

Charles University in Prague

Faculty of Science



Summary of PhD. Thesis

**Cell signalling and molecular complexes
of the TRH receptor**

Mgr. Zdeňka Drastichová

Prague 2012

Doctoral study programmes in Biomedicine

*Charles University in Prague and
Academy of Science of the Czech Republic*

Programme: Animal Physiology

Chairman
of the Academic Board: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Author: Mgr. Zdeňka Drastichová

Supervisor: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Training Institution: Department of Physiology
Faculty of Science
Charles University in Prague
Viničná 7
128 43 Prague 2

Full version of the thesis is available at the dean's office of the Faculty of Science,
Charles University in Prague.

Content

1. Summary	4
2. Introduction	5
3. Aims	6
4. Methods	6
5. Results and Discussion	7
6. Conclusion	20
7. References	21
8. List of Author's Publications	22

Abbreviations

2DE	Two-dimensional electrophoresis
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CN-PAGE	Clear native polyacrylamide gel electrophoresis
E2	Cell line HEK293 expressing exogenous TRH receptor
E2M11	Cell line HEK293 expressing exogenous TRH receptor and G ₁₁ α protein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GDP	Guanosine diphosphate
GPCR	G-protein coupled receptor
GRK	G-protein coupled receptor kinase
GRP75	Glucose-regulated protein 75
GTP	Guanosine triphosphate
GTPγS	Non-hydrolyzable analog of GTP
HEK293	Human embryonic kidney 293
LDH	Lactate dehydrogenase
LM	Lauryl maltoside
MS	Mass spectrometry
MTHSP75	Mitochondrial heat shock protein 75
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PLC	Phospholipase C
PM	Plasma membrane
PNS	Postnuclear supernatant
RGS	Regulator of G-protein signalling
SDS	Sodium dodecylsulfate
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
TNF	Tumor necrosis factor
TRH	Thyrotropin-releasing hormone
TRH-R	TRH receptor

1. Summary

The first part of this thesis is preoccupied with the identification of protein alterations in the membrane fraction of HEK293-E2M11 cells after prolonged TRH treatment. The isolated membrane fraction enriched in plasma membranes contained markedly increased the amount of Na,K-ATPase, TRH receptor and G-proteins compared to the postnuclear supernatant. By using 2D electrophoresis and mass spectrometry, the levels of 42 proteins were identified to be altered in samples of PM-enriched fractions from TRH-treated (16 h; 10 μ M) cells. Out of these proteins only ezrin and stomatin-like 2 are known to be localized in the plasma membrane. Five proteins (mitofilin, MTHSP75, prohibitin, stomatin like-2, peroxiredoxin III) whose levels were increased after the prolonged TRH treatment represent proteins localized in mitochondria. All of them are important for proper structure and function of mitochondria. The ratio of anti-apoptotic Bcl-2 to pro-apoptotic Bax was markedly higher in cells treated with TRH than in control untreated cells. Hence, it can be concluded that prolonged TRH treatment may significantly affect mitochondrial membrane and function of mitochondria.

The second part of this thesis deals with the identification of molecular protein complexes of TRH-R and/or $G_{q/11}$ protein. The presumed effects of TRH on the stability of these complexes have also been investigated. By native electrophoresis, three complexes of TRH-R and four complexes of $G_{q/11}\alpha$ protein were identified. The TRH-R complex found in the 80 kDa region corresponds to TRH-R dimer, which was proved by experiments analysing the effect of solubilisation at different temperature. The molecular complex detected in the 140 kDa region represents a pre-associated TRH-R- $G_{q/11}$ complex, which was verified by co-immunoprecipitation and experiments on cells with decreased levels of the $G\alpha$ and $G\beta$ subunits of $G_{q/11}$ proteins. Short-term (10–30 min) treatment with TRH led to dissociation of the pre-associated TRH-R- $G_{q/11}$ complex with concomitant increase in the level of TRH-R dimer while long-term TRH treatment resulted in partial re-association of TRH-R- $G_{q/11}$ complex apparently due to up-regulation of TRH-R. The immunoblot signal of $G_{q/11}$ protein in the 140 kDa region apparently corresponds not only to the pre-associated TRH-R- $G_{q/11}$ complex but also to molecular complexes of $G_{q/11}$ protein with other $G_{q/11}$ -coupled receptors.

The $G_{q/11}$ complexes found in the 140 kDa and 300 kDa regions were observed to be membrane-bound while $G_{q/11}\alpha$ complexes in the 70 kDa region were cytosolic. Prolonged TRH treatment induced dissociation of membrane-bound $G_{q/11}$ complexes in the 140 kDa and 300 kDa regions and translocation of $G_{q/11}\alpha$ from the plasma membrane into the cytosol, which was connected with concomitant formation of cytosolic $G_{q/11}\alpha$ complexes. The second reason for a decrease in the level of membrane-bound $G_{q/11}$ complexes was down-regulation of $G_{q/11}\alpha$ proteins after prolonged TRH treatment.

High-molecular-weight complexes of TRH-R or $G_{q/11}\alpha$ were observed in the 500 kDa or 700 kDa regions, respectively. The levels of both these complexes were found to increase after short-term

TRH treatment suggesting that TRH-R and $G_{q/11}\alpha$ can be translocated from the pre-associated TRH-R– $G_{q/11}$ complex. In case of $G_{q/11}\alpha$, this hypothesis was confirmed by [^{35}S]GTP γ S binding assay followed by autoradiography. The signal of bound [^{35}S]GTP γ S in the 700 kDa $G_{q/11}\alpha$ complex was markedly enhanced after TRH treatment. GRK2 and PLC β were assessed as potential components of these high-molecular-weight complexes.

Altogether, our present studies have demonstrated that native electrophoresis can serve as a highly suitable method for separation and investigation of molecular complexes. By using this approach, we were able to show that the TRH receptor may form a pre-associated complex with its cognate G-protein and therefore it can be included among other GPCRs that constitute such complexes. The stability of this TRH-R– $G_{q/11}$ complex as well as other resolved receptor or $G_{q/11}$ protein complexes were markedly influenced by TRH treatment, which indicates that hormones can modulate the interactions between proteins and re-arrange proteins within complexes in the plasma membrane.

2. Introduction

TRH receptor belongs to the family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) which are transmembrane proteins transferring the signals received from the extracellular environment into the cell interior. TRH receptor is activated by binding of thyrotropin-releasing hormone (TRH), a tripeptide produced by the hypothalamus. This hormone was shown to have neuroprotective and anti-depressant effects and acts not only in nervous system but also in pancreas, cardiovascular system or thymus. The signal from TRH receptor is transferred via $G_{q/11}$ protein, which subsequently activates phospholipase C β (PLC β) triggering cleavage of phosphatidylinositol bisphosphate to diacylglycerol and inositol triphosphate. Increase in intracellular concentrations of these molecules results in activation of signalling pathways determining cell fate.

An important feature of GPCRs is their ability to form dimers or higher-structure oligomers. TRH receptor was shown to form homodimers but it does not interact with other types of receptors in order to form heterodimers. Dimerization could play an important role in receptor trafficking as well as signalling. At least in case of some receptors, the classical concept of interaction between the receptor and the G-protein with the 1:1 stoichiometry should be replaced with the 2:1 stoichiometry, which takes into account the existence of receptor dimers.

The transfer of signal is carried out by specific interactions between proteins. The protein-protein interactions of signalling molecules determine which signalling pathways will be triggered. A generally accepted model suggests that a GPCR interacts with appropriate G-protein only after its activation. On the other hand, several recently published reports supports a model in which receptors and G-proteins form pre-associated molecular complexes. It seems that such formation of GPCR-G

protein complex is dependent on the type of receptor and subunits of G-protein as well as on the level of their expression.

The prolonged or repeated stimulation of cells with a particular hormone leads to desensitization, a process in which biological response to some stimulus is decreased or eliminated in order to protect cells against damage. Desensitization on the level of receptors is realized by receptor sequestration, redistribution or degradation. Similar mechanisms can be also observed on the level of G-proteins. Desensitization of TRH receptor is initiated by receptor phosphorylation, which is mediated by G-protein-coupled receptor kinases (GRKs). β -Arrestins interact with phosphorylated TRH receptors and form clathrin-coated pits with AP-2 adaptor protein and clathrin. TRH receptors can be dephosphorylated and subsequently recycled to the plasma membrane or degraded in lysosomes.

3. Aims

The primary objective of this thesis was to investigate signal transduction via thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and $G_{q/11}$ protein in HEK293 cell line exogenously expressing long isoform of rat TRH receptor (TRH-R1) and mouse $G_{11\alpha}$ protein (clone E2M11). There were two main aims to explore. The first one was preoccupied with determination of the impact of prolonged TRH effects on the expression of membrane-bound proteins and the second was focused on identification of signalling molecular complexes of TRH receptor and its cognate $G_{q/11}$ protein.

Specific aims:

- 1) To isolate the plasma membrane-enriched fraction from HEK293-E2M11 cells
- 2) To investigate the effects of prolonged TRH treatment (10 μ M, 16 h) on expression proteins in the plasma membrane-enriched fraction by 2D electrophoresis
- 3) To identify the altered proteins by mass spectrometry
- 4) To identify and characterise presumed complexes of the TRH receptor and/or $G_{q/11\alpha}$ protein
- 5) To assess the effect of TRH on the stability of the identified TRH-R and/or $G_{q/11}$ protein molecular complexes

4. Methods

Cell culture

HEK293-E2M11 cells stably expressing both the long isoform of TRH-R and the mouse $G_{11\alpha}$ protein and HEK293-E2 stably expressing the long isoform of the rat TRH-R were used for experiments.

Isolation of the plasma membrane-enriched fraction and the cytosol

Ligand binding study of TRH receptors
Agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS binding assay
SDS-PAGE and immunoblotting
2D electrophoresis
Staining of polyacrylamide gels
Mass spectrometry
CN-PAGE (Clear native electrophoresis)
CN/SDS-PAGE
Autoradiography
RNA interference
Immunoprecipitation

5. Results and Discussion

Isolation of plasma membrane-enriched fraction and cytosol

For investigation of protein alterations in cells after hormone exposure, the postnuclear supernatant (PNS) from HEK293-E2M11 cell line was fractionated on Percoll^R density gradient. The cytosolic fraction on the top of gradient and two membrane fractions were isolated. By SDS-PAGE and immunoblotting, the upper membrane fraction was denoted as the plasma membrane (PM)-enriched fraction because of high amount of Na,K-ATPase (a marker of plasma membrane) compared to the lower membrane fraction. The cytosolic fraction did not contain Na,K-ATPase but it was enriched with lactate dehydrogenase B (LDH, a marker of cytosol). The PM-enriched fraction and the cytosolic fraction were not contaminated with each other.

The amount of TRH receptor in the PM-enriched fraction and PNS was compared by analysis of [³H]TRH/TRH displacement curves according to the method of DeBlasi *et al.* (DeBlasi *et al.*, 1989). The affinity of [³H]TRH binding to TRH binding sites was similar in both fractions ($K_D = 21.4 \pm 4.5$ nM in the PNS, $K_D = 28.9 \pm 6.2$ nM in the PM-enriched fraction) whereas the number of TRH binding sites was significantly increased in the PM-enriched fraction compared to the PNS ($B_{max} = 2.2 \pm 0.8$ pmol/mg protein in the PNS, $B_{max} = 11.3 \pm 1.5$ pmol/mg protein in the PM-enriched fraction) (Fig. 1A). The functional activity of G-proteins in the PNS and PM-enriched fraction was measured by [³⁵S]GTPγS binding assay. The assessment of basal and TRH stimulated [³⁵S]GTPγS bindings in both samples demonstrated that the sample of the PM-enriched fraction exerted almost 10 times higher basal as well as TRH-stimulated (1.10^{-5} M) [³⁵S]GTPγS binding than the PNS (Fig. 1B).

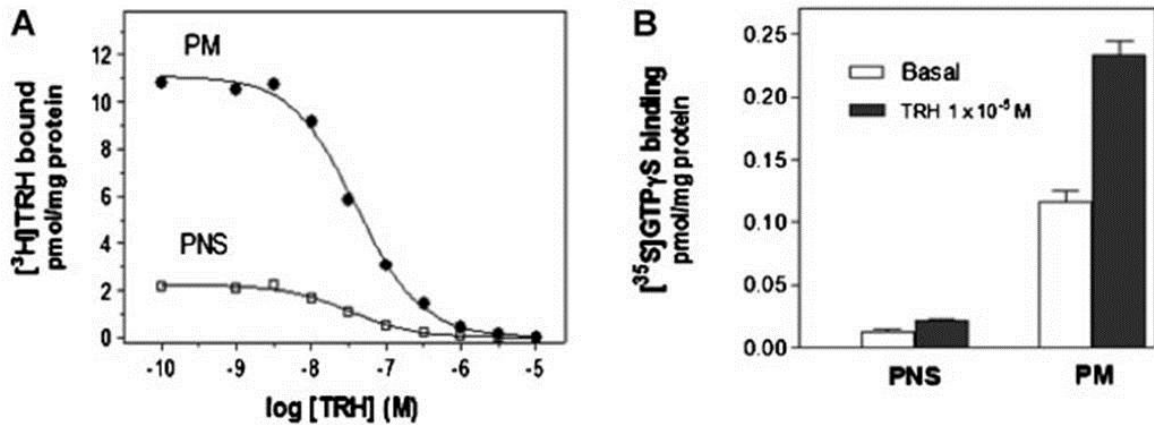


Fig. 1

[³H]TRH and [³⁵S]GTP γ S binding assays in the PNS and PM-enriched fraction. The TRH distribution was compared in samples of the PNS and PM-enriched fraction using [³H]TRH/TRH competition binding experiments which were performed in triplicates and calculated according to DeBlasi *et al.* (DeBlasi *et al.*, 1989) (A). [³⁵S]GTP γ S binding assay was carried out as a one-point assay with 5 nM [³⁵S]GTP γ S and 2 mM GDP in samples of the PNS and PM-enriched fraction from control cells. Open and solid bars represent basal and TRH stimulated [³⁵S]GTP γ S binding, respectively (B).

A proteomic study of the TRH effects

In order to determine down-regulation and solubilisation of G_{q/11} α protein after TRH treatment, the levels of G_{q/11} α in samples of the PNS, PM-enriched fraction and cytosol from control and TRH-treated (1.10⁻⁵ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h) HEK293-E2M11 cells were detected by SDS-PAGE and immunoblotting. Prolonged (4–16 h) TRH treatment resulted in down-regulation of G_{q/11} α protein, which was indicated by decreasing amount of G_{q/11} α protein in the PNS. It also led to translocation of G_{q/11} α protein from membranes to cytosol. The immunoblot signal of G_{q/11} α protein in the PM-enriched and cytosolic fraction after longer time intervals of TRH treatment was decreasing and increasing, respectively. Similar observations were found previously by immunofluorescence microscopy and 2D electrophoresis (Drmotá *et al.*, 1998; Matousek *et al.*, 2005; Matousek *et al.*, 2004).

Proteins in the PM-enriched fraction of control and TRH-treated (1.10⁻⁵ M, 16 h) cells were resolved by 2D electrophoresis and stained spots were analysed by PDQuest software. In samples from TRH-treated cells, 4 proteins were found to disappear, the levels of 18 proteins decreased and the levels of 39 proteins increased. Forty-two proteins out of the 61 observed altered proteins were identified by mass spectrometry.

One of the identified proteins whose level was enhanced by TRH treatment was ezrin which is a member of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family. These proteins ensure cross-link of cortical actin with the plasma membrane via its N-terminal four-point-one ERM (FERM) domain (Cant and Pitcher,

2005). It was reported earlier that ezrin directly interacts with α_{1B} -adrenergic receptor through a polyarginine motif in the C-terminal region of the receptor and this interaction contributes to receptor recycling to the plasma membrane (Stanasila *et al.*, 2006). Thus, it can be supposed that the increase in the level of ezrin induced by prolonged TRH treatment can be connected with recycling of TRH receptor to the plasma membrane and receptor trafficking as well as actin re-organization.

Some proteins identified by 2DE/MS represent proteins which take part in formation of cristae and thus are necessary for proper function of mitochondria. The identified proteins included prohibitin, peroxiredoxin III, MTHSP75 (GRP75, mortalin), mitofilin and stomatin like-2 protein. The levels of these proteins were increased by TRH treatment, which was verified by SDS-PAGE and immunoblotting for some proteins (Fig. 2).

