

**OR Fyziologie živočichů: Kurzy, přednášky**

## **Přednáška**

### **"Lipidy a buněčná signalizace"**

(O. Nováková F. Novák)

**Termín:** přednáška se bude konat stejně jako minulý rok v letním semestru, každé **úterý v 13:10- 14:40 hod.**,

**Adresa:** Přírodovědecká fakulta, Viničné 7, posluchárna B15 (1. suterén), 1. přednáška bude **23. 2. 2010.**

## **BIOENERGETIKA**

Bioenergetika [B150P27]

Zajišťuje: 152

Stav předmětu: **v r. 2009 přednáška neproběhne**

Rozsah v LS: 2/0 Zk [hodiny/týden]

Kredity: 3

Platnost:

Počet míst: neomezen

Vyučující:

Anotace:

Specializační přednáška pro magisterský stupeň oboru fyziologie živočichů (povinně volitelná pro diplomní zaměření fyziologie živočichů a diplomní zaměření neurobiologie). Volitelná přednáška v doktorském studijním programu fyziologie živočichů. Předpokládá se absolvování základních kurzů fyzikální (nebo obecné) chemie, biochemie a buněčné biologie.

Stručná osnova předmětu:

Energetická podstata buněčné činnosti, její fyzikální a biochemické popisy a hodnocení. Významné buněčné metabolické dráhy. Integrační funkce mnohobuněčného živočišného organismu. Regulace příjmu potravy a výdeje energie. Endokrinní řízení metabolických funkcí. Substrátové cykly a jejich význam u savců. Obezita, metabolismus tukových tkání, termoregulace. Experimentální přístupy ke studiu energetického metabolismu obratlovců.

Literatura:

Moore W.J.: Fyzikální chemie. SNTL, Praha, 1981.

Maršík F., I. Dvořák: Biodynamika. 1998, 2. vydání, Academia, Praha, ISBN 80-200-0664-8.

F. Ganong: Přehled lékařské fyziologie. 1995, vydání v ČR 1. podle 16. angl. vydání.

Nakladatelství a vydavatelství H & H, Jinočany. ISBN 80-85787-36-9.

Významné moderní publikace – přehledné články.

Termín kurzu: **v r. 2009 přednáška neproběhne**

## **BIOENERGETICS**

Bioenergetics [B150P27]

Guaranteed by: 152

State:

synthesis and hydrolysis of ATP, Summer term: 2/0 Zk [hodiny/týden]

Credits: 3

Valid: from Capacity: unlimited

Teacher(s):

Anotation:

Specialized lecture on thermodynamic principles, biochemistry and physiology of energetic substances, etc. Obligatory for Mgr. degree of animal physiology or neurobiology. Facultative for the PhD. study program animal physiology. Basic courses from Cell Biology, Biochemistry and Physical Chemistry are presumptive.

Syllabus:

Potential (definition, mechanical, thermodynamical, electrochemical and redox). Green and red energetic pathways of life. NADH - central electron carrier in the cell. Calvin's (reductive and oxidative) pentose cycle, Krebs cycle. Balance of mass and energy. The first and the second principle of thermodynamics. Free energy / enthalpy ratio, work and heat. Regulation of energy intake and output. Endocrine control of metabolic functions. Substrate cycles and their importance in mammals. Obesity, metabolism of adipose tissues, thermoregulation. Experimental studies of energy metabolism.

References:

Moore W.J.: Fyzikální chemie. SNTL, Praha, 1981.

Maršík F., I. Dvořák: Biodynamika. 1998, 2. edition, Academia, Praha, ISBN 80-200-0664-8.

F. Ganong: Review of Medical Physiology. 20th edition 2001, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, ISBN 0-8385-8282-6.

Important modern publications – reviews.

Terms of course:

After agreement with students in current school year (probably in the first half of May).

### **FYZIOLOGIE EPITELU. TRANSPORT LÁTEK, JEJICH REGULACE A VZTAHY MEZI STRUKTUROU A FUNKCÍ**

Odborný kurs Oborové rady 06 – fyziologie živočichů pro studenty postgraduálního doktorského studia biomedicíny

Termín: Zimní semestr, 2 hod. přednášek a 2 hod. praktik, přesný termín podle dohovu, obvykle formou přednáškového bloku a turnusového praktika

Místo konání: Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč, konečná

autobusu 193.

Učitelé: Prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc. (pacha@biomed.cas.cz)

Přednášky seminární formou:

1/ **Podstata epitelu:** homeostáza elektrolytů a rovnováha v příjmu a výdeji solutů, srovnání epiteliální buňky s jinými buňkami, funkční organizace epitelu, struktura a funkce těsných spojů, epitely těsné a volné.

