

Souhrn

První část disertační práce se zabývá identifikací proteinů izolovaných ve frakci obohacené o plasmatické membrány získané z buněčné linie HEK293-E2M11, jejichž hladina byla změněna po dlouhodobém působení thyroliberinu (TRH). Pomocí techniky imunoblotu se specifickými protilátkami proti Na,K-ATPase a vazebných pokusů s [³H]TRH a [³⁵S]GTPγS bylo zjištěno, že frakce obohacená o plasmatické membrány obsahovala v porovnání s postnukleárním supernatantem výrazně vyšší množství Na,K-ATPasy, TRH receptoru a G-proteinů. Pro detekci a identifikaci proteinů ve frakci obohacené o plasmatické membrány, jejichž hladiny byly po dlouhodobém působení TRH (16 h; 10 μM) změněny, byly použity 2D elektroforéza a hmotnostní spektrometrie. Bylo identifikováno 42 proteinů, z nichž pět (mitofilin, MTHSP75, prohibitin, stomatin like-2, peroxiredoxin III) představuje mitochondriální proteiny, které jsou důležité pro zajištění správné struktury a funkce mitochondrií. Hladina těchto proteinů byla zvýšena po dlouhodobém působení TRH, a proto lze usuzovat, že dlouhodobé působení TRH může výrazně ovlivnit mitochondriální membránu a funkci mitochondrií.

Druhá část disertační práce se zabývá identifikací molekulárních komplexů TRH receptoru a/nebo G_{q/11} proteinu. Pomocí nativní elektroforézy byly identifikovány tři komplexy obsahující TRH receptor a čtyři komplexy obsahující G_{q/11}α protein. Komplex TRH receptoru detekovaný v oblasti 80 kDa odpovídá dimeru TRH receptoru, což bylo prokázáno pomocí experimentů, při nichž byly proteinové komplexy solubilizovány při různých teplotách. Molekulární komplex detekovaný v oblasti 140 kDa reprezentuje membránově vázaný preasociovaný komplex TRH receptoru a G_{q/11} proteinu, což bylo potvrzeno ko-imunoprecipitací a experimenty, při nichž byly využity buněčná linie HEK293-E2 exprimující menší množství G₁₁α proteinu v porovnání s buněčnou linií HEK293-E2M11 a RNA interference, při které byly sníženy hladiny Gβ₁ a Gβ₂ proteinů. Krátkodobé působení TRH (10–30 min) vedlo k disociaci preasociovaného komplexu TRH receptoru a G_{q/11} proteinu a současně ke zvyšování hladiny dimeru TRH receptoru, což mohlo být způsobeno uvolňováním dimeru TRH receptoru z preasociovaného komplexu TRH receptoru a G_{q/11} proteinu. Po dlouhodobém působení TRH došlo k částečnému opětovnému formování preasociovaného komplexu TRH receptoru a G_{q/11} proteinu. Signál G_{q/11} proteinu v oblasti 140 kDa detekovaný imunoblotem zřejmě odpovídá nejen preasociovanému komplexu TRH receptoru a G_{q/11} proteinu, ale komplexům G_{q/11} proteinu s různými receptory spřaženými s G_{q/11} proteiny.

Membránově vázaný komplex G_{q/11} proteinu detekovaný 300 kDa se rozpadal po dlouhodobém působení TRH (4–16 h) podobně jako komplexy G_{q/11} proteinu s receptory spřaženými s G_{q/11} proteiny, zatímco takové působení vedlo ke tvorbě komplexů G_{q/11}α proteinu detekované v oblasti 70 kDa v cytosolu. Tyto děje souvisí s down-regulací G_{q/11}α proteinu a jeho translokací z membránově vázaných do cytosolárních komplexů.

Hladiny vysokomolekulárního komplexu TRH receptoru detekovaného v oblasti 500 kDa a komplexu $G_{q/11}\alpha$ proteinu detekovaného v oblasti 700 kDa byly zvýšeny po krátkodobém působení TRH (10–30 min), což naznačuje, že TRH receptor a $G_{q/11}\alpha$ protein mohou být přemístěny do těchto komplexů z preformovaného komplexu TRH receptor a $G_{q/11}\alpha$ proteinu. V případě $G_{q/11}\alpha$ proteinu byla tato hypotéza podpořena pomocí vazebného pokusu s [^{35}S]GTP γ S a autoradiografie. K možným interagujícím partnerům TRH receptoru nebo $G_{q/11}\alpha$ proteinu v těchto vysokomolekulárních komplexech patří zřejmě GRK2 a fosfolipasa C β .

Závěrem lze říci, že nativní elektroforéza je vhodnou metodou pro izolaci a zkoumání molekulárních proteinových komplexů. Využitím této metody jsme zjistili, že TRH receptor může tvořit preformovaný komplex s $G_{q/11}$ proteinem, a proto ho lze zařadit mezi receptory, které vytváří s příslušnými G-proteiny komplexy i v nestimulovaných buňkách. Stabilita detekovaného preformovaného komplexu TRH receptoru a $G_{q/11}$ proteinu stejně jako dalších detekovaných komplexů TRH receptoru nebo $G_{q/11}$ proteinu byla výrazně ovlivněna působením thyroliberinem. Tyto výsledky naznačují, že hormonální působení může narušit nebo formovat interakce mezi proteiny a přeuspořádat jednotlivé komponenty v rámci různých proteinových komplexů v plasmatické membráně.