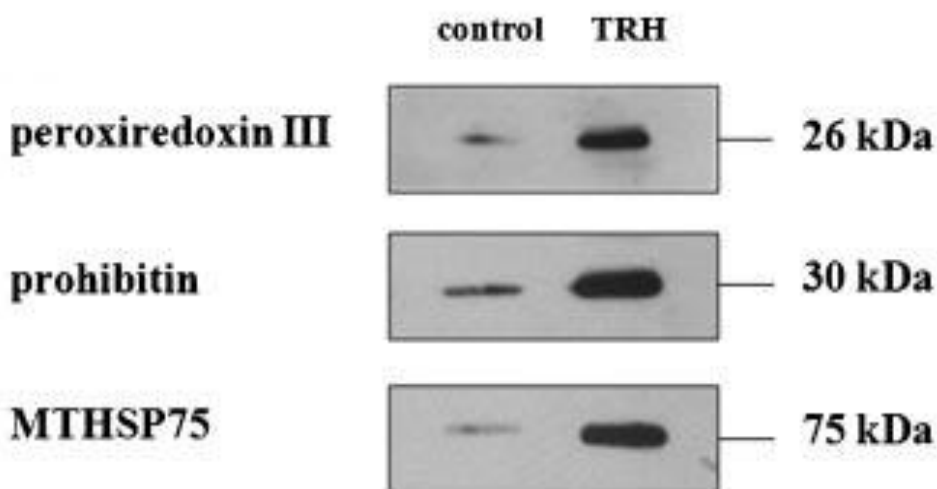


Fig. 2

Effect of long-term TRH treatment on the levels of peroxiredoxin III, prohibitin and MTHSP75. The increase in levels of the protective proteins identified by 2DE/MS was verified by SDS-PAGE and immunoblotting with specific antibodies. The immunoblot signals of peroxiredoxin III, prohibitin and MTHSP75 TRH-treated (1.10^{-5} M, 16 h) were significantly increased after TRH treatment as compared to controls.

Prohibitin is a protein forming large complexes at the inner mitochondrial membrane and its loss led to dysfunction of mitochondria, increased generation of reactive oxygen species, abnormal cristae morphology and an increased sensitivity towards stimuli which provoke apoptosis (Osman *et al.*, 2009). Prohibitin complexes serving as protein and lipid scaffolds can control mitochondrial structure and integrity (Montero *et al.*, 2010). Stomatin like-2 protein was found to directly interact with prohibitin and stabilize it (Osman *et al.*, 2009). Peroxiredoxin III is a mitochondrial antioxidant protein which scavenges H_2O_2 and protects cardiolipin from lipid peroxidation (Wolf *et al.*, 2010). Depletion of peroxiredoxin III in HeLa cells led to an increase of intracellular levels of H_2O_2 , a release

of cytochrome c, caspase activation and sensitization of cells to induction of apoptosis by staurosporine or TNF- α (Chang *et al.*, 2004; John *et al.*, 2005). Mitofilin seems to be essential for the formation of normal tubular cristae and cristae junctions because depletion of mitofilin resulted in a strong change in the organization of inner membrane and mitochondrial structural and functional abnormalities (John *et al.*, 2005). MTHSP75 (GRP75, mortalin) is a mitochondrial chaperone which interacts with different metabolic enzymes, proteins involved in cell survival and differentiation and protein p53 (Mihara *et al.*, 2003). Altogether, the levels of all these five mitochondrial proteins were enhanced by the prolonged TRH treatment suggesting the TRH exposure can support mitochondrial function and integrity.

Next, the potential protective and anti-apoptotic effect of TRH was assessed by evaluation of the Bcl-2/Bax ratio. Samples of the postnuclear supernatant from control and TRH-treated (1.10^{-5} M, 16 h) cells as well as control and TRH-treated (1.10^{-5} M, 12 h) cells subsequently incubated with camptothecin (1.10^{-6} M, 4 h), a drug causing DNA damage and subsequent apoptosis, were resolved by SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose membranes and incubated with specific antibodies against Bcl-2 and Bax (Fig. 3). The Bcl-2/Bax ratio was assessed as a ratio of the intensities of Bcl-2 and Bax immunoblot signals in samples of control and treated cells. The Bcl-2/Bax ratio in control sample was 1. This ratio in TRH-treated sample, camptothecin-treated sample and TRH/camptothecin-treated sample were 3.9, 0.6 and 1.6, respectively.

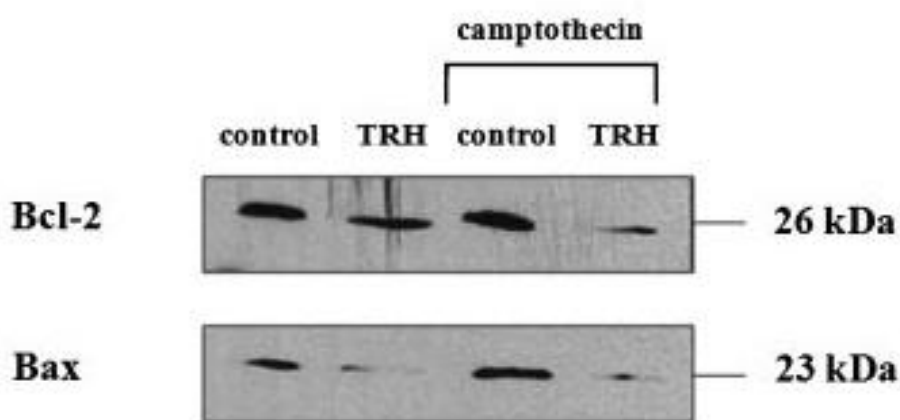


Fig.3

Effect of long-term TRH treatment on the levels of Bcl-2 a Bax proteins. The levels of Bcl-2 and Bax were observed in control and TRH-treated (1.10^{-5} M, 16 h) cells as well as in camptothecin-treated (1.10^{-6} M, 4 h) or TRH-treated (1.10^{-5} M, 12 h) and subsequently camptothecin-treated (1.10^{-6} M, 4 h) cells. The levels of these proteins were evaluated by SDS-PAGE and immunoblotting.

TRH has been reported to induce apoptosis or exert neuroprotective effects, which was investigated mainly in β pancreatic and neuronal cells. Treatment with 200 nM TRH for 1 h led to

down-regulation of pro-apoptotic genes coding Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2-associated death promoter (BAD) and Fas antigen (Luo and Yano, 2005). Another study analysing the effect of TRH on rat pancreas revealed that TRH exposure stimulated pro-apoptotic gene p53 as well as Bcl-2-like protein 1 (BclX), which might indicate dual biological actions in different pancreatic cell types (Yano and Luo, 2004). On the other hand, treatment of human islet-derived precursor cells (hIPCs) with 1 μ M TRH for 24 h decreased the number of viable cells and resulted in a release of cytochrome c from mitochondria (Mulla *et al.*, 2009). Pre-treatment with 1 μ M TRH for 24 h on primary neuronal cells culture attenuated the neuronal cell death evoked by glutamate, H₂O₂ and staurosporine (Jantas *et al.*, 2009). Another study investigating TRH neuroprotection in human neuroblastoma SH-SY5Y differentiated by retinoic acid (RA) revealed the increased level of Bcl-2 after 24-h treatment with 1 μ M and 10 μ M TRH (Jaworska-Feil *et al.*, 2010).

In conclusion, the effects of TRH can differ dependently on TRH concentration as well as type of the observed cells. Our present data indicate that prolonged treatment with 10 μ M TRH of HEK293 trigger the cytoprotective processes. In addition, our findings suggest that TRH may have supportive effect on the structure of mitochondrial membrane, formation of cristae and mitochondrial function.

A study of the preformed molecular complex of TRH-R and G_{q/11} protein

Presumed molecular complexes of TRH-R and/or G_{q/11} protein were separated and characterized by means of native electrophoresis. Samples of the postnuclear supernatant from control HEK293-E2M11 cell line were solubilised with detergents digitonin, lauryl maltoside (LM), Brij 56, Triton X-100, CHAPS and SDS at different concentration for 30 min at 0°C and separated by CN-PAGE. After immunoblotting and incubation with TRH-R1 antibodies, two distinct protein complexes involving TRH-R1 were detected in the areas of 140 kDa and 80 kDa (Fig. 4A). The complexes of G_{q/11} α and G β proteins which were detectable only with the detergent lauryl maltoside were found in the 140 kDa region (Fig. 4B,C). The increased concentration of LM caused separation of two G_{q/11} α protein complexes in the 140 kDa region. The identified immunoblot signals of TRH-R1, G_{q/11} α and G β proteins in the area of 140 kDa suggest that these proteins could form a TRH-R1-G_{q/11} protein complex in control (resting) HEK293-E2M11 cells.

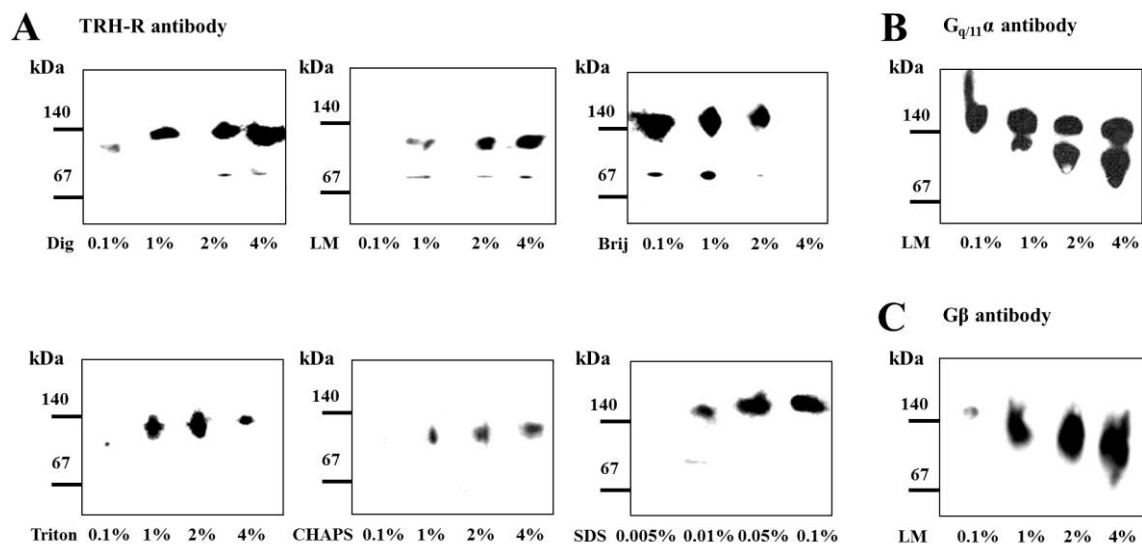


Fig. 4

Detection of protein complexes of TRH-R and G_{q/11} protein. Samples of the PNS from HEK293-E2M11 cell line were solubilised with detergents digitonin (Dig), lauryl maltoside (LM), Brij 56, Triton X-100, CHAPS and SDS at different concentrations. The solubilised protein complexes were resolved by CN-PAGE and immunoblotted with specific antibodies. Two distinct complexes of TRH-R were detected in the areas of 140 kDa and 80 kDa (A). Protein complexes of G_{q/11}α and Gβ proteins were detected only in the area of 140 kDa (B, C).

The signal intensity of protein complexes was significantly affected by the character of applied detergent as well as their concentration, which can be connected with different efficiency of individual detergents. Detergents may also influence the mobility of complexes in the gel. The shift in mobility of amphiphilic molecules induced by application of detergents and Coomassie G-250 was described previously (Helenius and Simons, 1977; Wittig *et al.*, 2007). Based on these preliminary experiments, the optimal concentration of detergents used for solubilisation was chosen to be 1% for LM, Brij 56, Triton X-100, CHAPS and digitonin and 0.05% for SDS.

TRH receptor is able to form dimers and substantial portion of them is glycosylated at their N-terminus (Zhu *et al.*, 2002). The dimers of glycosylated TRH receptors were observed at molecular size of 150 kDa and were stable at increased temperature (37°C). Nevertheless, the sample solubilisation performed at 37°C for 30 min resulted in disappearance of TRH-R1 and G_{q/11}α signals in the region of 140 kDa and appearance of TRH-R1 and G_{q/11}α signals at molecular size about 80 kDa and 45 kDa, respectively. Thus, it can be concluded that the TRH-R1 complex found about 140 kDa does not correspond to the glycosylated TRH-R1 dimer because the stability of this complex would not be influenced by solubilisation at increased temperature.

In order to verify the interaction between the TRH-R and $G_{q/11}$ protein in control cells, co-immunoprecipitation and experiments with decreased expression of $G_{q/11}\alpha$ or $G\beta$ proteins were performed. Successful detection of $G_{q/11}\alpha$ after immunoprecipitation with TRH-R antibody along with concomitant identification of the $G\beta$ subunit after immunoprecipitation with TRH-R or $G_{q/11}\alpha$ antibodies confirmed the presumed interaction among TRH-R, $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$ proteins in control cells.

To determine, whether the decreased expression of $G_{q/11}\alpha$ levels could have influence on the formation of the complexes in the 140 kDa region, the cell line HEK293-E2, which exogenously express the long isoform of TRH-R1 and served as a maternal cell line for preparation of E2M11 cells, was used (Svoboda *et al.*, 1996). The immunoblot signal of $G_{q/11}\alpha$ in the complex detected in the 140 kDa region was significantly lower in HEK293-E2 than in HEK293-E2M11 cells and similar decrease was observed for TRH-R.

In order to reduce the expression level of $G\beta$ protein, HEK293-E2M11 cells were transfected with siRNA against $G\beta_1$ and $G\beta_2$ proteins. The levels of $G\beta_1$ and $G\beta_2$ proteins were several times lower compared to HEK293-E2M11 cells transfected with control siRNA but the expression of $G_{q/11}\alpha$ protein and TRH-R1 was not changed (Fig. 5A). However, the reduced expression of $G\beta_1$ and $G\beta_2$ proteins noticeably affected the formation of a presumed TRH-R1- $G_{q/11}$ protein complex because the immunoblot signals of $G_{q/11}\alpha$ protein and TRH-R1 after separation by CN/SDS-PAGE were much weaker, similarly as in the case of $G\beta$ protein (Fig. 5B).

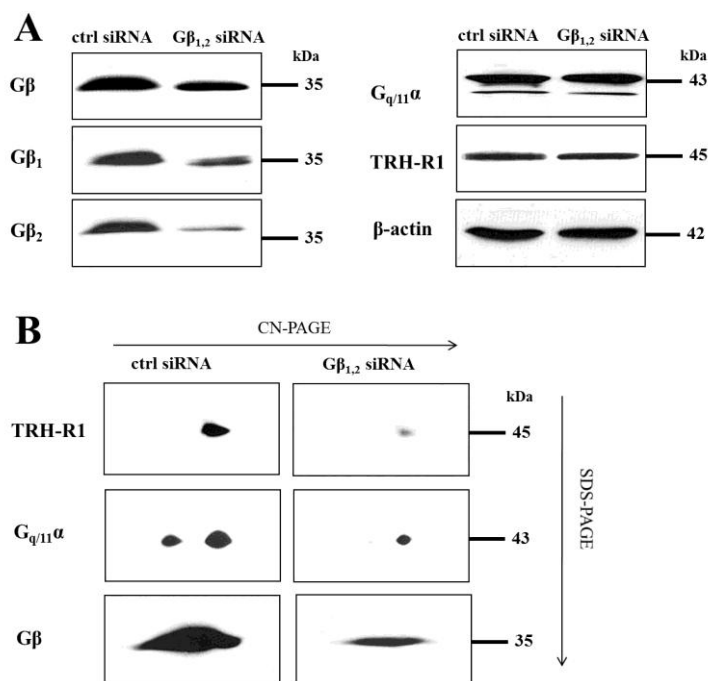


Fig. 5

Effect of reduced expression of $G\beta$ on the level of TRH-R1 and $G_{q/11}\alpha$ protein and the stability of the presumed TRH-R1- $G_{q/11}$ protein complex. HEK293-E2M11 cells were transfected with control siRNA

(ctrl siRNA; 160 pmol/sample) or siRNA against G β_1 or G β_2 proteins (80 pmol of each siRNA/sample) in 5 μ l LipofectamineTM RNAiMAX. The samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotting to evaluate the levels of TRH-R1, G $_{q/11}\alpha$ and G β proteins (A). β -Actin was used as a loading control. Next, the samples from control and RNAi-transfected cells were resolved by CN/SDS-PAGE and the stability of the presumed TRH-R1-G $_{q/11}$ protein complex was assessed by immunoblotting (B).