2/ **Biofyzika epiteliálního transportu:** elektrochemický potenciál, difuzní potenciál, aktivní a pasivní transport, Gibbs-Donnanova rovnováha, Nernstova rovnice, Teorellova rovnice, 1. Fickův zákon a difuze, Goldman-Hodgkin-Katzova rovnice, Hodgkin-Horowitzova rovnice, membránový potenciál.

3/ **Metody studia epitelu:** elektrofyziologické metody, napěťový zámek, terčíkový zámek, kabelová analýza, biochemické a fluorescenční metody, metody molekulárně biologické

2/ **Principy transportu látek a systematický přehled transportu neelektrolytů a elektrolytů v epitelu:** mechanismus spřažení toku solutů a solventu, sekrece a absorpce, mechanismy transportu vody, aminokyselin, cukrů, karboxylových kyselin, fosfátu,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$ , acidobazická rovnováha a transport  $\text{H}^+$  a  $\text{HCO}_3^-$ , transport lipidů.

3/ **Regulace transportu látek:** princip regulace na úrovni buňky, orgánu a organismu, neurální a humorální regulace, imunitní systém a regulace transportu látek, regulace buněčného objemu, regulace intracelulárního pH, bioenergetika transportu.

4/ **Transport látek v epitelech jednotlivých orgánů:** gastrointestinální trakt a absorpce živin iontů a vody, sekrece žaludečních a střevních šťáv, renální tubuly a reabsorpce primárního filtrátu, tvorba moče a renální acidifikace, dýchací cesty a sekrece surfaktantu, epitely oka a tvorba očních tekutin, slinné a potní žlázy a tvorba slin a potu.

5/ **Poruchy transportu látek:** cystická fibrosa, diarrhea, mechanismy působení enterotoxinů, poruchy transportu v ledvinách, poruchy v metabolismu kortikosteroidů.

6/ **Vybrané kapitoly ze srovnávací fyziologie epiteliálního transportu:** Vstřebávání látek v gastrointestinálním traktu přežvýkavců, osmoregulace u ptáků a role kloaky, transport iontů v kůži a močovém měchýři obojživelníků, osmoregulace u ryb a role žaber, transport KCl u hmyzu a funkce malpigických trubic.

## Epithelial Physiology

Membrane transport, its regulation and structure-function relationship

1/ **Principles of epithelia and experimental methods:** electrolyte homeostasis and the balance between intake of solutes and excreting them; comparison between epithelial and nonepithelial cells; structure of the epithelia; structure and function of tight junctions; leaky and tight epithelia.

2/ **Biophysics of epithelial transport:** electrochemical potential, diffusion potential active and passive transport, Gibbs-Donnan equilibrium, Nernst equation, Teorell equation, 1<sup>st</sup> Fick law and diffusion, Goldman-Hodgkin-Katz equation, Hodgkin-Horowitz equation, membrane potential.

3/ **Methods for studying the epithelial function:** electrophysiological methods, voltage clamp, patch clamp, cable analysis, biochemical, fluorescence and molecular biological methods.

**2/ Membrane transport of electrolytes and nonelectrolytes across epithelia:** coupling of solute and solvent fluxes; secretion and absorption; mechanisms of water transport; transport of amino acids, carbohydrates, carboxylic acids, phosphate, sodium, potassium, chloride and calcium; acid base balance and transport of hydrogen ions and bicarbonate; lipid transport.

**3/ Control of epithelial transport:** principles of this control at the level of the cell, organ and organism; autonomic nervous system; endocrine regulations; immune system and epithelial transport; cell volume regulation; regulation of intracellular pH; bioenergetics of transport.

**4/ Organization of epithelia in gastrointestinal and renal tract, airways, eyes, salivary and sweat glands:** absorption of minerals, nutrients and water in gastrointestinal tract; gastric and intestinal secretion; renal tubules and reabsorption of solutes and water; urine concentration and dilution; renal acidification; transport of solutes and water in airways; corneal epithelium and aqueous humor; secretion of saliva and sweat.

**5/ Pathophysiology of the epithelium:** cystic fibrosis; congenital chloridorrhea; secretory diarrhea and infections with *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*; malfunctions of renal transport and metabolism of corticosteroids.

**6/ Comparative physiology of epithelial transport:** Digestion and absorption in the ruminant gastrointestinal tract; osmoregulation in birds and the role of cloaca; ion transport across amphibian skin and urinary bladder; osmoregulation in fishes and the role of gills; malphigian tubules.

## CHRONOBIOLOGIE

**Odborný kurs Oborové rady 06 - Fyziologie živočichů pro studenty postgraduálního doktorského studia biomedicíny**

**Přednášející:**

PharmDr. Alena Sumová, CSc., FgÚ AV ČR (sumova@biomed.cas.cz)

**Termín a místo konání:**

Přednášky se budou konat každou středu od 11. března 2009 ve 13.00 h v budově Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4, budova D, zasedací místnost 2. patro.

