

Abstrakt

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 thyroliberinem. Pomocí imunoblotu se specifickými protilátkami proti Na^+, K^+ -ATPase a vazebných pokusů s $[^3\text{H}]\text{TRH}$ a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 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 proteinů (mitofilin, MTHSP75, prohibitin, stomatin like-2, peroxiredoxin III) představuje mitochondriální proteiny, které jsou důležité pro správnou strukturu a funkci 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 $\text{G}_{q/11}$ proteinu. Pomocí nativní elektroforézy byly identifikovány tři komplexy obsahující TRH receptor a čtyři komplexy obsahující $\text{G}_{q/11}\alpha$ 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 $\text{G}_{q/11}$ proteinu, což bylo potvrzeno koimunoprecipitací a experimenty, při nichž byly využity buněčná linie HEK293-E2 exprimující menší množství $\text{G}_{11}\alpha$ proteinu v porovnání s buněčnou linií HEK293-E2M11 a RNA interference, při které byly sníženy hladiny $\text{G}\beta_1$ a $\text{G}\beta_2$ proteinů. Krátkodobé působení TRH (10-30 min) vedlo k disociaci preasociovaného komplexu TRH receptoru a $\text{G}_{q/11}$ proteinu a současně ke zvyšování hladiny dimeru TRH receptoru, což mohlo být způsobeno uvolňováním dimeru TRH receptoru z preasociovaného komplexu TRH receptoru a $\text{G}_{q/11}$ proteinu. Po dlouhodobém působení TRH došlo k částečnému opětovnému formování preasociovaného komplexu TRH receptoru a $\text{G}_{q/11}$ proteinu. Signál $\text{G}_{q/11}$ proteinu v oblasti 140 kDa detekovaný imunoblotem zřejmě odpovídá nejen preasociovanému komplexu TRH receptoru a $\text{G}_{q/11}$ proteinu, ale komplexům $\text{G}_{q/11}$ proteinu s různými receptory spřaženými s $\text{G}_{q/11}$ proteiny.

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

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

Závěrem lze říci, že nativní elektroforéza je vhodnou metodou pro identifikaci molekulárních proteinových komplexů. Využitím této metody jsme zjistili, že TRH receptor může tvořit preformovaný komplex s $\text{G}_{q/11}$ 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 $\text{G}_{q/11}$ proteinu stejně jako dalších detekovaných komplexů TRH receptoru nebo $\text{G}_{q/11}$ proteinu byla výrazně ovlivněna po působení 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.