The results obtained by both approaches supported our presumption that detected immunoblot signals of subunits of G $_{q/11}$ protein and TRH receptor found in the 140 kDa region correspond to a TRH-R1-G $_{q/11}$ protein complex.

Interactions between GPCRs and trimeric G-proteins in HEK293 cells were previously studied by using FRET, BRET or co-immunoprecipitation. It was shown in many cases that at least a certain amount of a particular receptor was directly connected with its cognate G-protein (Audet *et al.*, 2008; Ayoub *et al.*, 2007; Gales *et al.*, 2006; Martin Shreeve, 2002; Nobles *et al.*, 2005; Philip *et al.*, 2007). However, the current evidence preferring the existence of pre-associated receptor and G-protein complexes is not fully conclusive. Hein and co-workers failed to see direct connection of the α_{2A} -adrenergic receptor and G $_{i1}\alpha$ protein in living cells (Hein *et al.*, 2005) while the interaction between these signalling molecules was observed in a study of Gales and co-workers (Gales *et al.*, 2006).

To determine the effect of TRH on the stability of the presumed TRH-R1-G $_{q/11}$ protein complex, the postnuclear supernatant was prepared from control and TRH-treated ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h) HEK293-E2M11 cells and the levels of TRH-R, G $_{q/11}\alpha$ and G β were determined by CN-PAGE (Fig. 6) or CN/SDS-PAGE and immunoblotting. By detection of this complex using TRH-R1 antibody, it was found out that short-term (10–30 min) TRH treatment resulted in gradual dissociation of the TRH-R1-G $_{q/11}$ protein complex with concomitant increase in the level of TRH-R dimer in the 80 kDa region. Prolonged (4–16 h) TRH treatment led to partial re-association of this complex (Fig. 6A), probably due to increased expression of TRH-R1 induced by prolonged TRH treatment.

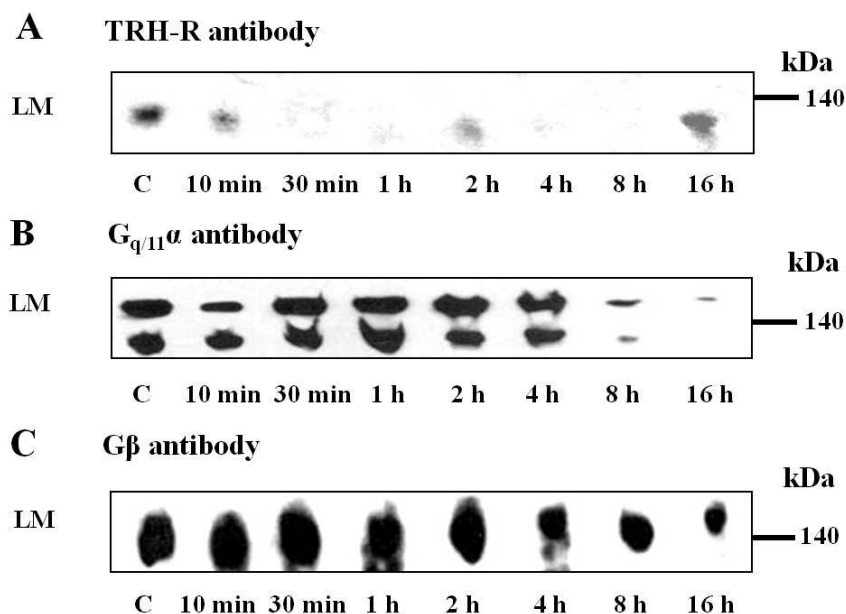


Fig. 6

Effect of TRH on the stability of the pre-associated TRH-R1-G_{q/11} protein complex. Protein complexes in the PNS from control and TRH-treated ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 cells were solubilised with 1% lauryl maltoside and separated by CN-PAGE. By immunoblotting, the signal of TRH-R1 (A), G_{q/11}α (B) and Gβ (C) proteins in the area of 140 kDa was detected.

Detection of heterotrimeric G_{q/11} protein in the area of 140 kDa revealed that the pattern of immunoblot signals of this complex in samples from control and TRH-treated cells differs from the pattern of TRH-R1 immunoblot signals because the significant dissociation of this complex occurred after prolonged TRH treatment (4–16 h) (Fig. 6B,C). This discrepancy can be explained by the existence of several pre-associated complexes of different G_{q/11} protein-coupled receptors with heterotrimeric G_{q/11} protein and down-regulation of G_{q/11}α after prolonged hormone treatment. The immunoblot signals of α_{1B}-adrenergic receptor, muscarinic M1 receptor and bradykinin B2 receptor were found in the 140 kDa region by CN-PAGE and immunoblotting suggesting that the G_{q/11} protein complex found in the 140 kDa region apparently represents the pre-associated complexes of G_{q/11} protein-coupled receptor with heterotrimeric G_{q/11} proteins.

The possible over-expression artefacts were excluded by comparison of TRH-R and G₁₁α levels in HEK293-E2M11 cell line and rat brain cortex. The expression level of TRH-R1 was roughly the same in both samples while the level of G_{q/11}α protein was slightly higher in sample of HEK293-E2M11 cells compared to brain cortex. The solubilisation artefacts were excluded as well because the patterns of immunoblot signals of G_{i1,2}α and α_{2A}-adrenergic receptor, which are structurally and functionally similar to G_{q/11} protein and G_{q/11} protein-coupled receptors, were distinct from those found for G_{q/11} protein and G_{q/11} protein-coupled receptors.

Translocation of G_{q/11}α protein from membrane-bound complexes into cytosolic complexes

When a sample of the postnuclear supernatant from control (naïve) HEK293 cells was solubilised with Brij 56 and protein complexes detected by CN-PAGE and immunoblotting, a molecular protein complex involving G_{q/11} protein was found in the 300 kDa region. This complex was not detectable by solubilisation with other detergents and was observed in the PM-enriched fraction but not in the cytosol.

Samples of the postnuclear supernatant as well as PM-enriched fraction (Fig. 7) from control and TRH-treated (1.10⁻⁵ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h) cells were used to study the effect of TRH on the stability of the high-molecular-weight complex found in the region of 300 kDa. Protein complexes after sample solubilisation were separated by CN-PAGE (Fig. 7) or by CN/SDS-PAGE. Detection of this G_{q/11} protein complex by immunoblotting with G_{q/11}α or Gβ antibodies revealed that prolonged TRH treatment (4–16 h) resulted in dissociation of this complex. A similar pattern of dissociation was also observed in case of the G_{q/11} protein complex found in the 140 kDa region. Since no immunoblot signals of some selected GPCRs (TRH receptor, α_{1B}-adrenergic receptor, muscarinic M1 receptor or bradykinin B2 receptor) were observed in the area corresponding in the size to the above detected G_{q/11} protein complex, it can be supposed that this complex does not contain receptors.

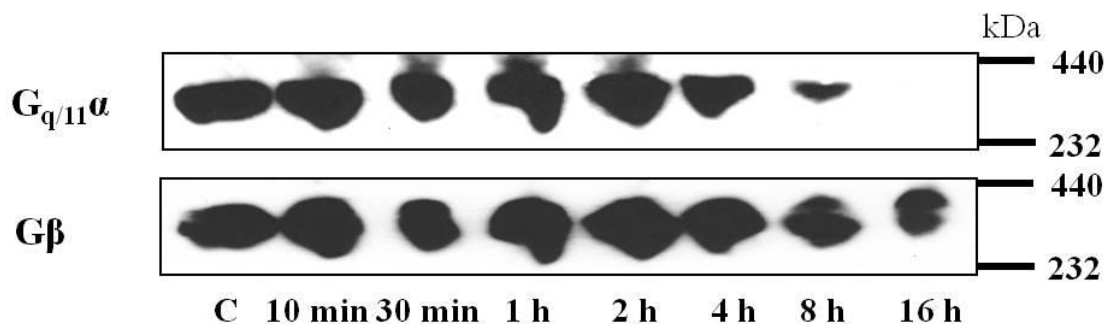


Fig.7

Effect of TRH on dissociation of G_{q/11} protein complex detected around 300 kDa in the PM-enriched fraction. Protein complexes in the PM-enriched fraction from control and TRH-treated (1.10⁻⁵ M; 10 min - 16 h) HEK293-E2M11 cells were solubilised with 1% Brij 56, resolved by CN-PAGE and detected by immunoblotting with G_{q/11}α antibodies.

Another G_{q/11}α protein complex was detected mainly in samples of cells after prolonged TRH treatment. Samples of the postnuclear supernatant from control and TRH-treated (1.10⁻⁵ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h) HEK293-E2M11 cells were solubilised with different detergents dissolved in sample buffer and resolved by CN-PAGE or by CN/SDS-PAGE. After immunoblotting with G_{q/11}α antibody, two distinct low-molecular-weight G_{q/11}α protein complexes were identified in

the region of 70 kDa and their levels were rising dependently on time of TRH treatment. When the same type of experiment was conducted with samples of cytosol or PM-enriched fraction from control and TRH-treated HEK293 cells, these $G_{q/11}\alpha$ protein complexes were shown to be in the cytosol (Fig. 8) but not in the PM-enriched fraction.

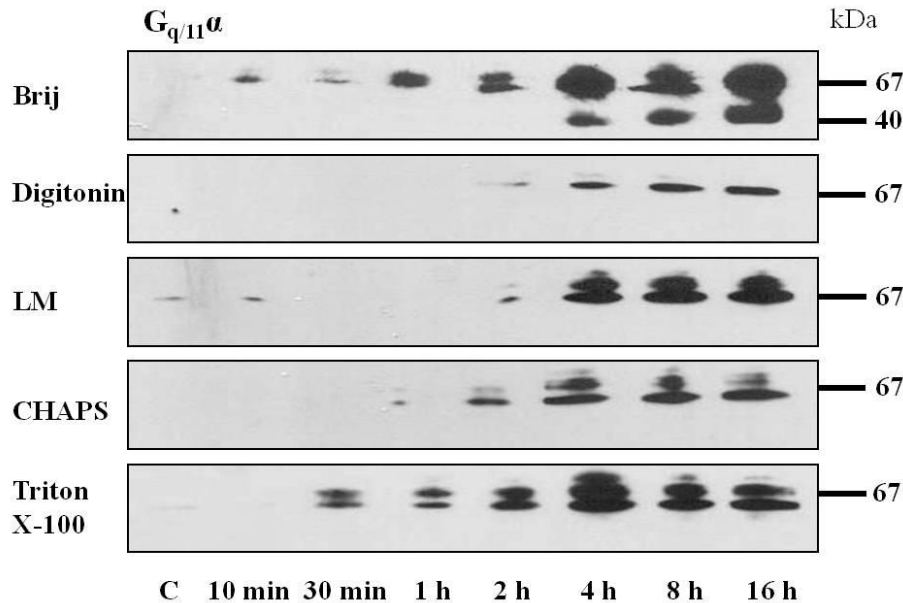


Fig. 8

Effect of TRH on the formation of the $G_{q/11}\alpha$ protein complex detected around 70 kDa in cytosol. Protein complexes in the cytosolic fraction from control and TRH-treated ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 cells were solubilised with 1% Brij 56, 1% digitonin, 1% LM, 1% CHAPS and 1% Triton X-100, resolved by CN-PAGE and detected by immunoblotting with $G_{q/11}\alpha$ antibodies.

Although short-term (30 min – 2 h) TRH treatment induced formation of these complexes, significant rise in their levels was observed only after prolonged (4–16 h) TRH treatment. It seems that both these complexes are comprised of $G_{11}\alpha$ as well as $G_q\alpha$ and a slight difference in their size is not substantiated by the presence of only one type of $G_{q/11}\alpha$ protein in a particular complex.

It might be speculated that these complexes could be trimeric $G_{q/11}\alpha$ proteins varying in $G\beta\gamma$ heterodimers. In order to determine whether these complexes could include β subunit of trimeric G-proteins, specific primary antibody against $G\beta$ protein was used for immunodetection. Although this experiment was repeatedly conducted after solubilisation with different detergents by CN-PAGE as well as CN/SDS-PAGE, no immunoblot signal of $G\beta$ was observed in the region of 70 kDa.

The decomposition of both membrane-bound $G_{q/11}$ complexes found in the 140 kDa and 300 kDa regions and the formation of cytosolic $G_{q/11}\alpha$ complex found in the 70 kDa region after the prolonged TRH treatment can be explained by down-regulation of $G_{q/11}\alpha$ and its translocation from the membrane into the cytosol.

Translocation of G α proteins (mainly G $_s\alpha$ and G $_{q/11}\alpha$) from the plasma membrane into cytosol has been reported in many previous studies in which cell fractionation, immunofluorescence microscopy and cell live imaging were applied to investigate this process (Allen *et al.*, 2005; Hynes *et al.*, 2004; Thiyagarajan *et al.*, 2002; Wedegaertner *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2002; Ransnas *et al.*, 1989; Miserey-Lenkei *et al.*, 2001; Kosloff *et al.*, 2003; Cronin *et al.*, 2004; Drmota *et al.*, 1998). This process was observed in HEK293, MCF7, C6 and S49 cell lines (Allen *et al.*, 2005; Hynes *et al.*, 2004; Thiyagarajan *et al.*, 2002; Wedegaertner *et al.*, 1996) whereas no redistribution of G $_s\alpha$ was found in COS-7 monkey kidney cells or MA104 cells derived from rhesus monkey kidney (Huang *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1997). It was shown that translocation of G α protein is a rapid process, occurring within 1–20 min after addition of agonist (Marrari *et al.*, 2007). Subcellular redistribution of G $_s\alpha$ was observed to be connected with activation-dependent depalmitoylation of G α subunit (Wedegaertner and Bourne, 1994). Nevertheless, the rate of translocation of G $_{q/11}\alpha$ proteins appears to be dependent on the type of activated receptor. Subcellular redistribution of these proteins was investigated after activation of rhodopsin in *Drosophila* eyes or after activation of angiotensin 2 receptor (AT2 receptor) and TRH-R1 in HEK293 cells (Marrari *et al.*, 2007). While the soluble form of G $_q\alpha$ was detected in studies with rhodopsin and AT2 receptor within 5–20 min after stimulation with agonist (Cronin *et al.*, 2004; Kosloff *et al.*, 2003; Miserey-Lenkei *et al.*, 2001), G $_{q/11}\alpha$ translocation to the cytosol in HEK293 cells (clone E2M11) was not observed earlier than 2 h after TRH treatment (Drmota *et al.*, 1998). Hence, our findings concerning translocation of G $_{q/11}\alpha$ from membrane-bound complexes into cytosolic complexes after prolonged hormone treatment conform well to previous observations.

Because the TRH concentration (1.10^{-5} M) used in these experiments is very high and it can hardly be considered physiological, it was necessary to check whether the lower hormone concentrations would lead to the same dissociation/association patterns of the observed protein complexes. The postnuclear supernatants of control and TRH-treated (16 h; 10^{-5} – 10^{-9} M) HEK293-E2M11 cells were solubilised by LM or Brij 56, the solubilised protein complexes were separated by CN-PAGE and G $_{q/11}\alpha$ proteins detected using specific antibody. More pronounced alterations in dissociation of membrane-bound complexes and association of cytosolic complexes were observed primarily in samples of cells which were treated with TRH in a concentration range of 10^{-5} – 10^{-7} M. The lower concentrations of TRH (10^{-8} – 10^{-9} M), which are more physiological, induced similar changes but to a lesser extent. Therefore, the observed dissociation and association of protein complexes can be regarded as a general process induced by a wide range of TRH concentrations, which can also occur under physiological conditions. Nevertheless, the level of G $_{q/11}$ complex in the 300 kDa region was not markedly affected by treatment with lower concentrations of TRH compared to control sample and thus the formation of cytosolic complexes in the 70 kDa region is more likely to be connected with dissociation of the complex found in the 140 kDa region.