Chronobiologie je nauka o časovém řízení biologických dějů. Živé organismy vykazují biologické rytmy v mnoha různých proměnných, od exprese genů až po chování. Tyto rytmy mohou běžet s periodou několika milisekund až v řádu mnoha let. K nejdůležitějším rytmům patří rytmy cirkadiánní, tj. zhruba denní, které přetrvávají i tehdy, jsou-li organismy chovány ve stálém prostředí. Cirkadiánní rytmy vykazují téměř všechny dosud známé organismy, od jednobuněčných prokaryotních, až po savce včetně člověka. Ukazuje se, že téměř každá buňka mnohobuněčného organismu je schopna vytvářet cirkadiánní rytmy a tyto rytmy jsou vzájemně koordinovány pomocí tzv. cirkadiánního systému. Porucha vzájemné koordinace v časovém řízení má negativní dopad na fyziologické funkce a zdraví organismů.

V kurzu bude věnována pozornost zejména cirkadiánnímu systému a jeho hierarchii u různých druhů organismů, s největším zřetelem na savce. Bude podán výklad nejnovějších

poznatků o mechanismech, které generují cirkadiánní rytmy na buněčné a molekulární úrovni. Bude vysvětleno, jak se tento mechanismus přizpůsobuje změnám ve vnějším prostředí a jakým způsobem řídí různé fyziologické funkce v těle. Cirkadiánní systém bude popsán i z hlediska jeho ontogenetického a fylogenetického vývoje. U různých živočišných druhů se zaměříme na souvislosti mezi rytmy cirkadiánními a rytmy s periodou výrazně delší či kratší než je 24 hodin. Pozornost bude věnována v neposlední řadě i otázkám, jak se cirkadiánní systém podílí na řízení chování různých živočišných druhů (migrace) či na regulaci spánku, schopnosti učení, apod. u člověka.

## CHRONOBIOLOGY

Chronobiology studies time regulation of biological processes. Living organisms exhibit biological rhythms in many variables, from gene expression to behavior. These rhythms may run with a period from several milliseconds to many years. The most important are circadian, i.e. about one day, rhythms, which persist even in a non-periodic environment. Circadian rhythms can be found in most of the organisms known so far, from unicellular prokaryotic to mammals, including humans. It has been revealed that nearly every cell of a multicellular organism is able to generate circadian rhythms that are coordinated via so called circadian system. Malfunction of the coordination in the timekeeping system impacts negatively on many physiological functions and health.

Lectures will concentrate mostly on the mammalian circadian system and its hierarchy in different species, mainly in mammals. The up-to-day theories on mechanisms underlying the circadian rhythmicity at the cellular and molecular level will be explained. It will also be summarized how does the timekeeping mechanism entrain with external cues and how does it drive numeral physiological functions. The ontogenetic and phylogenetic aspects of the circadian rhythmicity will be also ascertained. Further, attention will be directed at relationship between circadian rhythms and rhythms with much longer or shorter period. Last but not least, circadian control of behavior of different species (migration) or regulation of sleep, learning ability etc. in humans will be discussed.

## MEMBRÁNOVÉ LIPIDY A BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Odborný kurs Oborové rady 06 – fyziologie živočichů pro studenty postgraduálního doktorského studia biomedicíny

### **Termín konání:**

letní semestr: od 24.2.09 každé úterý od 13.10 h do 14.50 h v posluchárně B15, Viničná 7, Praha 2.

### **Přednášející:**

Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc. (olnov@natur.cuni.cz)  
katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, Viničná 7, 128 44  
Doc. RNDr. František Novák, CSc.  
katedra biochemie Hlavova 2030, 128 43  
Universita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2

### **Program přednášky:**

Přednáška je určena pro studenty magisterského a postgraduálního doktorského studia a předpokládá znalosti základního kurzu biochemie. Jejím cílem je detailně demonstrovat fyzikálně chemické vlastnosti lipidů a jejich vztah ke struktuře a funkci buněčných membrán a jejich význam v přenosu signálu v buňce.

