrestin binds to different phosphorylated regions of the thyrotropin-releasing hormone receptor with distinct functional consequences. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 195–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
232. Oride, A.; Kanasaki, H.; Mutiara, S.; Purwana, I.N.; Miyazaki, K. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) by perfused thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulation in rat pituitary GH3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2008**, *296*, 78–86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
233. Sibilski, C.; Mueller, T.; Kollipara, L.; Zahedi, R.P.; Rapp, U.R.; Rudel, T.; Baljuls, A. Tyr(728) in the Kinase Domain of the Murine Kinase Suppressor of RAS 1 Regulates Binding and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35237–35252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
234. McKay, M.M.; Ritt, D.A.; Morrison, D.K. Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11022–11027. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
235. Chuang, H.C.; Wang, X.H.; Tan, T.H. MAP4K Family Kinases in Immunity and Inflammation. *Adv. Immunol.* **2016**, *129*, 277–314. [\[PubMed\]](#)
236. Gurevich, V.V.; Gurevich, E.V. Arrestin-mediated signaling: Is there a controversy? *World J. Biol. Chem.* **2018**, *9*, 25–35. [\[CrossRef\]](#)
237. Bourquard, T.; Landomiel, F.; Reiter, E.; Crepieux, P.; Ritchie, D.W.; Aze, J.; Poupon, A. Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/beta-arrestin/Erk module complex. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10760. [\[CrossRef\]](#)
238. Claing, A. beta-Arrestins: Modulators of Small GTPase Activation and Function. *Mol. Biol. Arrestins* **2013**, *118*, 149–174.
239. Du, R.W.; Du, R.H.; Bu, W.G. beta-arrestin 2 mediates the anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2014**, *9*, 582–590. [\[CrossRef\]](#)

240. Arakaki, A.K.S.; Pan, W.A.; Wedegaertner, H.; Roca-Mercado, I.; Chinn, L.; Gujral, T.S.; Trejo, J.A. α -Arrestin ARRD3 tumor suppressor function is linked to GPCR-induced TAZ activation and breast cancer metastasis. *J. Cell Sci.* **2021**, *134*, jcs254888. [[CrossRef](#)]
241. Wang, Y.H.; Jue, S.F.; Maurer, R.A. Thyrotropin-releasing hormone stimulates phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in GH(3) pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 1328–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Luo, L.G.; Yano, N.; Luo, J.Z.Q. The molecular mechanism of EGF receptor activation in pancreatic beta-cells by thyrotropin-releasing hormone. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metabol.* **2006**, *290*, E889–E899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Collazos, A.; Diouf, B.; Guerneau, N.C.; Quittau-Prevostel, C.; Peter, M.; Coudane, F.; Hollande, F.; Joubert, D. A spatiotemporally coordinated cascade of protein kinase C activation controls isoform-selective translocation. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2247–2261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Lampe, M.; Vassilopoulos, S.; Merrifield, C. Clathrin coated pits, plaques and adhesion. *J. Struct. Biol.* **2016**, *196*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Thirunaryanan, N.; Nir, E.A.; Raaka, B.M.; Gershengorn, M.C. Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Type 1 (TRH-R1), not TRH-R2, Primarily Mediates Taltirelin Actions in the CNS of Mice. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 950–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Martinez-Cue, C.; Rueda, N. Signalling Pathways Implicated in Alzheimer's Disease Neurodegeneration in Individuals with and without Down Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Cherubini, M.; Wade-Martins, R. Convergent pathways in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* **2018**, *373*, 79–90. [[CrossRef](#)]
248. Bohush, A.; Niewiadomska, G.; Filipek, A. Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2973. [[CrossRef](#)]
249. Fawdar, S.; Trotter, E.W.; Li, Y.Y.; Stephenson, N.L.; Hanke, F.; Marusiak, A.A.; Edwards, Z.C.; Ientile, S.; Waszkowycz, B.; Miller, C.J.; et al. Targeted genetic dependency screen facilitates identification of actionable mutations in FGFR4, MAP3K9, and PAK5 in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12426–12431. [[CrossRef](#)]
250. Kahle, M.P.; Cuevas, B.D. Interaction with the Paxillin LD1 Motif Relieves MEKK2 Auto-inhibition. *J. Mol. Signal.* **2015**, *10*, 4. [[CrossRef](#)]
251. Stark, M.S.; Woods, S.L.; Gartside, M.G.; Bonazzi, V.F.; Dutton-Regester, K.; Aoude, L.G.; Chow, D.; Sereduk, C.; Niemi, N.M.; Tang, N.Y.; et al. Frequent somatic mutations in MAP3K5 and MAP3K9 in metastatic melanoma identified by exome sequencing. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 165–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Vaidyanathan, H.; Opoku-Ansah, J.; Pastorino, S.; Renganathan, H.; Matter, M.L.; Ramos, J.W. ERK MAP kinase is targeted to RSK2 by the phosphoprotein PEA-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19837–19842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Ravindran, E.; Hu, H.; Yuzwa, S.A.; Hernandez-Miranda, L.R.; Kraemer, N.; Ninnemann, O.; Musante, L.; Boltshauser, E.; Schindler, D.; Hubner, A.; et al. Homozygous ARHGEF2 mutation causes intellectual disability and midbrain-hindbrain malformation. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Lee, S.; Cieply, B.; Yang, Y.Q.; Peart, N.; Glaser, C.; Chan, P.; Carstens, R.P. Esrp1-Regulated Splicing of Arhgef11 Isoforms Is Required for Epithelial Tight Junction Integrity. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 2417–2430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Rykx, A.; De Kimpe, L.; Mikhlap, S.; Vantus, T.; Seufferlein, T.; Vandenheede, J.R.; Van Lint, J. Protein kinase D: A family affair. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 81–86. [[CrossRef](#)]