A protein complex in the 300 kDa region was shown not to contain TRH receptor and it seems that this complex is not directly engaged in TRH-R signalling. The reason why the stability of this complex is affected by TRH treatment can be the assumption that the amounts of individual components involved in particular complex determine subsequently the amount of this complex. Therefore, the decreased amount of $G_{q/11}\alpha$ in the plasma membrane due to down-regulation and translocation of $G_{q/11}\alpha$ during the prolonged TRH treatment lowers the amount of individual membrane-bound complexes involving $G_{q/11}\alpha$.

High-molecular-weight complexes of $G_{q/11}\alpha$ and TRH-R

When digitonin was used as a detergent during the solubilisation step and TRH-R protein complexes were detected by CN-PAGE and immunoblotting, TRH-R complex in the 500 kDa region was found in a sample of the postnuclear supernatant from HEK293 cells. Our experiments analysing the effect of TRH on the stability of the TRH-R1- $G_{q/11}$ complex revealed that the level of the TRH-R1 complex in the 500 kDa region increased after short-term (10–30 min) TRH treatment suggesting that the activated receptor can be relocated from the TRH-R1- $G_{q/11}$ complex into this complex (Fig. 9). Similar results were observed after solubilisation with CHAPS or Triton X-100. This relocation could enable interaction of the receptor with different signalling molecules and allows trigger signalling pathways conveying the signal into the cell interior.

By solubilisation with digitonin, CN-PAGE and immunoblotting with antibodies against $G_{q/11}\alpha$, the $G_{q/11}\alpha$ complex in the 700 kDa region was detected and the level of this complex was found to increase after short-term (10–30 min) TRH treatment similarly as in case of TRH-R1 complex in the 500 kDa region (Fig. 9). The similar results were observed after solubilisation with lauryl maltoside or Brij 56.

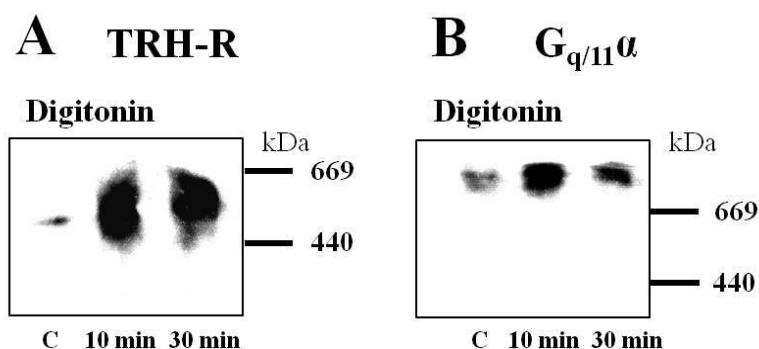


Fig. 9

Effect of TRH on the stability of high-molecular-weight complexes of TRH-R or $G_{q/11}\alpha$. Samples of the PNS from control and TRH-treated (1.10^{-5} M; 10 min and 30 min) HEK293-E2M11 cell line were solubilised with 1% digitonin. The solubilised protein complexes were resolved by CN-PAGE and immunoblotted with specific antibodies against TRH-R1 (A) or $G_{q/11}\alpha$ (B).

These results suggest that the activated $G_{q/11}\alpha$ protein might be relocated from the TRH-R1– $G_{q/11}$ complex after TRH stimulation. Therefore, it was of interest to assess which $G_{q/11}\alpha$ complexes could involve $G_{q/11}\alpha$ protein in an activated state. In order to solve this issue, [^{35}S]GTP γ S binding assay followed by CN-PAGE and autoradiography was performed. Samples of the postnuclear supernatant from control HEK293-E2M11 cells were incubated with or without 10 μM TRH and 10 nM [^{35}S]GTP γ S, solubilised with 1% lauryl maltoside and resolved by CN-PAGE.

The basal activity of $G_{q/11}\alpha$ protein was detected in the 40 kDa and 700 kDa regions apparently corresponding to free $G_{q/11}\alpha$ subunit and the $G_{q/11}\alpha$ complex in the 700 kDa region, respectively. Incubation of the postnuclear supernatant with 10 μM TRH in the reaction mixture for [^{35}S]GTP γ S assay resulted in increase of signals in the 40 kDa, 140 kDa and 700 kDa regions indicating the increased $G_{q/11}\alpha$ activity. It can be concluded that the activated $G_{q/11}\alpha$ subunit is involved in a $G_{q/11}\alpha$ complex found in the 700 kDa region in its basal state as well as after its activation by TRH receptor.

In order to find the potential interacting partners which could be components of the identified TRH receptor and $G_{q/11}\alpha$ protein complexes, we selected several proteins taking part in the TRH-R signalling pathway. These selected proteins included scaffolding proteins clathrin, NHERF1, caveolin-1 and flotillin-2 and proteins engaged in signal transduction PLC β , GRK2, RGS2-5 and β -arrestin. Most of the selected proteins (clathrin, NHERF1, caveolin-1, flotillin-2, RGS2-5 and β -arrestin) were not detected in the gel regions in which the putative TRH-R or $G_{q/11}\alpha$ complexes were identified. Only PLC β and GRK2 were detected in the area of 500 kDa and 700 kDa suggesting that these proteins could be components of the TRH-R and $G_{q/11}\alpha$ complexes in these regions.

6. Conclusions

This work is preoccupied with identification of protein alterations in the membrane fraction of HEK293-E2M11 cells after prolonged TRH treatment and separation and characterization of molecular protein complexes of TRH-R1 and/or $G_{q/11}$ protein.

Our results can be summarised to the following conclusions:

1) The isolated membrane fraction enriched in plasma membranes contained markedly higher amounts of Na,K-ATPase, TRH receptor and G-proteins than the postnuclear supernatant.

2) By using 2D electrophoresis and mass spectrometry, the levels of 42 proteins were identified to be altered in samples of PM-enriched fractions from TRH-treated (16 h; 10 μM) cells. Five proteins (mitofilin, MTHSP75, prohibitin, stomatin like-2, peroxiredoxin III) whose levels were increased after the prolonged TRH treatment represent proteins localized in mitochondria. All of them are important for proper structure and function of mitochondria.

3) The molecular complex detected in the 140 kDa region by CN-PAGE represents a pre-associated TRH-R-G_{q/11} complex, which was verified by co-immunoprecipitation and experiments on cells with decreased levels of the G α and G β subunits of G_{q/11} proteins. Short-term (10–30 min) TRH treatment led to dissociation of this complex while the prolonged (4–16 h) treatment resulted in its partial re-association.

4) Cytosolic G_{q/11} α complexes found in the 70 kDa region were observed to be formed after prolonged TRH treatment which was connected with dissociation of membrane-bound G_{q/11} complexes in the 140 kDa and 300 kDa regions and translocation of G_{q/11} α from the plasma membrane into the cytosol.

5) High-molecular-weight complexes of TRH-R or G_{q/11} α were observed in the 500 kDa or 700 kDa regions, respectively. The levels of both these complexes were found to increase after short-term TRH treatment suggesting that TRH-R and G_{q/11} α can be translocated from the pre-associated TRH-R-G_{q/11} complex. GRK2 and PLC β were assessed as potential components of these high-molecular-weight complexes.

7. References

- Allen, J.A., Yu, J.Z., Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2005) *Mol Pharmacol.* 67:1493-1504.
- Audet, N., Gales, C., Archer-Lahlou, E., Vallieres, M., Schiller, P.W., Bouvier, M. and Pineyro, G. (2008) *J Biol Chem.* 283:15078-15088.
- Ayoub, M.A., Maurel, D., Binet, V., Fink, M., Prezeau, L., Ansanay, H. and Pin, J.P. (2007) *Mol Pharmacol.* 71:1329-1340.
- Cant, S.H. and Pitcher, J.A. (2005) *Mol Biol Cell.* 16:3088-3099.
- Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W. and Rhee, S.G. (2004) *J Biol Chem.* 279:41975-41984.
- Cronin, M.A., Diao, F. and Tsunoda, S. (2004) *J Cell Sci.* 117:4797-4806.
- DeBlasi, A., O'Reilly, K. and Motulsky, H.J. (1989) *Trends Pharmacol Sci.* 10:227-229.
- Drmotá, T., Novotný, J., Kim, G.D., Eidne, K.A., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998) *J Biol Chem.* 273:21699-21707.
- Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H. and Bouvier, M. (2006) *Nat Struct Mol Biol.* 13:778-786.
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J. and Bunemann, M. (2005) *EMBO J.* 24:4106-4114.
- Helenius, A. and Simons, K. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:529-532.
- Huang, C., Duncan, J.A., Gilman, A.G. and Mumby, S.M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:412-417.
- Hynes, T.R., Mervine, S.M., Yost, E.A., Sabo, J.L. and Berlot, C.H. (2004) *J Biol Chem.* 279:44101-44112.
- Jantas, D., Jaworska-Feil, L., Lipkowski, A.W. and Lason, W. (2009) *Neuropeptides.* 43:371-385.
- Jaworska-Feil, L., Jantas, D., Leskiewicz, M., Budziszewska, B., Kubera, M., Basta-Kaim, A., Lipkowski, A.W. and Lason, W. (2010) *Neuropeptides.* 44:495-508.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J. and Zha, J. (2005) *Mol Biol Cell.* 16:1543-1554.
- Jones, T.L., Degtyarev, M.Y. and Backlund, P.S., Jr. (1997) *Biochemistry.* 36:7185-7191.

- Kosloff, M., Elia, N., Joel-Almagor, T., Timberg, R., Zars, T.D., Hyde, D.R., Minke, B. and Selinger, Z. (2003) *EMBO J.* 22:459-468.
- Luo, L. and Yano, N. (2005) *Endocr Res.* 31:185-198.
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R. and Wedegaertner, P.B. (2007) *Biochemistry.* 46:7665-7677.
- Martin Shreeve, S. (2002) *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1300-1307.
- Matousek, P., Novotny, J., Rudajev, V. and Svoboda, P. (2005) *Cell Biochem Biophys.* 42:21-40.
- Matousek, P., Novotny, J. and Svoboda, P. (2004) *Physiol Res.* 53:295-303.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) *Mol Cell.* 11:577-590.
- Miserey-Lenkei, S., Lenkei, Z., Parnot, C., Corvol, P. and Clauser, E. (2001) *Mol Endocrinol.* 15:294-307.
- Montero, J., Mari, M., Colell, A., Morales, A., Basanez, G., Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J.C. (2010) *1797:1217-1224.*
- Mulla, C.M., Geras-Raaka, E., Raaka, B.M. and Gershengorn, M.C. (2009) *Pancreas.* 38:197-202.
- Nobles, M., Benians, A. and Tinker, A. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18706-18711.
- Osman, C., Merkwirth, C. and Langer, T. (2009) *J Cell Sci.* 122:3823-3830.
- Philip, F., Sengupta, P. and Scarlata, S. (2007) *J Biol Chem.* 282:19203-19216.
- Ransnas, L.A., Svoboda, P., Jasper, J.R. and Insel, P.A. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7900-7903
- Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D. and Cotecchia, S. (2006) *J Biol Chem.* 281:4354-4363.
- Thiyagarajan, M.M., Bigras, E., Van Tol, H.H., Hebert, T.E., Evanko, D.S. and Wedegaertner, P.B. (2002) *Biochemistry.* 41:9470-9484.
- Wedegaertner, P.B. and Bourne, H.R. (1994) *Cell.* 77:1063-1070.
- Wedegaertner, P.B., Bourne, H.R. and von Zastrow, M. (1996) *Mol Biol Cell.* 7:1225-1233.
- Wittig, I., Karas, M. and Schagger, H. (2007) *Mol Cell Proteomics.* 6:1215-1225.
- Wolf, G., Aumann, N., Michalska, M., Bast, A., Sonnemann, J., Beck, J.F., Lendeckel, U., Newsholme, P. and Walther, R. (2010) *J Endocrinol.* 207:163-175.
- Yano, N. and Luo, L. (2004) *JOP.* 5:193-204.
- Yu, R., Ashworth, R. and Hinkle, P.M. (1998) *Thyroid.* 8:887-894.
- Zhu, C.C., Cook, L.B. and Hinkle, P.M. (2002) *J Biol Chem.* 277:28228-28237.

8. List of Author's Publications

1. *Publications related to the thesis*

Drastichova, Z., Bourova, L., Hejnova, L., Jedelsky, P., Svoboda, P. and Novotny, J. (2010) Protein alterations induced by long-term agonist treatment of HEK293 cells expressing thyrotropin-releasing hormone receptor and G₁₁α protein. *J. Cell Biochem.* 109(1):255-64

IF=3.122

Drastichova, Z. and Novotny, J. (2012) Identification of preassembled TRH receptor-G_{q/11} protein complex in HEK293 cells. *Cell Struct. Funct.* 37(1):1-12

IF=3.265

Drastichova, Z. and Novotny, J. (2012) Identification and subcellular localization of molecular complexes of G_{q/11}α protein in HEK293 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (submitted)

IF=1.547

2. *Other publications*

Drastichova, Z., Bourova, L., Lisy, V., Hejnova, L., Rudajev, V., Stohr, J., Durchankova, D., Ostasov, P., Teisinger, J., Soukup, T., Novotny, J. and Svoboda, P. (2008) Subcellular redistribution of trimeric G-proteins—potential mechanism of desensitization of hormone response: internalization, solubilisation, down-regulation. *Physiol. Res.* 57 Suppl 3:S1-10

IF=1.646

Drastichova, Z., Skrabalova, J., Neckar, J., Kolar, F. and Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *J. Biomed. Sci.* 18:89-96

IF=1.962

Karlova Univerzita v Praze
Přírodovědecká fakulta



Autoreferát disertační práce

**Buněčná signalizace a molekulární komplexy
TRH receptoru**

Mgr. Zdeňka Drastichová

Praha 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Autor: Mgr. Zdeňka Drastichová

Školitel: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště: Katedra fyziologie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Viničná 7
128 43 Praha 2

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1. Souhrn	4
2. Úvod	5
3. Cíle	6
4. Metody	7
5. Výsledky a diskuze	7
6. Závěr	20
7. Reference	21
8. Seznam publikací autorky	23

Zkratky

2DE	Dvojrozměrná elektroforéza
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
CN-PAGE	Bezbarvá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza
E2	Buněčná linie HEK293 exprimující exogenní TRH receptor
E2M11	Buněčná linie HEK293 exprimující exogenní TRH receptor a G ₁₁ α
GDP	Guanosin difosfát
GPCR	Receptor spřažený s G-proteiny
GRK	Receptorová kinasa
GRP75	Glukosou regulovaný protein 75
GTP	Guanosin trifosfát
GTPγS	Nehydrolyzovatelný analog GTP
HEK293	Lidské embryonální ledvinové buňky 293
LDH	Laktát dehydrogenasa
LM	Lauryl maltosid
MS	Hmotnostní spektrometrie
MTHSP75	Mitochondriální heat shock protein 75
NHERF	Regulační faktor pro výměnu Na ⁺ /H ⁺
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PLC	Fosfolipáza C
PM	Plasmatická membrána
PNS	Postnukleární supernatant
RGS	Regulátor signalizace G-proteinů
SDS	Dodecylsulfát sodný
siRNA	Malá interferující ribonukleová kyselina
TNF	Faktor nádorové nekrózy
TRH	Thyroliberin
TRH-R	TRH receptor

1. 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.

2. Úvod

TRH receptor patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) které představují transmembránové proteiny přenášející signály z extracelulárního prostředí do buňky. TRH receptor je aktivován navázáním tripeptidu thyroliberinu (TRH) tvořeném v hypothalamu. Tento hormon vykazuje neuroprotektivní účinky a působí jak v nervové soustavě, tak v různých orgánech jako slinivka, srdce nebo brzlík.

Po aktivaci $G_{q/11}$ proteinu zprostředkované jeho interakcí s aktivovaným TRH receptorem je signál přenesen na fosfolipázu C β , která katalyzuje přeměnu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP $_2$) na dva druhé posly diacylglycerol (DAG) a 1,4,5-inositoltrifosfát (IP $_3$). Vzrůst vnitrobuněčných koncentrací těchto signálních molekul aktivuje různé signální dráhy, které dále určují buněčné procesy.