Jedná se o jednosemestrální cyklus dvouhodinových přednášek v letním semestru, které se zabývají těmito tématy:

- 1) Fyzikálně chemické vlastnosti lipidů - struktura, lipidový polymorfismus, asymetrická distribuce v membráně, interakce lipid-protein, lipidy a fúze membrán, modely membrány.
- 2) Biosyntetické dráhy lipidů - topologie v buňce a regulační mechanismy.
- 3) Úloha lipidů při přenosu signálu v buňce - úloha fosfolipáz, fosfolipidy jako prekursory druhých posílů, kompartmentalizace meziproductů biosyntézy membránových lipidů.
- 4) Glycerolipidy s etherovou vazbou a jejich biologicky aktivní druhy - destičky aktivující faktor (PAF) jako regulátor mnoha patofyziologických pochodů (zánět, alergie, anafylaktický šok).
- 5) Eikosanoidy - struktura, metabolismus a biologická aktivita produktů metabolických drah cyklooxygenázy, lipoxygenázy a epoxygenázy, mechanismus účinku nesteroidních protizánětlivých léčiv.
- 6) Sfingolipidy - bioaktivní sfingoidní báze, glykosfingolipidy jako modulátory růstu a diferenciacie buněk, vrozené metabolické poruchy.
- 7) Cholesterol - biosyntéza a její regulace, funkce v buněčných membránách, transport v souvislosti s rizikem aterosklerózy a ischemické choroby srdeční.
- 8) Transport lipidů v buňce - intramembránový, intermembránový (vesikulární a pomocí přenašečových proteinů).
- 9) Modulační funkce proteinů lipidy - modulační katalytické aktivity a vazebných vlastností proteinů.
- 10) Trávení, vstřebávání a transport lipidů v plasmě - lipoproteinové komplexy.
- 11) Poruchy lipidového metabolismu a jejich klinické důsledky - lipidózy, poruchy syntézy plicního surfaktantu
- 12) Peroxidace lipidů

**Doporučená literatura:**

Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, ed. Vance J. E. 2002, Elsevier, ISBN: 0-444-80303-3

Materiály z přednášky

## MEMBRANE LIPIDS AND CELL SIGNALLING

**Lecture schedule:**

The lecture provides overview of the nomenclature, structure, metabolism and dynamics of membrane lipids. Lipid diversity and distribution, physical properties, membrane lipid asymmetry, model membranes. Phospholipid metabolism. Ether-linked glycerolipids and their bioactive species. Phospholipases. Metabolism of arachidonic acid, cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. Sphingolipids: chemistry, metabolism and modulation of cell function. Generation and attenuation of lipid second messengers in intracellular signalling. Cholesterol biosynthesis and regulation, cholesterol and clinical pathology. Intracellular transport and cell traffic of lipids. glycosyl-phosphatidylinositol-anchored Lipid-protein interactions. Lipid-tagged proteins (acylation, isoprenylation, proteins). Lipids and free radicals.

physics The knowledge of fundamental biochemistry and is expected.

**References:**

Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, ed. Vance J. E. 2002, Elsevier, ISBN: 0-444-80303-3

## **MOLEKULÁRNÍ FARMAKOLOGIE**

**Přednášky a praktická cvičení pro posluchače 4 ročníku Přírodovědecké fakulty UK**

**a**

**Výukový kurs PGS**

**Zimní semestr 2009**

předběžně 23. 11 až 4. 12. 2009; bude ještě upřesněno

**Oddělení biochemie membránových receptorů, Fyziologický ústav AV ČR  
Budova D, 1 patro, Videňská 1083, 142 20 Praha 4 (konečná autobusu 193, spojení na stanici metra  
Budějovická)**

**a**

**Laboratoř molekulární farmakologie, Katedra Fyziologie  
Viničná 7, 1 patro  
120 00, Přírodovědecká fakulta UK**

Praktická cvičení

**vždy konec listopadu a začátek prosince  
bude upřesněno na každý semestr**

### **Přednášky**

**Doc. RNDr Petr Svoboda, DrSc**

Obecný úvod do problematiky s reminiscencemi do chemie a fyziky, základy práce s isotopy, isotopy užívané v biologickém výzkumu, poločas života.

Historický vývoj pojmu hormonální receptor (John N. Langley a Paul Ehrlich), objev cAMP a adenylylcyklasy (Earl Sutherland a spol.), trimerní G proteiny (Martin Rodbell a Alfred Gilman, Nobelova cena za Fyziologii a lékařství, 1994), klasifikace receptorů, klasifikace membránových receptorů, charakterizace membránových receptorů s pomocí vazebných studií s radioligandy.

Kritéria Pedra Cuatrecasase pro rozlišení specifické vazby na receptor od nespecifické vazby = afinita, saturabilita, kompetice, specifita a stereo-specifita.

Agonisté, antagonisté, parciální agonisté, inverzní agonisté, basální aktivita, alosterické ligandy, alosterické modulátory, vnitřní afinita receptoru, tj. schopnost přenosu signálu do nitra buňky, *potency*, *efficacy*.

-monomerní a trimerní G proteiny, cyklus výměny GDP-GTP, základní třídy G proteinů, kolik je G $\alpha$  podjednotek?

-efektory = adenylylcyklázy, fosfolipázy A1, , fosfolipázy A2, fosfolipázy C, fosfolipázy D, základní přídy fosfolipidů.

-ATP, ADP, AMP, cAMP, adenosin, GTP, GDP, GMP, cGMP, fosfodiesterasy, kyselina arachidonová, prostaglandiny.

-struktura buněčné membrány, tekutost neboli membránová fluidita, účinek detergentů na buněčné membrány, detergent-resistantní membránové domény (DRMs), membránové domény.

-molekulární mechanismus účinku některých farmak používaných v praktické medicíně.

**RNDr Lenka Bouřová, PhD, Fyziologický ústav AV ČR**

Matematické hodnocení vazebných studií membránových receptorů I (specifické a nespecifické radioligandy, oddělení vázané a volné radioaktivity, stanovení radioaktivity metodou kapalně scintigrafie, filtry, scintillační kapaliny, specifická a nespecifická vazebná místa, disociační konstanta -  $K_d$ , maximální vazebná kapacita -  $B_{max}$ , kompetiční vazebné studie, hodnoty  $IC_{50}$ , výpočet  $K_d$  z hodnot  $IC_{50}$ , výpočet  $K_d$  z poměru mezi rychlostní konstantou asociace a disociace, alosterické interakce, Hillův koeficient, hodnocení vazebných studií s pomocí programu GraphPad.

Adaptorové bílkoviny a regulátory trimerních G proteinů (RGS), vzájemné interakce mezi různými signálními drahami.

**RNDr Lucie Hejnová, PhD**, Přírodovědecká fakulta UK

Vazebné studie membránových receptorů II, konkrétní příklady (praktické provedení vazebných reakcí se specifickými radioligandy pro daný receptor); společně s Dr. Bouřovou

**RNDr Jiří Novotný, DSc**, Přírodovědecká fakulta UK

Vápenaté ionty jako sekundární přenašeč obecně, srdeční sval, vápenaté ionty jako regulátor funkce srdečního svalu,  $\beta$ -adrenergní signální kaskáda v srdečním svalu, S49 lymphoma cells; mutanty cyc-, UNC, H21b; polyakrylamidová gelová elektroforesa a technika imunoblot (společně s Dr. Drastichovou)

Základy imunitní odpovědi organismu, typy protilátek používaných pro identifikaci signálních molekul, ELISA, imunofluorescence.

**RNDr. Ivana Švandová**, Přírodovědecká fakulta UK

Neuropřenašeče, G-proteiny řízené iontové kanály, receptory-iontové kanály, NO syntasa a NO, adaptorové bílkoviny těchto kaskád, základní elektrofyziologické parametry biologických membrán, klidový a akční potenciál (stručný přehled pro zopakování základní přednášky z fyziologie a neurobiologie).

**Mgr. Dmytro Kagan**, Fyziologický ústav AV ČR

Matabotropní receptory kyseliny pro kyselinu gama-aminomáselnou ( $GABA_B$ -R), trimerní G-proteiny v CNS, vývojové změny v centrálním nervovém systému; subcellulární frakcionace buněk (společně s Doc. Svobodou)

**RNDr Václav Lisý, CSc**, Fyziologický ústav AV ČR

Subcellulární frakcionace buněčných homogenátů, frakcionace mozku, frakcionace srdečního svalu, izolace plasmatických membrán, mitochondrií, myelinu, stanovení markerových enzymů a bílkovin, práce s experimentálními zvířaty.

**RNDr Zdena Drastichová**, Přírodovědecká fakulta UK

Standardní polyakrylamidová gelová elektroforesa, technika imunoblot, 2D elektroforesa, různé způsoby barvení dělených bílkovin, kvalitativní a kvantitativní hodnocení výsledků.

**RNDr Pavel Ostašov**, Fyziologický ústav AV ČR

Struktura buněčné membrány pohledem konfokální fluorescenční mikroskopie; stanovení změn v nitrobuněčných koncentracích vápenatých iontů s pomocí fluorescenčních sond, křivky dávka-odpověď pro stimulaci cílových buněk thyroliberinem, TRH.

**Mgr. Jana Brejchová**, Fyziologický ústav AV ČR (společně s Mgr. Ostašovem)

Pěstování buněk v tkáňové kultuře, struktura buněčné membrány pohledem konfokální fluorescenční mikroskopie; základy fluorescenční spektroskopie pro biology.

**Ing. Miroslava Vošahlíková**, Fyziologický ústav AV ČR. Základy práce s isotopy, isotopy užívané v biologickém výzkumu, stabilita jader, poločas života, stabilita organických sloučenin značených isotopy, rozpouštědla používaná při práci s organickými látkami, destilace, molekulová síta, koncentrování a čištění radioaktivních sloučenin, odpařování, TLC.