Receptory spřažené s G-proteiny jsou schopné tvořit dimery a oligomery. TRH receptor tvoří pouze homodimery složené výhradně z TRH receptoru. Dimerizace receptorů určuje způsob signalizace receptor a kompartmenty, kam bude receptor dopravován. Obecný model interakce receptoru s G-proteinem v poměru 1:1 tak může být pro některé receptory nahrazen modelem se stechiometrií 2:1.

Přenos signálu je uskutečňován specifickými interakcemi mezi signálními proteiny, což určuje, které signální dráhy budou aktivovány. Obecně přijímaný model přenosu signálu přes receptory spřažené s G-proteiny navrhuje, že receptory interagují s příslušnými G-proteiny až po

aktivaci receptoru. Avšak studie publikované nedávno podporují model, ve kterém tvoří receptory a G-proteiny preasociované komplexy. Asociace takových komplexů je určována typem receptoru nebo podjednotek G-proteinu a množstvím těchto proteinů v buňce.

Dlouhodobá nebo opakovaná stimulace buňky určitým hormonem vede ke snížení biologické odpovědi, tzv. desensitizaci, která chrání buňky před poškozením. Desensitizace na úrovni receptorů je uskutečněna odpážením, redistribucí a degradací receptorů. Podobné mechanismy byly pozorovány i na úrovni G-proteinů. Desensitizace po dlouhodobé aktivaci TRH receptoru je zprostředkována fosforylací receptorů pomocí receptorové kinasy GRK. Po navázání β -arrestinu k fosforylovanému receptoru dochází k navázání adaptorového proteinu AP-2 a klathrinu a k tvorbě klathrinových váčků. TRH receptor může být následně defosforylován a recyklován na plasmatickou membránu nebo degradován v lysozomech.

3. Cíle

Cílem této práce bylo studium přenosu signálu pomocí TRH receptoru a $G_{q/11}$ proteinu v buněčné linii HEK293, která exogenně exprimuje potkaní dlouhou isoformu TRH receptoru a myší $G_{11\alpha}$ protein (buněčná linie HEK293-E2M11). První část disertační práce je zaměřena na výzkum účinku dlouhodobého působení TRH na expresi membránově vázaných proteinů pomocí 2D elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. Druhá část této práce se zabývá identifikací signálních molekulárních komplexů TRH receptoru a $G_{q/11}$ proteinu v buněčné linii HEK293-E2M11 pomocí nativní elektroforézy.

Specifické cíle:

- 1) izolovat frakci obohacenou o plasmatické membrány z buněčné linie HEK293-E2M11
- 2) detekovat změny v expresi proteinů ve frakci obohacené o plasmatické membrány vyvolané dlouhodobým působením thyroliberinem (10 μ M, 16 h) pomocí 2D elektroforézy
- 3) identifikovat změněné proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie
- 4) identifikovat komplexy TRH receptoru a/nebo $G_{q/11\alpha}$ proteinu
- 5) sledovat vliv TRH na stabilitu identifikovaných molekulárních komplexů

4. Metody

Buněčná kultura

Buněčná linie HEK293-E2M11 stabilně exprimující potkaní dlouhou isoformu TRH receptoru a myší $G_{11\alpha}$ protein a buněčná linie HEK293-E2 stabilně exprimující dlouhou isoformu TRH receptoru.

Isolace frakce obohacené o plasmatické membrány a cytosolu

Vazebné studie s [3 H]TRH

Vazebné studie s [³⁵S]GTPγS

SDS-PAGE a imunoblot

2D elektroforéza

Barvení polyakrylamidových gelů

Hmotnostní spektrometrie

Bezbarvá nativní elektroforéza

Dvourozměrná nativní elektroforéza s SDS-PAGE ve druhém rozměru

Autoradiografie

RNA interference

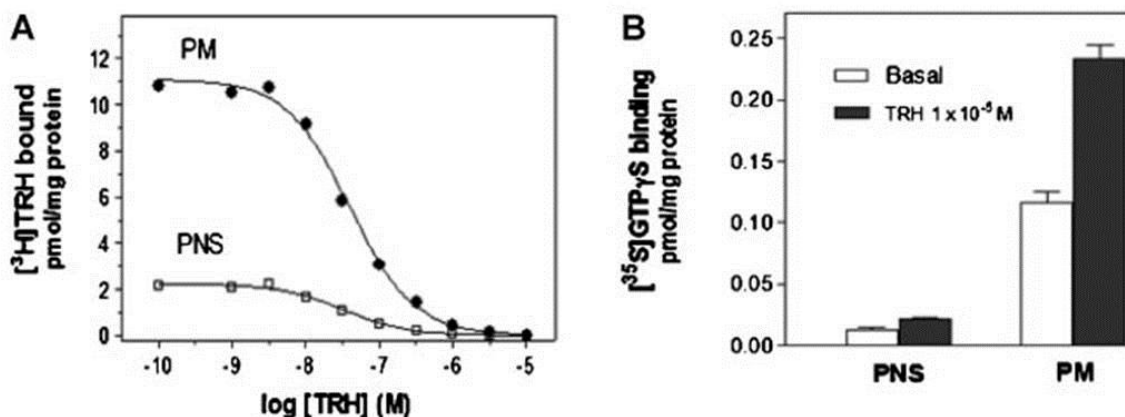
Imunoprecipitace

5. Výsledky a diskuse

Isolace frakce obohacené o plasmatické membrány a cytosolu

Pro výzkum změn v expresi a distribuci proteinů po dlouhodobém působení TRH byla využita frakcionace postnukleárního supernatantu (PNS) získaného z nestimulovaných HEK293-E2M11 buněk na Percollovém hustotním gradientu, díky níž byla izolována cytosolární frakce a dvě membránové frakce. Pomocí SDS-PAGE a imunoblotu bylo zjištěno, že v porovnání s dolní membránovou frakcí obsahovala horní membránová frakce vysoké množství Na₂K-ATPasy (protein typický pro plasmatické membrány). Tato frakce tedy reprezentuje frakci obohacenou o plasmatické membrány (PM). Cytosolární frakce neobsahovala Na₂K-ATPasu, ale byla obohacena o laktát dehydrogenasu B (protein typický pro cytosol). Frakce obohacená o PM a cytosolární frakce nebyly vzájemně kontaminovány.

Pomocí kompetiční vazebné studie se značeným [³H]TRH a neznačeným TRH bylo změřeno množství TRH receptoru ve frakci obohacené o plasmatické membrány a postnukleárním supernatantu. Afinita vazby [³H]TRH k vazebným místům pro TRH byla podobná v obou frakcích ($K_D = 21.4 \pm 4.5$ nM v PNS, $K_D = 28.9 \pm 6.2$ nM ve frakci obohacené o plasmatické membrány), avšak počet vazebných míst pro TRH byl výrazně vyšší ve frakci obohacené o plasmatické membrány ($B_{max} = 2.2 \pm 0.8$ pmol/mg proteinu v PNS, $B_{max} = 11.3 \pm 1.5$ pmol/mg proteinu ve frakci obohacené o PM) (Obr. 1A). Funkční aktivita G-proteinů v PNS a frakci obohacené o PM byla měřena pomocí vazebné studie s [³⁵S]GTPγS. Basální a TRH stimulovaný navázání [³⁵S]GTPγS bylo přibližně desetkrát vyšší ve vzorku frakce obohacené o PM v porovnání se vzorkem postnukleárního supernatantu (Obr. 1B).



Obr. 1

Vazebné studie s [³H]TRH a [³⁵S]GTPγS. Distribuce TRH byla porovnána ve vzorcích postnukleárního supernatantu a frakce obohacené o PM pomocí vazebné kompetiční studie se značeným thyroliberinem [³H]TRH a neznačeným TRH. Tyto experimenty byly provedeny v triplicátu a vypočítány podle DeBlasiho *a kol.* (DeBlasi *a kol.*, 1989) (A). Funkční aktivita Gα proteinu byla stanovena pomocí jednobodového stanovení v přítomnosti 5 nM [³⁵S]GTPγS a 2 mM GDP ve vzorku PNS a frakce obohacené o PM získaných z kontrolních HEK293-E2M11 buněk. Prázdné sloupce představují basální aktivitu Gα proteinu a plné sloupce TRH stimulovanou aktivitu (B).

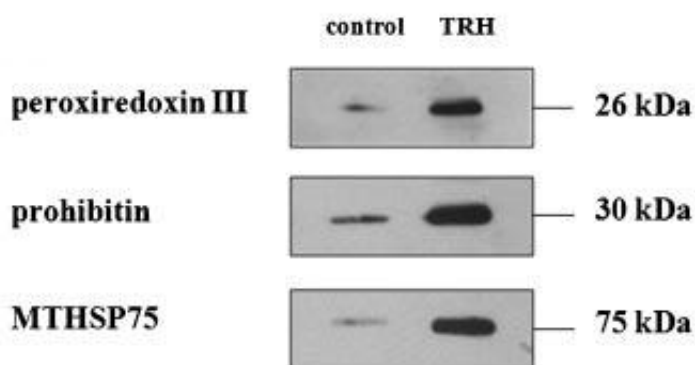
Proteomická studie účinků TRH

Abychom určili down-regulaci a solubilizaci G_{q11}α proteinu po působení TRH, hladiny tohoto proteinu byly určeny ve vzorcích PNS, frakce obohacené o PM a cytosolu získaných z kontrolních a TRH ovlivněných (1.10⁻⁵ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h) HEK293-E2M11 buněk pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Dlouhodobé (4–16 h) působení thyroliberinu vedlo k down-regulaci G_{q11}α proteinu, protože jeho množství v postnukleárním supernatantu se postupně snižovalo. Nicméně toto hormonální působení způsobilo i translokaci G_{q11}α proteinu z membrán do cytosolu. Po dlouhodobém působení TRH se signál G_{q11}α snižoval ve frakci obohacené o PM, avšak zvyšoval se v cytosolu. Podobná pozorování byla popsána již dříve pomocí imunofluorescenční mikroskopie a dvojrozměrné elektroforézy (Drmotá *a kol.*, 1998; Matousek *a kol.*, 2004; Matousek *a kol.*, 2005).

Proteiny ve frakci obohacené o PM získané z kontrolních a TRH ovlivněných (1.10⁻⁵ M, 16 h) HEK293-E2M11 buněk byly rozděleny pomocí dvojrozměrné elektroforézy a obarvené skvrny byly analyzovány pomocí programu PDQuest. Ve vzorku buněk ovlivněných thyroliberinem bylo nalezeno 18 proteinů, jejichž hladina byla snížena v porovnání se vzorkem kontrolních buněk, a 39 proteinů, jejichž hladina byla zvýšena. Čtyři proteiny byly nalezeny pouze ve vzorku kontrolních buněk. Z těchto 61 detekovaných změn bylo pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno 42 proteinů.

Jeden z proteinů, jehož hladina byla zvýšena po působení thyroliberinem, byl ezrin, který je členem tzv. ezrin-radixin-meosinové (ERM) rodiny. Tento protein zajišťuje propojení kortikálního aktinu s plasmatickou membránou pomocí N-koncové FERM (four-point-one) domény (Cant a Pitcher, 2005). Bylo zjištěno, že ezrin může přímo interagovat s α_{1B} -adrenergním receptorem přes polyargininový motif v C-koncové části receptoru a tato interakce přispívá k recyklaci receptoru zpět na plasmatickou membránu (Stanasila *a kol.*, 2006). Lze tedy předpokládat, že zvýšená hladina ezrinu po dlouhodobém působení thyroliberinem by mohla mít souvislost s recyklací TRH receptoru na plasmatickou membránu a reorganizací aktinu.

Některé proteiny identifikované pomocí 2DE/MS analýzy představují proteiny, které se podílí na tvorbě mitochondriálních krist a jsou nezbytné pro správnou funkci mitochondrií. Tyto proteiny zahrnují prohibitin, peroxiredoxin III, MTHSP75 (GRP75, mortalin), mitofilin a stomatin like-2 protein. Jejich hladiny po působení TRH byly zvýšeny, což bylo potvrzeno pomocí SDS-PAGE a imunoblotu pro prohibitin, peroxiredoxin III a MTHSP75 (Obr. 2).



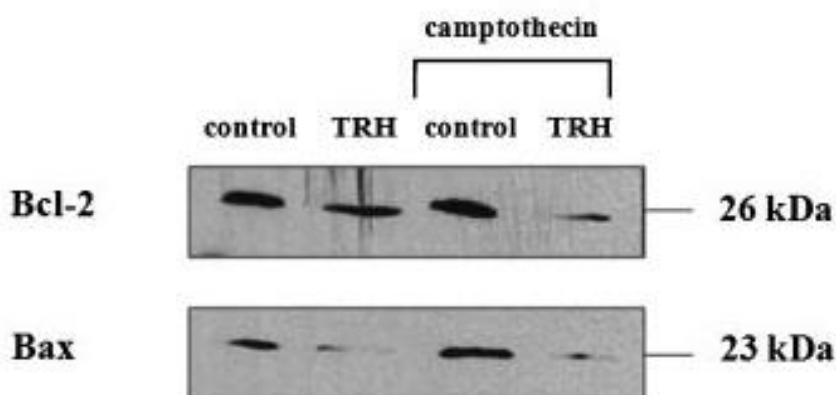
Obr. 2

Vliv dlouhodobého působení TRH na hladiny peroxiredoxinu III, prohibitinu a MTHSP75. Zvýšení hladin některých proteinů identifikovaných pomocí 2D elektroforézy a hmotnostní spektrometrie bylo potvrzeno pomocí SDS-PAGE a imunoblotu se specifickými protilátkami ve vzorcích kontrolních a TRH ovlivněných (1.10^{-5} M, 16 h).

Prohibitin tvoří rozsáhlé komplexy ve vnitřní mitochondriální membráně a snížení jeho hladiny vede k dysfunkci mitochondrií, zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku, abnormální morfologii krist a zvýšené citlivosti ke stimulům vyvolávajícím apoptosu (Osman *a kol.*, 2009). Komplexy prohibitinu slouží jako tzv. proteinové lešení (scaffold) a mohou se tak účastnit kontroly mitochondriální struktury a integrity (Montero *a kol.*, 2010). Stomatin like-2 protein interaguje s prohibitinem a stabilizuje jej (Osman *a kol.*, 2009). Peroxiredoxin III působí v mitochondriích jako antioxidant, který zajišťuje rozpad H_2O_2 a brání tak peroxidaci kardiolipinu (Wolf *a kol.*, 2010). Deplece peroxiredoxinu III v HeLa buňkách vedlo ke vzrůstu intracelulární hladiny H_2O_2 , uvolnění cytochromu c, aktivaci kaspas a zvýšení citlivosti buněk k apoptotickým stimulům, jako jsou

staurosporin nebo TNF- α (Chang *a kol.*, 2004; John *a kol.*, 2005). Mitofilin je zřejmě nezbytný pro tvorbu tubulární krist a jejich proplétání, protože deplece mitofilinu způsobila významné změny v organizaci vnitřní membrány a abnormality ve struktuře a funkci mitochondrií (John *a kol.*, 2005). MTHSP75 (GRP75, mortalin) je mitochondriální chaperon, který interaguje s proteinem p53, různými metabolickými enzymy a proteiny zapojenými v diferenciaci a přežití buněk (Mihara *a kol.*, 2003). Na základě těchto pozorování lze usuzovat, že zvýšení hladin těchto pěti mitochondriálních proteinů po působení thyroliberinem může přispívat k podpoře mitochondriálních funkcí a integrity mitochondrií.

Možný protektivní a anti-apoptotický účinek thyroliberinu byl stanoven pomocí analýzy poměru množství anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a pro-apoptotického proteinu Bax (Bcl-2/Bax poměr). Pro tento účel byl použit kamptothecin, což je látka, která způsobuje poškození DNA a následně apoptosu. HEK293-E2M11 buňky byly ovlivněny buď TRH (1.10^{-5} M, 16 h) nebo kamptothecinem (1.10^{-6} M, 4 h) nebo TRH (1.10^{-5} M, 12 h) a následně kamptothecinem (1.10^{-6} M, 4 h). Vzorky postnukleárního supernatantu z kontrolních a TRH a/nebo kamptothecinem ovlivněných buněk byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a proteiny Bcl-2 a Bax byly detekovány imunoblotem (Obr. 3). Poměr Bcl-2/Bax byl stanoven jako poměr intenzit signálů Bcl-2 a Bax detekovaných na imunoblotu v určitém vzorku. Bcl-2/Bax poměr ve vzorku kontrolních buněk byl určen jako 1, ve vzorku buněk ovlivněných TRH jako 3,9, ve vzorku buněk ovlivněných kamptothecinem jako 0,6 a ve vzorku buněk ovlivněných TRH a kamptothecinem jako 1,6.