## Praktická cvičení

### Základy práce v laboratoři, příprava roztoků, čistota chemikálií

#### Práce se zvířaty

#### Subcelulární frakcionace tkání = mozek nebo srdeční sval

#### Pěstování buněk ve tkáňové kultuře

#### Subcellulární frakcionace buněk pěstovaných v tkáňové kultuře

### Stanovení receptorů

Charakterizaci receptorů, tj. stanovení počtu receptorů v daném biologickém materiálu a stanovení afinity receptoru k danému hormonu či nervovému přenašeči, provedeme s pomocí komerčně dostupných radioaktivních derivátů těchto látek - radioligandů. Jedná se o buď o látky vyvolávající biologickou odpověď podobně jako přirozeně se vyskytující přenašeče (agonisté), nebo o látky snižující tuto odpověď (antagonisté). Volbu vhodných radioligandů zjistíme nahlédnutím do seznamu všech membránových receptorů ve výtisku Trends in Pharmacology, 2001. Po zakoupení příslušného radioligandu provedeme tzv. vazebnou reakci, kdy jednoduchým způsobem měříme vazbu příslušného radioligandu na homogenát, podbuněčnou membránovou preparátu, izolované buňky či buněčné (povrchové) membrány. Radioaktivní ligand vázaný na receptor oddělíme od volného, tj. nenavázaného ligandu s pomocí filtrace přes síta ze skleněných mikrovláken. Základní výhodou těchto filtrů je nízká nespecifická vazba. Vysvětlíme pojmy radioaktivita, isotop, doba života isotopu, cpm, dpm, účinnost stanovení radioaktivity, scintilace, scintilační roztok, zhášení. Výsledky vazebných studií provedeme s pomocí programu GraphPad.

Výsledky rovnovážných vazebných studií membránových receptorů které si studenti sami provedou na „cell harvesteru“ vyhodnotíme s pomocí kapalné scintigrafie (vlastní stanovení radioaktivity) a programu GraphPad. Vypočteme hodnoty disociační konstanty (Kd) a maximální vazebné kapacity (Bmax). Vysvětlíme význam Hillova koeficientu pro charakterizaci alosterických vazebných interakcí. Upozorníme na další způsoby jak stanovit disociační konstantu Kd.

### Stanovení množství G proteinů a dalších signálních molekul; metody imunoblot (western blot) a ELISA

G proteiny jsou stimulovány receptorem po vazbě hormonu nebo nervového přenašeče a regulují funkci efektorů jako jsou adenylylcyklasy, fosfolipasy nebo iontové kanály. Množství G proteinů v nervové tkáni nebo srdečním svalu stanovíme s pomocí techniky imunoblot (western blot). Pro tento účel připravíme králičí protilátky, které jsou specificky orientovány na daný typ  $G\alpha$  podjednotky G proteinu. Řada kvalitních protilátek je dnes komerčně dostupná = napříkladně CalBiochem, Transduction Labs. V dalším stupni zviditelníme reakci primárních protilátek s G proteinem s pomocí sekundárních protilátek, které jsou buď schopny navodit vysoce účinnou barevnou reakci nebo obsahují fluoreskující pigment. Intenzita zbarvení či fluorescence je přímo úměrná množství G proteinu. Kvantitativní vyhodnocení provedeme s pomocí densitometrického záznamu. Jako příklady v praktické části kursu provedeme stanovení  $G_s\alpha$  v srdečním svalu a stanovení G proteinů třídy  $G_{i1}/G_{i2}\alpha$  v mozku. Jedná se o tkáň, ve kterých se tyto G proteiny vyskytují ve vysokém množství a jejich obsah je možné kvantitativně stanovit s poměrně vysokou přesností.

### Stanovení hormonální odpovědi v intaktních buňkách

Nevýhodou biochemických přístupů je nezbytnost degradace intaktní buněčné struktury. Příkladem, buněčné membrány se v důsledku homogenizace rozpadnou do řady malých měchýřků (vesikulů). Je proto výhodné korelovat výsledky biochemických přístupů s pohledem na neporušenou buňku. V případě, že chceme pozorovat membránové receptory či G proteiny v živé buňce, je možné vytvořit (technikami genové manipulace) fusní bílkoviny mezi příslušným receptorem a přirozeně fluoreskujícím proteinem z meduzy (green fluorescent protein, GFP). Získáme tak buňku která obsahuje „zelený receptor“. Po přidání hormonu TRH, můžeme pozorovat přenos receptorů do nitra buňky, což je jeden z klíčových mechanismů desensibilizace hormonální akce, tj. snížení fyziologické odpovědi na daný hormon po dlouhodobém či opakovaném podávání tohoto hormonu. Vlastní pozorování provádíme

v konfokálním mikroskopu. Po fixaci detekujeme  $G\alpha$  podjednotky G proteinů s pomocí imunofluorescence (primárně specifické protilátky proti dané  $G\alpha$  podjednotce, následně sekundární protilátky značené červeným barvivem eosinem nebo zeleným barvivem fluoresceinem).

Výše uvedený kurs je podporován projekty MŠMT LC554, LC 06063 a MSM0021620858.

Zájemci hlaste se prosím elektronickou poštou na adresu:

**svobodap@biomed.cas.cz**

Uved'te přesnou kontaktní adresu, telefon a email, jméno školitele a pracoviště. Studenti 4 ročníku PŘF mají přednost.

## **Molecular Pharmacology 2/2**

Laboratory of Membrane Receptors, Institute of Physiology, Videnska 1083, 142 20 Prague 4  
Czech Republic  
and

Laboratory of Neurobiology, Department of Physiology  
Faculty of Natural Sciences, Charles University, Viničná 7, 120 00 Prague 2

### **Lectures**

The historical development of understanding of hormonal receptors (since Paul Ehrlich and John Newport Langley)

Discovery of adenylyl cyclase and cAMP (Earl Sutherland) = the key stone of molecular endocrinology and pharmacology

Hormonal receptors - classification

Radioligand binding studies of membrane receptors, radioisotopes, liquid scintillation, beta- and gamma-counting,

Saturation binding isotherm, Scatchard plot, calculation of  $B_{max}$  and  $K_d$  values

Allosteric and co-operative models of receptor-ligand interactions, Hill coefficient

Why there are so many receptors for a single hormone or neurotransmitter?

Heterogeneity of G protein coupled receptors (GPCR), splicing of 7TM receptors

Trimeric GTP-binding regulatory proteins (G proteins)

Discovery of trimeric G proteins (Martin Rodbell and Alfred G. Gilman)

Classification of the five main families of G proteins

Phospholipase A1, phospholipase A2, phospholipase C, phospholipase D, phosphodiesterases, secondary messengers.

Cross-talk phenomena, feed-back regulations, desensitisation of hormone response

Internalisation, recycling and down-regulation of GPCR

Internalisation, solubilisation and down-regulation of trimeric G proteins

Isolation of plasma membranes and subcellular fractionation by differential and density-gradient centrifugation; membrane markers and enzyme activities

Calcium as secondary messenger

NO and NO synthase = non-traditional secondary messengers

### **Practical courses**

Basics of the work in biochemical laboratory

Basics of the work with isotopes

Basics of the work with experimental animals (rats, hamsters, guinea-pigs, rabbits)

Characterisation of receptor for cardiac glycosides (Na, K-ATPase) by [ $^3H$ ]ouabain binding assay

Characterisation of beta-adrenergic receptors

Computer analysis of radioligand binding studies  
Quantitative detection of trimeric G proteins by an immunoblot analysis (polyacrylamide gel electrophoresis in sodium-laurylsulphate, urea-SDS-PAGE and immunoblot techniques)  
Subcellular fractionation in density gradients, purification of plasma membranes, membrane markers and enzyme activities  
2D-electrophoresis (demonstration)  
Hormone-induced change in intracellular calcium = fluorescent detection by FURA II  
Determination of proteins by Folin reagent

**The course combines lectures with practical courses and demonstrations and it will be held jointly in Laboratory of Neurobiology (Viničná 7, 1<sup>st</sup> floor) and in the Institute of Physiology AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4**

Doporučená literatura  
Recommended literature

Základní a klinická farmakologie, Bertram G. Katzung (překlad kolektivu 2LF, Nakladatelství H & K, 1994)  
Hynie S. - Farmakologie v kostce, druhé vydání, Triton, Praha 2001  
Hynie S. - Obecná farmakologie, díl 1 a 2, Karolinum Praha, 1993  
Hynie S. - Speciální farmakologie, díl 1 az 7, Karolinum Praha, 1994-2002  
**Goodman & Gilman's „The pharmacological basis of therapeutics (10<sup>th</sup> edition), Mc Graw-Hill (Editors Joel G. Hardman, Lee E. Limbird and Alfred Goodman Gilman)”**

P. Svoboda: Charakterisace hormonálních receptorů s pomocí přímé vazebné studie  
Chemické Listy, 77, 258-276, 1983

P. Svoboda: Přenos hormonálního signálu přes plasmatickou membránu  
v knize Molekulární biologie, str. 201-216, CSVTS, 1984

P. Svoboda: Membránové receptory a přenos informace. Vesmir, 68, 71-74, 1989  
Svoboda P.: Úloha GTP-vazebných proteinů v přenosu hormonálního signálu. Čs. Physiol. 43, 20-24, 1994

Svoboda P.: Alfred G. Gilman a Martin Rodbell - úloha GTP-vazebných proteinů v přenosu signálu do nitra buňky. Nobelova cena za fyziologii a lékařství 1994  
Casopis lekaru ceskych 134, 415-417, 1995