Obr. 3

Vliv dlouhodobého působení TRH na hladiny Bcl-2 a Bax proteinů. Hladiny Bcl-2 a Bax proteinů byly sledovány v kontrolních a TRH ovlivněných (1.10^{-5} M, 16 h), kamptothecinem ovlivněných (1.10^{-6} M, 4 h) a TRH (1.10^{-5} M, 16 h) a kamptothecinem (1.10^{-6} M, 4 h) ovlivněných HEK293-E2M11 buňkách pomocí SDS-PAGE a imunoblotu.

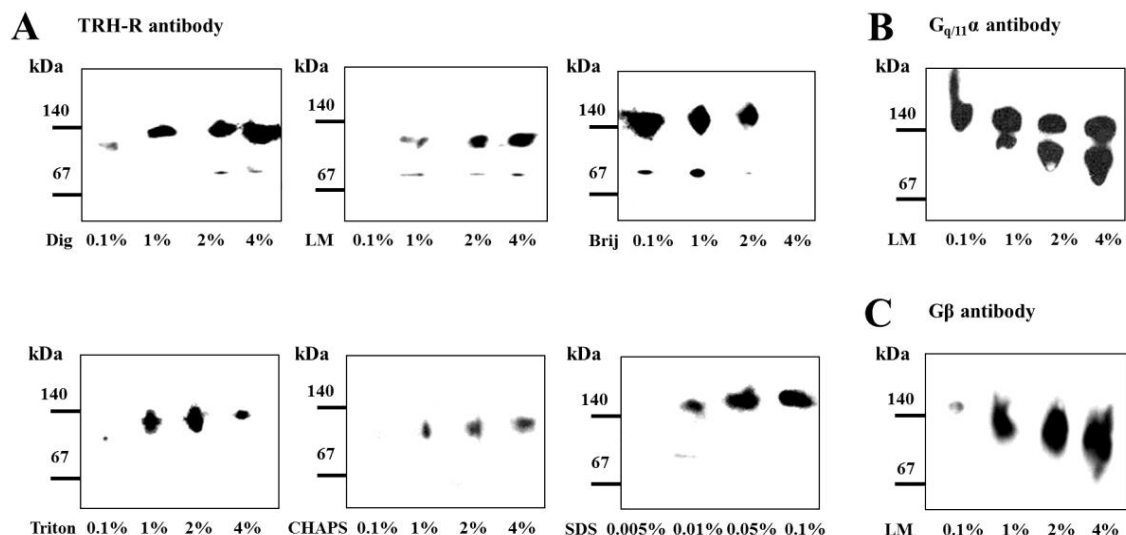
Bylo zjištěno, že TRH může indukovat apoptosu anebo mít neuroprotektivní účinky, což bylo zkoumáno především v β buňkách slinivky a nervových buňkách. Inkubace s 200 nM TRH po dobu 1 hodiny vedla k down-regulaci pro-apoptotických genů kódujících Bax protein, BAD a Fas antigen

(Luo a Yano, 2005). Jiná studie sledující účinek TRH na buňky potkaní slinivky odhalila, že působení TRH stimulovalo pro-apoptotický gen p53 stejně jako anti-apoptotický BclX, což by mohlo naznačovat, že v určitých typech pankreatických buněk mohou probíhat biologické procesy mající duální povahu (Yano a Luo, 2004). Nicméně, inkubace lidských prekursorových buněk odvozených od buněk z lidských Langerhansových ostrůvků s 1 μM TRH po dobu 24 hodin měla za následek snížení počtu životaschopných buněk a uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Mula *a kol.*, 2009). Působení 1 μM TRH po dobu 24 hodin avšak mělo opačný účinek na primární kulturu nervových buněk. Pokud byly tyto buňky pre-inkubovány s 1 μM TRH, došlo ke snížení úmrtnosti buněk vyvolané glutamátem, H_2O_2 a staurosporinem (Jantas *a kol.*, 2009). Další studie zkoumající neuroprotekcii vyvolanou thyroliberinem v lidské buněčné linii SH-SY5Y odvozené od neuroblastomů a diferenciované kyselinou retinovou odhalila, že množství Bcl-2 bylo zvýšeno po působení jak 1 μM , tak 10 μM TRH po dobu 24 hodin (Jaworska-Feil *a kol.*, 2010).

Závěrem lze říci, že účinky thyroliberinu se mohou lišit v závislosti na jeho koncentraci a na typu sledovaných buněk. Výsledky našich experimentů ukázaly, že dlouhodobé působení 10 μM TRH na buňky HEK293 může spustit cytoprotektivní procesy. Kromě toho naše výsledky naznačují, že thyroliberin by mohl mít podpůrné účinky na strukturu mitochondriální membrány, tvorbu krist i mitochondriální funkci.

Identifikace a charakterizace molekulárního komplexu TRH receptoru a $G_{q/11}$ proteinu

Pro identifikaci a charakterizaci molekulárních komplexů TRH receptoru a/nebo $G_{q/11}\alpha$ proteinu byla využita nativní elektroforéza (CN-PAGE). Vzorky postnukleárního supernatantu z kontrolních buněk HEK293-E2M11 byly solubilizovány po dobu 30 min při 0°C s detergenty digitoninem, lauryl maltosidem (LM), Brijem 56, Tritonem X-100, CHAPS nebo dodecylsulfátem sodným (SDS), kdy byly použity různé koncentrace detergentů. Solubilizované proteinové komplexy byly rozděleny pomocí CN-PAGE. Pomocí imunoblotu a specifických protilátek proti TRH receptoru byly detekovány dva proteinové komplexy obsahující TRH receptor v oblastech 140 kDa a 80 kDa (Obr. 4A). Komplexy $G_{q/11}\alpha$ proteinu a $G\beta$ proteinu byly detekovány pouze po solubilizaci s LM v oblasti 140 kDa (Obr. 4B,C). Zvýšená koncentrace LM při solubilizaci způsobila, že v oblasti 140 kDa byly detekovány dokonce dva oddělené $G_{q/11}\alpha$ komplexy. Detekce $G_{q/11}\alpha$, $G\beta$ a TRH-R ve stejné oblasti 140 kDa naznačuje, že tyto proteiny by mohly tvořit preformovaný proteinový komplex TRH receptoru s trimerním $G_{q/11}$ proteinem v kontrolních buňkách HEK293-E2M11.



Obr. 4

Detekce proteinových komplexů TRH receptoru a G_{q11} proteinu. Vzorky postnukleárního supernatantu získaného z HEK293-E2M11 buněk byly solubilizovány s detergenty digitoninem (Dig), lauryl maltosidem (LM), Brijem 56, Tritonem X-100, CHAPS a SDS o různých koncentracích. Solubilizované proteinové komplexy byly rozděleny pomocí CN-PAGE. Pomocí imunoblotu se specifickými protilátkami byly detekovány dva komplexy TRH receptoru v oblastech 140 kDa a 80 kDa (A), komplex G_{q11}α proteinu (B) a komplex Gβ proteinu (C) v oblasti 140 kDa.

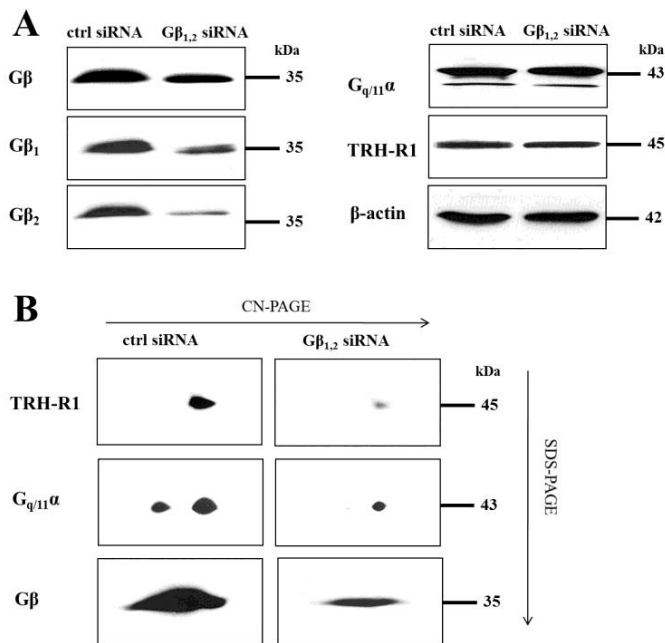
Intenzita signálu proteinových komplexů byla výrazně ovlivněna vlastnostmi a koncentrací aplikovaného detergentu, což může souviset s různou účinností jednotlivých detergentů. Detergenty mohou tedy ovlivňovat mobilitu komplexů v gelu. Podobné závěry byly popsány již v dříve publikovaných studiích (Helenius a Simons, 1977; Wittig *a kol.*, 2007), ve kterých aplikace detergentů a Coomassie G-250, které jsou využívány v nativní elektroforéze, vyvolala změnu v mobilitě amfifilních molekul. Jako optimální koncentrace detergentu byly pro další naše experimenty vybrány 1% koncentrace pro LM, Brij 56, Triton X-100, CHAPS a digitonin a 0,05% koncentrace pro SDS.

Bylo zjištěno, že TRH-R patří mezi receptory, které jsou schopny tvořit dimery, a že tyto TRH-R dimery jsou glykosylovány na svém N-konci (Zhu *a kol.*, 2002). Dimery glykosylovaných TRH receptorů mají velikost 150 kDa a jsou stabilní při vyšších teplotách (např. 37°C). Mohlo by se zdát, že detekovaný komplex TRH-R v oblasti 140 kDa by mohl být glykosylovaný dimer TRH-R. Nicméně když byla solubilizace komplexů provedena při 37°C po dobu 30 minut, signály TRH-R i G_{q11}α proteinu v oblasti 140 kDa zmizely a naopak TRH-R byl detekován v oblasti 80 kDa a G_{q11}α v oblasti 45 kDa. Můžeme tedy vyloučit, že TRH-R komplex detekovaný v oblasti 140 kDa odpovídá glykosylovanému dimeru TRH-R, protože stabilita tohoto komplexu by nebyla ovlivněna solubilizací při vyšší teplotě.

Abychom prokázali, že TRH receptor tvoří s trimerním $G_{q/11}$ proteinem preformovaný komplex v kontrolních HEK293-E2M11 buňkách, využili jsme ko-immunoprecipitace a experimentů se sníženou expresí $G_{q/11}\alpha$ nebo $G\beta$ proteinů. Pomocí imunoprecipitace s protilátkami proti TRH receptoru byly detekovány v imunoprecipitátu $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$ proteiny a po imunoprecipitaci s protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$ proteinu byl detekován v imunoprecipitátu $G\beta$ protein.

Buněčná linie HEK293-E2, která exogenně exprimuje TRH receptor byla použita pro experimenty sledující vliv snížené exprese $G_{q/11}\alpha$ proteinu na tvorbu možného preformovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu. Od této linie byla dále odvozena linie HEK293-E2M11, která navíc exprimuje exogenní $G_{11}\alpha$ protein (Svoboda *a kol.*, 1996). Signál $G_{q/11}\alpha$ proteinu představující možný preformovaný TRH-R- $G_{q/11}$ komplex byl výrazně nižší v linii HEK293-E2 v porovnání s linií HEK293-E2M11. Stejný výsledek byl detekován také v případě TRH receptoru.

Snížení exprese $G\beta$ proteinu v HEK293-E2M11 buňkách bylo docíleno pomocí transfekce siRNA proti $G\beta_1$ a $G\beta_2$ proteinům. Hladiny obou proteinů byly několikrát nižší v takto transfekovaných HEK293-E2M11 v porovnání se vzorkem HEK293-E2M11 transfekovaných kontrolní siRNA. Exprese $G_{q/11}\alpha$ proteinu a TRH receptoru nebyla změněna. Snížená exprese $G\beta_1$ a $G\beta_2$ však výrazně ovlivnila tvorbu sledovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu, protože signály $G_{q/11}\alpha$ proteinu a TRH receptoru po separaci komplexů pomocí CN/SDS-PAGE byly slabší, stejně jako v případě $G\beta$ proteinu (Obr. 5).



Obr. 5

Vliv snížené exprese $G\beta$ na hladinu TRH-R a $G_{q/11}\alpha$ proteinu a na stabilitu sledovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu. HEK293-E2M11 buňky byly transfekovány kontrolní siRNA (ctrl siRNA; 160 pmol/vzorek) nebo siRNA cílenou proti $G\beta_1$ a $G\beta_2$ proteinu (80 pmol každé siRNA/vzorek) v 5 μ l

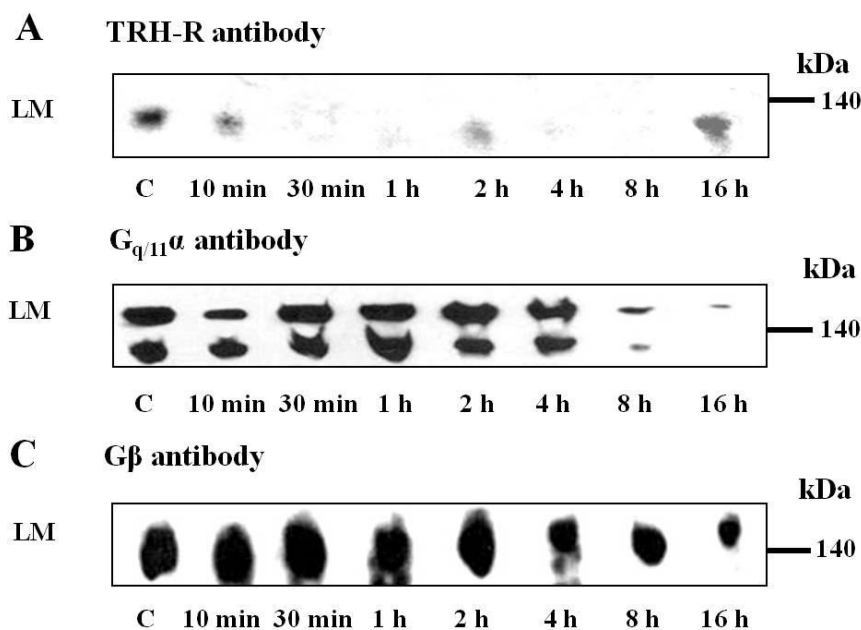
Lipofectaminu™ RNAiMAX. Vzorky postnukleárního supernatantu z těchto buněk byly nejprve rozděleny pomocí SDS-PAGE a hladiny TRH-R, $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$ proteinů byly stanoveny pomocí imunoblotu (A). β -Aktin byl použit jako kontrola nanášky. Dále byly vzorky z kontrolních a siRNA transfekovaných buněk rozděleny CN/SDS-PAGE a stabilita předpokládaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu byla stanovena imunoblotem (B).

Výsledky získané pomocí ko-imunoprecipitace a experimentů využívajících snížené množství podjednotek $G_{q/11}$ proteinu podpořily náš předpoklad, že detekované signály TRH receptoru a $G_{q/11}$ proteinu v oblasti 140 kDa představují preformovaný TRH-R- $G_{q/11}$ komplex.

Interakce mezi receptory spřaženými s G-proteiny a trimerními G-proteiny byly v HEK293 buňkách sledovány pomocí fluorescenční mikroskopie (FRET, BRET) a ko-imunoprecipitace. V mnohých případech bylo detekováno alespoň malé množství preformovaných komplexů receptorů s G-proteiny (Audet *a kol.*, 2008; Ayoub *a kol.*, 2007; Gales *a kol.*, 2006; Martin Shreeve, 2002; Nobles *a kol.*, 2005; Philip *a kol.*, 2007). Nicméně jasný důkaz, že receptory tvoří s G-proteiny preformované komplexy preferenčně, zatím nebyl doložen. Hein *a kol.* nedetekovali interakci mezi α_{2A} -adrenergním receptorem a $G_{i1}\alpha$ (Hein *a kol.*, 2005), zatímco Gales *a kol.* pozorovali, že tyto dva proteiny spolu za kontrolních podmínek interagují (Gales *a kol.*, 2006).

Pro sledování vlivu TRH na stabilitu TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu byly HEK293-E2M11 buňky ovlivněny TRH ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h a 16 h). Hladiny $G_{q/11}\alpha$, $G\beta$ a TRH-R v postnukleárním supernatantu kontrolních a TRH ovlivněných buněk byly sledovány pomocí CN-PAGE nebo CN/SDS-PAGE a imunoblotu. Pomocí protilátek proti TRH-R bylo zjištěno, že krátkodobé (10-30 min) působení TRH vedlo k postupné disociaci TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu a zároveň vzrůstu hladiny TRH-R dimeru v oblasti 80 kDa, zatímco dlouhodobé (4-16 h) působení TRH způsobilo částečnou asociaci tohoto komplexu (Obr. 6), což mohlo být způsobeno up-regulací TRH receptoru po dlouhodobém působení TRH.

Signál $G_{q/11}$ proteinu detekovaný pomocí protilátek proti $G_{q/11}\alpha$ a $G\beta$ se lišil od signálu TRH-R, neboť hladina $G_{q/11}$ komplexu v oblasti 140 kDa nebyla po krátkodobém působení TRH ovlivněna a k disociaci tohoto komplexu docházelo až po dlouhodobém působení TRH (Obr. 6). Tato nesrovnalost může být vysvětlena tím, že $G_{q/11}$ proteiny mohou tvořit preformované komplexy s různými receptory spřaženými s $G_{q/11}$ proteiny a také down-regulací $G_{q/11}\alpha$ proteinu po dlouhodobém působení TRH. Po rozdělení proteinových komplexů pomocí CN-PAGE byly detekovány v oblasti 140 kDa signály α_{1B} -adrenergního, muskarinního M1 a bradykinin B2 receptoru. Tyto výsledky naznačují, že $G_{q/11}$ komplex v oblasti 140 kDa zřejmě reprezentuje preformované komplexy $G_{q/11}$ proteinů s receptory spřaženými s $G_{q/11}$ proteiny.



Obr. 6

Vliv TRH na stabilitu preformovaného TRH-R-G_{q/11} komplexu. Proteinové komplexy v postnukleárním supernatantu získaného z kontrolních a TRH ovlivněných ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 buněk byly solubilizovány s 1% lauryl maltosidem a separovány pomocí CN-PAGE. Pomocí imunoblotu byly detekovány signály TRH-R (A), G_{q/11}α (B) a Gβ (C) proteinů v oblasti 140 kDa.

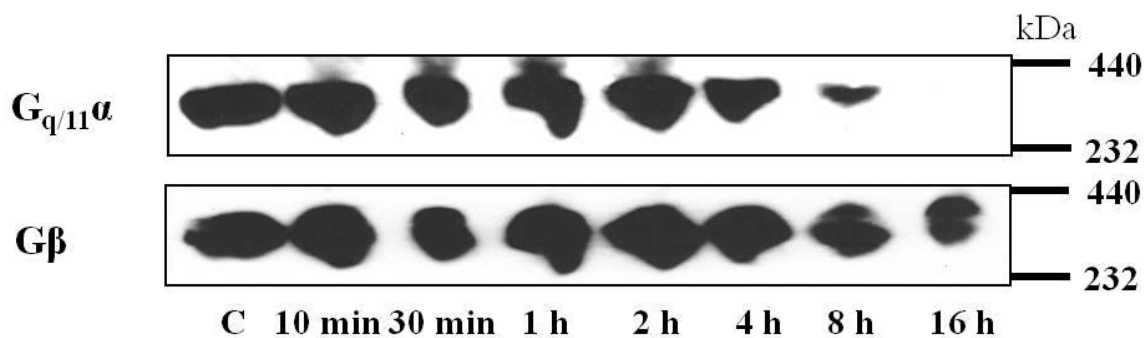
Tvorba komplexů může být výrazně ovlivněna množstvím jednotlivých komponent tvořící určitý komponent. Abychom vyloučili možnost, že detekovaný TRH-R-G_{q/11} komplex je pouze artefaktem, který by vznikl kvůli vysoké expresi TRH-R a G₁₁α proteinu, byly hladiny těchto proteinů porovnány ve vzorku HEK293-E2M11 buněk a vzorku mozkové kůry potkana. Protože hladina TRH-R byla přibližně stejná v obou vzorcích a hladina G₁₁α proteinu byla mírně vyšší ve vzorku HEK293-E2M11 buněk než ve vzorku mozkové kůry, tyto artefakty mohly být vyloučeny.

Solubilizační artefakty představují další typ artefaktů, které mohou vznikat při přípravě vzorku pro nativní elektroforézu. Vznik těchto artefaktů však byl taktéž vyloučen, neboť oblasti detekce signálů G_{11,2}α a α_{2A}-adrenergního receptoru stejně jako intenzita těchto signálů se lišila od signálů G_{q/11}α a receptorů spřažených s G_{q/11} proteiny. Protože G_{11,2}α a G_{q/11}α proteiny jsou si strukturně a funkčně velmi podobné a toto tvrzení platí i pro detekované receptory, lze předpokládat, že oblasti detekce signálů Gα proteinů anebo receptorů stejně jako intenzity jednotlivých detekovaných komplexů by byly pro Gα proteiny i receptory stejné.

Translokace $G_{q/11}\alpha$ z membránově vázaných komplexů do cytosolárních komplexů

V případě, že byl vzorek postnukleárního supernatantu kontrolních HEK293-E2M11 buněk solubilizován s Brijem 56 a proteinové komplexy detekovány pomocí CN-PAGE a imunoblotu, byl detekován molekulární komplex obsahující $G_{q/11}$ protein v oblasti 300 kDa. Tento komplex nebyl detekován po solubilizaci s žádným jiným detergentem a byl detekován ve frakci obohacené o plasmatické membrány, avšak nikoliv v cytosolu.

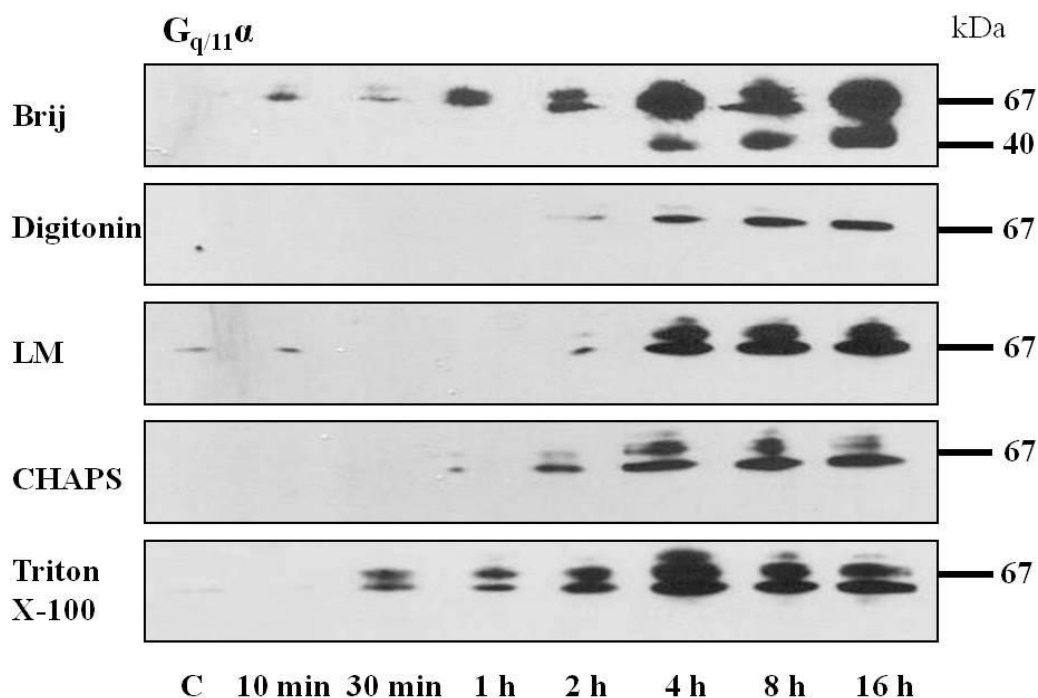
Vzorky PNS nebo frakce obohacené o PM (Obr. 7) získané z kontrolních a TRH ovlivněných (1.10^{-5} M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 buněk byly použity pro studium vlivu TRH na stabilitu $G_{q/11}$ komplexu v oblasti 300 kDa. Proteinové komplexy byly po solubilizaci rozděleny pomocí CN-PAGE (Obr. 7) nebo CN/SDS-PAGE. $G_{q/11}$ komplex detekovaný pomocí protilátek proti $G_{q/11}\alpha$ nebo $G\beta$ disocioval po dlouhodobém (4–16 h) působení TRH. Podobný účinek TRH byl pozorován i pro $G_{q/11}$ komplex v oblasti 140 kDa. Nicméně, $G_{q/11}$ komplex v oblasti 300 kDa zřejmě neobsahuje receptory spřažené s $G_{q/11}$ proteiny, neboť žádný z receptorů (TRH receptor, α_{1B} -adrenergní receptor, muskarinový M1 receptor nebo bradykininový B2 receptor), které jsme se snažili detekovat pomocí nativní elektroforézy, nebyly v této oblasti detekovány.



Obr. 7

Vliv TRH na disociaci $G_{q/11}$ komplexu detekovaného v oblasti 300 kDa ve frakci obohacené o PM. Proteinové komplexy z frakce obohacené o PM získané z kontrolních a TRH ovlivněných (1.10^{-5} M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 buněk byly solubilizovány s 1% Brijem 56, rozděleny pomocí CN-PAGE a detekovány imunoblotem s protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$.

Dalšími z detekovaných komplexů jsou dva $G_{q/11}\alpha$ komplexy v oblasti 70 kDa, které byly detekovány především ve vzorcích postnukleárního supernatantu získaných z HEK293-E2M11 buněk ovlivněných TRH (1.10^{-5} M; 10 min – 16 h) pomocí CN-PAGE i CN/SDS-PAGE a imunoblotu s protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$. Množství těchto $G_{q/11}\alpha$ komplexů vzrůstalo se zvyšující se dobou působení TRH. Tyto komplexy byly detekovány v cytosolu (Obr. 8), ale nikoliv ve frakci obohacené o PM.



Obr. 8

Vliv TRH na tvorbu $G_{q/11}\alpha$ komplexů v oblasti 70 kDa v cytosolu. Proteinové komplexy v cytosolu získaného z kontrolních a TRH ovlivněných ($1 \cdot 10^{-5}$ M; 10 min – 16 h) HEK293-E2M11 buněk byly solubilisovány s 1% Brijem 56, 1% digitoninem, 1% LM, 1% CHAPS a 1% Tritonem X-100, rozděleny pomocí CN-PAGE a detekovány imunoblotem s protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$.

Ačkoliv krátkodobé (30 min – 2 h) působení TRH již vyvolalo tvorbu $G_{q/11}\alpha$ komplexů v oblasti 70 kDa, výrazně zvýšené množství těchto komplexů bylo pozorováno až po dlouhodobém (4–16 h) působení TRH. Tyto komplexy obsahují patrně jak $G_{11}\alpha$, tak $G_q\alpha$ a rozdíl v jejich velikosti tedy není dán přítomností pouze jednoho typu $G_{q/11}\alpha$ proteinu v určitém komplexu.

Lze spekulovat, že tyto komplexy by mohly být trimerními $G_{q/11}$ proteiny lišící se typem $G\beta\gamma$ heterodimerem. Abychom potvrdili či vyvrátili tuto domněnku, použili jsme protilátky proti $G\beta$ proteinu pro jeho imunodetekci v oblasti 70 kDa. Ačkoliv byl tento experiment proveden opakovaně po solubilisaci s různými detergenty a pomocí CN-PAGE i CN/SDS-PAGE, $G\beta$ protein nebyl v oblasti 70 kDa detekován. Lze tedy usoudit, že $G_{q/11}\alpha$ komplexy v oblasti 70 kDa nejsou trimerními G-proteiny.

Rozpad obou membránově vázaných $G_{q/11}$ komplexů detekovaných v oblastech 140 kDa a 300 kDa a tvorba cytosolárního $G_{q/11}\alpha$ komplexu detekovaného v oblasti 70 kDa po dlouhodobém působení TRH může být vysvětleno down-regulací $G_{q/11}\alpha$ proteinu a jeho translokací z membrány do cytosolu.

Translokace G_α proteinu, především $G_s\alpha$ a $G_{q/11}\alpha$, z plasmatické membrány do cytosolu byla pozorována již dříve pomocí frakcionace buněk, imunofluorescenční mikroskopie a zobrazování živých buněk (Allen *a kol.*, 2005; Hynes *a kol.*, 2004; Thiagarajan *a kol.*, 2002; Wedegaertner *a kol.*, 1996; Yu *a kol.*, 2002; Ransnas *a kol.*, 1989; Miserey-Lenkei *a kol.*, 2001; Kosloff *a kol.*, 2003; Cronin *a kol.*, 2004; Drmota *a kol.*, 1998). Tento proces byl detekován v buněčných liniích HEK293, MCF7, C6 a S49 (Allen *a kol.*, 2005; Hynes *a kol.*, 2004; Thiagarajan *a kol.*, 2002; Wedegaertner *a kol.*, 1996), zatímco v buněčných liniích COS-7 a MA104 redistribuce $G_s\alpha$ pozorována nebyla (Huang *a kol.*, 1999; Jones *a kol.*, 1997). V mnoha případech je translokace G_α proteinu rychlý proces, který se uskuteční během 1-20 minut po přidání agonisty (Marrari *a kol.*, 2007). Subcelulární redistribuce $G_s\alpha$ proteinu pravděpodobně také souvisí s depalmitoylací G_α proteinu po jeho aktivaci (Wedegaertner a Bourne, 1994). Rychlost translokace $G_{q/11}\alpha$ proteinu se zdá být určována tím, který receptor byl aktivován. Subcelulární redistribuce $G_{q/11}\alpha$ byla sledována v oku *Drosophily* po aktivaci rodopsinu a v HEK293 buňkách po aktivaci angiotensinového receptoru 2 (AT2 receptor) nebo TRH receptoru (Marrari *a kol.*, 2007). Zatímco solubilní forma $G_q\alpha$ proteinu byla detekována již po 5-20 minutách po stimulaci rodopsinu nebo AT2 receptoru příslušným agonistou (Cronin *a kol.*, 2004; Kosloff *a kol.*, 2003; Miserey-Lenkei *a kol.*, 2001), translokace $G_{q/11}\alpha$ do cytosolu v HEK293 buňkách (klon E2M11) nebyla pozorována dříve než po 2 hodinách působení TRH (Drmota *a kol.*, 1998). Naše pozorování, kdy byla detekována translokace $G_{q/11}\alpha$ proteinu z membránových do cytosolárních komplexů po dlouhodobém působení TRH, potvrzuje předchozí výsledky.

Protože 10 μM koncentrace TRH, která byla aplikována při našich experimentech, je vysoká a nefyziologická, byly provedeny také experimenty, ve kterých byly HEK293-E2M11 buňky inkubovány s různými koncentracemi TRH (10^{-5} – 10^{-9} M) po dobu 16 hodin. Vzorok postnukleárního supernatantu z kontrolních a TRH ovlivněných buněk byly solubilizovány s LM nebo Brijem 56, solubilizované proteinové komplexy byly separovány pomocí CN-PAGE a komplexy $G_{q/11}\alpha$ proteinu byly detekovány pomocí imunoblotu se specifickými protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$. Disociace membránově vázaných $G_{q/11}$ komplexů v oblastech 140 kDa a 300 kDa a asociace cytosolárních $G_{q/11}\alpha$ komplexů byly zřetelné při koncentracích TRH v rozsahu 10^{-5} – 10^{-7} M. Naopak, nižší koncentrace TRH (10^{-8} – 10^{-9} M) způsobily podobné změny, ale v menším rozsahu. Z těchto výsledků lze usuzovat, že disociace a asociace sledovaných komplexů může být považována za obecný jev, který je vyvolán různými koncentracemi agonisty a může být pozorován i za fyziologických podmínek. Nicméně, hladina $G_{q/11}$ komplexu v oblasti 300 kDa nebyla výrazně ovlivněna při nižších koncentracích TRH a tak lze předpokládat, že asociace cytosolárních $G_{q/11}\alpha$ komplexů v oblasti 70 kDa souvisí spíše s disociací $G_{q/11}$ komplexu detekovaném v oblasti 140 kDa.

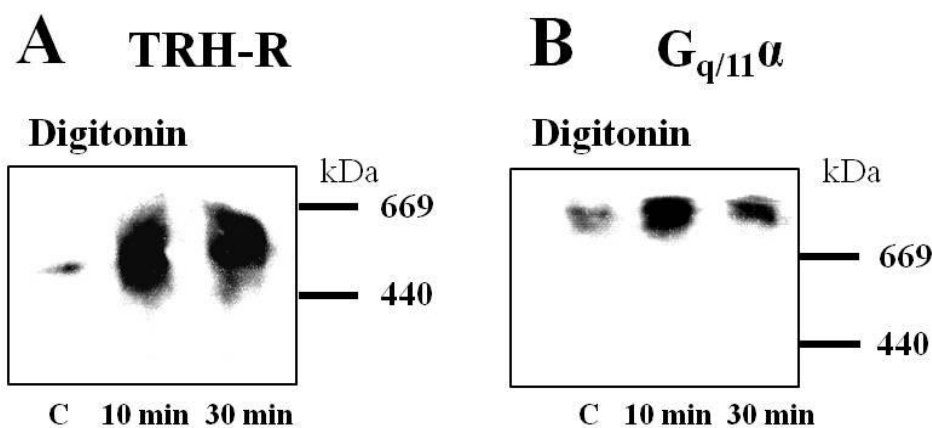
Protože molekulární komplex v oblasti 300 kDa zřejmě neobsahuje TRH receptor, zdá se, že tento komplex se přímo nezapojuje do signální dráhy TRH receptoru. Důvodem, proč je stabilita tohoto komplexu ovlivněna působením TRH, může být předpoklad, že množství jednotlivých

komponent určitého komplexu určuje také množství tohoto komplexu. Proto lze usuzovat, že snížené množství $G_{q/11}\alpha$ proteinu v plasmatické membráně kvůli down-regulaci a translokaci $G_{q/11}\alpha$ proteinu při dlouhodobém působení TRH vede ke snížení množství membránově vázaných komplexů obsahujících $G_{q/11}\alpha$ protein.

Vysokomolekulární komplexy $G_{q/11}\alpha$ proteinu a TRH receptoru

Při použití digitoninu jako detergentu během solubilizace PNS získaného z HEK293-E2M11 buněk byl pomocí nativní elektroforézy a imunoblotu s protilátkami proti TRH-R detekován komplex TRH receptoru v oblasti 500 kDa. Hladina tohoto TRH-R komplexu se zvyšovala po krátkodobém (10-30 min) působení TRH, což naznačuje, že aktivovaný TRH receptor by mohl být přesunut do tohoto komplexu z preformovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu (Obr. 9). Podobné výsledky byly pozorovány po solubilizaci vzorku s detergenty CHAPS nebo Triton X-100. Přesunutí TRH receptoru v rámci komplexů by mohlo umožňovat interakce receptoru s různými signálními molekulami a spouštět signální dráhy přenášející signál dovnitř buňky.

Pomocí solubilizace s digitoninem, CN-PAGE a imunoblotu s protilátkami proti $G_{q/11}\alpha$ proteinu byl detekován $G_{q/11}\alpha$ komplex v oblasti 700 kDa a jeho hladina byla zvýšena po krátkodobém (10-30 min) působení TRH, podobně jako v případě TRH-R komplexu detekovaném v oblasti 500 kDa. Podobné výsledky byly získány i po solubilizaci vzorku s LM nebo Brijem 56.



Obr. 9

Vliv TRH na stabilitu vysokomolekulárních komplexů TRH-R nebo $G_{q/11}\alpha$. Vzorky PNS z kontrolních a TRH ovlivněných (1.10^{-5} M, 10 min a 30 min) HEK293-E2M11 buněk byly solubilisovány s 1% digitoninem. Solubilisované proteinové komplexy byly rozděleny pomocí CN-PAGE a detekovány pomocí imunoblotu s protilátkami proti TRH-R (A) nebo $G_{q/11}\alpha$ (B).

Tyto výsledky naznačují, že aktivovaný $G_{q/11}\alpha$ protein by mohl být přemístěn z preformovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu po stimulaci buněk thyroliberinem. Abychom určili, zda

$G_{q/11}\alpha$ komplex v oblasti 700 kDa obsahuje aktivovaný $G_{q/11}\alpha$ protein, provedli jsme experiment zahrnující navázání [^{35}S]GTP γ S ke $G\alpha$ proteinu, solubilizaci proteinových komplexů, jejich rozdělení pomocí CN-PAGE a autoradiografii. Vzorky PNS z HEK293-E2M11 buněk byly nejprve inkubovány v reagenční směsi s anebo bez 10 μM TRH a 10 nM [^{35}S]GTP γ S, solubilizovány s 1% LM a rozděleny pomocí CN-PAGE.

Basální aktivita $G\alpha$ proteinu byla detekována v oblastech 40 kDa a 700 kDa. Tyto signály zřejmě odpovídají $G_{q/11}\alpha$ podjednotce a vysokomolekulárnímu $G_{q/11}\alpha$ komplexu detekovanému v oblasti 700 kDa. Po inkubaci PNS s 10 μM TRH v reakční směsi s [^{35}S]GTP γ S byla oproti kontrolnímu vzorku detekována vyšší intenzita signálů v oblastech 40 kDa, 140 kDa a 700 kDa, což naznačuje zvýšenou aktivitu $G_{q/11}\alpha$ ve vzorku. Závěrem lze shrnout, že aktivní $G_{q/11}\alpha$ protein je součástí $G_{q/11}\alpha$ komplexu detekovaného v oblasti 700 kDa jak v bazálním stavu, tak i po aktivaci TRH receptoru.

Pro zjištění možných interagujících partnerů, které by mohly být součástí identifikovaných komplexů TRH receptoru a $G_{q/11}\alpha$ proteinu, jsme vybrali několik proteinů, které by mohly být zapojeny v signalizaci TRH receptoru. Mezi těmito proteiny byli strukturální proteiny klatrin, NHERF1, kaveolin-1 a flotillin-2 a signální proteiny PLC β , GRK2, RGS2-5 a β -arrestin. Většina těchto proteinů nebyla identifikována v oblastech gelu, ve kterých byly identifikovány komplexy TRH receptoru a $G_{q/11}\alpha$ proteinu. Pouze PLC β a GRK2 byly detekovány v oblastech 500 kDa a 700 kDa, což naznačuje, že tyto proteiny by mohly být komponentami komplexů TRH receptoru a $G_{q/11}\alpha$ proteinu v těchto oblastech.

6. Závěr

Tato práce se zabývá identifikací změn v hladině proteinů v membránové frakci získané z buněčné linie HEK293-E2M11 po dlouhodobém působení TRH a identifikací a charakterizací molekulárních proteinových komplexů TRH receptoru a/nebo $G_{q/11}\alpha$ proteinu.

Naše výsledky mohou být shrnuty do následujících závěrů:

1) Isolovaná membránová frakce obohacená o plasmatické membrány obsahovala velké množství Na,K-ATPasy, TRH receptoru a G-proteinu v porovnání s postnukleárním supernatantem.

2) Pomocí dvojrozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že ve frakci obohacené o PM získané z TRH ovlivněných (16 h, $1 \cdot 10^{-5}$ M) HEK293-E2M11 buněk bylo nalezeno 42 proteinů, jejichž hladina byla změněna v porovnání s kontrolním vzorkem. Pět proteinů (mitofilin, MTHSP75, prohibitin, stomatin like-2 protein a peroxiredoxin III), jejichž hladina byla zvýšena po dlouhodobém působení TRH, představují proteiny lokalizované v mitochondriích. Všechny tyto proteiny jsou nezbytné pro správnou strukturu a funkci mitochondrií.

3) Molekulární proteinový komplex detekovaný v oblasti 140 kDa pomocí CN-PAGE představuje preformovaný TRH-R- $G_{q/11}$ komplex, což bylo potvrzeno pomocí ko-imunoprecipitace a

experimentů prováděných na buňkách se sníženou expresí $G\alpha$ a $G\beta$ podjednotek $G_{q/11}$ proteinu. Krátkodobé (10–30 min) působení TRH způsobilo disociaci tohoto komplexu, zatímco dlouhodobé (4–16 h) působení vedlo k částečné opětovné tvorbě.

4) Tvorba cytosolárních $G_{q/11}\alpha$ komplexů detekovaných v oblasti 70 kDa byla detekována po dlouhodobém působení TRH, což souvisí s disociací membránově vázaných $G_{q/11}$ komplexů detekovaných v oblastech 300 kDa a 140 kDa a translokací $G_{q/11}\alpha$ proteinu z plasmatické membrány do cytosolu.

5) Vysokomolekulární komplex TRH receptoru byl detekován v oblasti 500 kDa, zatímco komplex $G_{q/11}\alpha$ proteinu v oblasti 700 kDa. Hladiny obou těchto komplexů se zvyšovaly po krátkodobém působení TRH. Tyto výsledky ukazují, že TRH receptor a $G_{q/11}\alpha$ protein mohou být přemístěny z preformovaného TRH-R- $G_{q/11}$ komplexu po stimulaci buněk TRH. Možnými vazebnými partnery TRH receptoru a $G_{q/11}\alpha$ proteinu v těchto komplexech jsou GRK2 a PLC β .

7. Reference

- Allen, J.A., Yu, J.Z., Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2005) *Mol Pharmacol.* 67:1493-1504.
- Audet, N., Gales, C., Archer-Lahlou, E., Vallieres, M., Schiller, P.W., Bouvier, M. and Pineyro, G. (2008) *J Biol Chem.* 283:15078-15088.
- Ayoub, M.A., Maurel, D., Binet, V., Fink, M., Prezeau, L., Ansanay, H. and Pin, J.P. (2007) *Mol Pharmacol.* 71:1329-1340.
- Cant, S.H. and Pitcher, J.A. (2005) *Mol Biol Cell.* 16:3088-3099.
- Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W. and Rhee, S.G. (2004) *J Biol Chem.* 279:41975-41984.
- Cronin, M.A., Diao, F. and Tsunoda, S. (2004) *J Cell Sci.* 117:4797-4806.
- DeBlasi, A., O'Reilly, K. and Motulsky, H.J. (1989) *Trends Pharmacol Sci.* 10:227-229.
- Drmota, T., Novotny, J., Kim, G.D., Eidne, K.A., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998) *J Biol Chem.* 273:21699-21707.
- Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H. and Bouvier, M. (2006) *Nat Struct Mol Biol.* 13:778-786.
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J. and Bunemann, M. (2005) *EMBO J.* 24:4106-4114.
- Helenius, A. and Simons, K. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:529-532.
- Huang, C., Duncan, J.A., Gilman, A.G. and Mumby, S.M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:412-417.
- Hynes, T.R., Mervine, S.M., Yost, E.A., Sabo, J.L. and Berlot, C.H. (2004) *J Biol Chem.* 279:44101-44112.
- Jantas, D., Jaworska-Feil, L., Lipkowski, A.W. and Lason, W. (2009) *Neuropeptides.* 43:371-385.
- Jaworska-Feil, L., Jantas, D., Leskiewicz, M., Budziszewska, B., Kubera, M., Basta-Kaim, A., Lipkowski, A.W. and Lason, W. (2010) *Neuropeptides.* 44:495-508.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J. and Zha, J. (2005) *Mol Biol Cell.* 16:1543-1554.
- Jones, T.L., Degtyarev, M.Y. and Backlund, P.S., Jr. (1997) *Biochemistry.* 36:7185-7191.

- Kosloff, M., Elia, N., Joel-Almagor, T., Timberg, R., Zars, T.D., Hyde, D.R., Minke, B. and Selinger, Z. (2003) *EMBO J.* 22:459-468.
- Luo, L. and Yano, N. (2005) *Endocr Res.* 31:185-198.
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R. and Wedegaertner, P.B. (2007) *Biochemistry.* 46:7665-7677.
- Martin Shreeve, S. (2002) *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1300-1307.
- Matousek, P., Novotny, J., Rudajev, V. and Svoboda, P. (2005) *Cell Biochem Biophys.* 42:21-40.
- Matousek, P., Novotny, J. and Svoboda, P. (2004) *Physiol Res.* 53:295-303.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) *Mol Cell.* 11:577-590.
- Miserey-Lenkei, S., Lenkei, Z., Parnot, C., Corvol, P. and Clauser, E. (2001) *Mol Endocrinol.* 15:294-307.
- Montero, J., Mari, M., Colell, A., Morales, A., Basanez, G., Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J.C. (2010) *1797:1217-1224.*
- Mulla, C.M., Geras-Raaka, E., Raaka, B.M. and Gershengorn, M.C. (2009) *Pancreas.* 38:197-202.
- Nobles, M., Benians, A. and Tinker, A. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18706-18711.
- Osman, C., Merkwirth, C. and Langer, T. (2009) *J Cell Sci.* 122:3823-3830.
- Philip, F., Sengupta, P. and Scarlata, S. (2007) *J Biol Chem.* 282:19203-19216.
- Ransnas, L.A., Svoboda, P., Jasper, J.R. and Insel, P.A. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7900-7903
- Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D. and Cotecchia, S. (2006) *J Biol Chem.* 281:4354-4363.
- Thiyagarajan, M.M., Bigras, E., Van Tol, H.H., Hebert, T.E., Evanko, D.S. and Wedegaertner, P.B. (2002) *Biochemistry.* 41:9470-9484.
- Wedegaertner, P.B. and Bourne, H.R. (1994) *Cell.* 77:1063-1070.
- Wedegaertner, P.B., Bourne, H.R. and von Zastrow, M. (1996) *Mol Biol Cell.* 7:1225-1233.
- Wittig, I., Karas, M. and Schagger, H. (2007) *Mol Cell Proteomics.* 6:1215-1225.
- Wolf, G., Aumann, N., Michalska, M., Bast, A., Sonnemann, J., Beck, J.F., Lendeckel, U., Newsholme, P. and Walther, R. (2010) *J Endocrinol.* 207:163-175.
- Yano, N. and Luo, L. (2004) *JOP.* 5:193-204.
- Yu, R., Ashworth, R. and Hinkle, P.M. (1998) *Thyroid.* 8:887-894.
- Zhu, C.C., Cook, L.B. and Hinkle, P.M. (2002) *J Biol Chem.* 277:28228-28237.

8. Seznam publikací autorky

3. Publikace, které jsou podkladem disertační práce

Drastichova, Z., Bourova, L., Hejnova, L., Jedelsky, P., Svoboda, P. and Novotny, J. (2010) Protein alterations induced by long-term agonist treatment of HEK293 cells expressing thyrotropin-releasing hormone receptor and G₁₁α protein. *J. Cell Biochem.* 109(1):255-64

IF=3.122

Drastichova, Z. and Novotny, J. (2012) Identification of preassembled TRH receptor-G_{q/11} protein complex in HEK293 cells. *Cell Struct. Funct.* 37(1):1-12

IF=3.265

Drastichova, Z. and Novotny, J. (2012) Identification and subcellular localization of molecular complexes of G_{q/11}α protein in HEK293 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (v recenzním řízení)

IF=1.547

1. Ostatní publikace

Drastichova, Z., Bourova, L., Lisy, V., Hejnova, L., Rudajev, V., Stohr, J., Durchankova, D., Ostasov, P., Teisinger, J., Soukup, T., Novotny, J. and Svoboda, P. (2008) Subcellular redistribution of trimeric G-proteins—potential mechanism of desensitization of hormone response: internalization, solubilisation, down-regulation. *Physiol. Res.* 57 Suppl 3:S1-10

IF=1.646

Drastichova, Z., Skrabalova, J., Neckar, J., Kolar, F. and Novotny, J. (2011) Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium. *J. Biomed. Sci.* 18:89-96

IF=1.962