**Specialised literature in english:**

**Svoboda P., Svartengren J., Snochowski J., Houstek J. and Cannon B. High-number of high-affinity binding sites for (-)-3H dihydroalprenolol on isolated hamster brown fat cells. Eur. J. Biochem. 102, 203-210, 1979**

Svoboda P. and Mosinger B. Catecholamines and the brain microsomal Na, K adenosine-triphosphatase I. Protection against lipoperoxidative damage. Biochem. Pharmacol. 30, 427-432, 19881

Svoboda P. and Mosinger B. Catecholamines and the brain microsomal Na, K-adenosine-triphosphatase II. The mechanism of action Biochem. Pharmacol. 30, 433-439, 1981

**Svartengren J., Svoboda P. and Cannon B. Desensitization of beta-adrenergic responsiveness in vivo. Decreased coupling between receptors and adenylate cyclase in isolated brown-fat cells. Eur. J. Biochem. 128, 481-488, 1982**

Svartengren J., Svoboda P., Drahotka Z. and Cannon B. The molecular basis for adrenergic desensitization of in hamster brown adipose tissue: uncoupling of adenylate cyclase activation Comp. Biochem. Physiol. 78C, 159-170, 1984

Svoboda P., Amler E. and Teisinger J. Different sensitivity of ATP+Mg+Na (I) and Pi+Mg (II) dependent types of ouabain binding to phospholipase A2. *J. Membrane Biol.* 104, 211-221, 1988

**Ransnas L., Svoboda P., Jasper J. and Insel P. Stimulation of beta-adrenergic receptors of S49 lymphoma cells redistributes the alpha subunit of the stimulatory G protein between cytosol and membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 7900-7903, 1989**

**Svoboda P., Kvapil P., Insel P.A. and Ransnas L.A. Plasma-membrane independent pool of the alpha subunit of the stimulatory guanine-nucleotide binding protein in a low-density membrane fraction of S49 lymphoma cells. *Eur. J. Biochem.* 208, 693-698, 1992**

**Svoboda P., Unelius L., Cannon B. and Nedergaard J. Attenuation of Gs alpha coupling efficiency in brown adipose tissue plasma membranes from cold-acclimated hamsters. *Biochem. J.* 295, 655-661, 1993**

**Milligan G., Svoboda P. and Brown Ch. Why are there so many adrenoceptor subtypes? *Biochem. Pharmacol.* 48, 1059-1071, 1994**

Svoboda P., Mullaney I. and Milligan G. Agonist induced transfer of the alpha subunits of the guanine-nucleotide-binding regulatory proteins Gq and G11 and of muscarinic m1 acetylcholine receptors from plasma membranes to a light-vesicular membrane fraction. *Eur. J. Biochem.* 224, 455-462, 1994

Kvapil P., Novotný J., Svoboda P. and Ransnas. L. The short and long forms of the alpha subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein are unequally redistributed during (-)-isoproterenol-mediated desensitization of intact S49 lymphoma cells. *Eur. J. Biochem.* 226, 193-199, 1994

**Svoboda, P., Gun-Do Kim, Grassie, M.A., Eidne K.A. and Milligan G. Thyrotropin releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of the guanine nucleotide binding protein G11 alpha. Analysis of differences in agonist regulation of co-expressed G11 alpha species variants. *Mol. Pharmacol.* 314, 761-768, 1996**

Svoboda P., Unelius L., Dicker A., Cannon B., Milligan G. and Nedergaard, J. Cold-induced reduction in Gi alpha proteins in brown adipose tissue. Effects on the cellular hypersensitization to norepinephrine caused by pertussis toxin-treatment. *Biochem. J.* 314, 761-768, 1996

Mullaney I., Caulfield M.P., Svoboda P. and Milligan, G. Activation, cellular distribution and enhanced degradation of the G proteins Gq and G11 by endogenously expressed and transfected phospholipase C-coupled muscarinic m1 acetylcholine receptors. *Progress in Brain Research (J. Klein and K. Löffelholz, eds.), pp. 181-187, Elsevier, 1996*

**Novotný, J. and Svoboda, P. (1998) The long (GsL) and short (GsS) variants of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein. Do they behave in an identical way? *J. Mol. Endocrinol.* 20, 163-173**

**Drmotá, T., Novotný, J., Kim, G.-D., Eidne, K.A., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998) Agonist-induced internalisation of the G protein G11alpha and thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors proceed on different time-scales. *J. Biol. Chem.* 273, 21699-21707**

Bouřová, L., Novotný, J. and Svoboda, P. (1999) The decrease in the short variant of Gs alpha protein is associated with an increase of [<sup>3</sup>H]CGP12177 binding, [<sup>3</sup>H]ouabain binding and Na,K-ATPase activity in brown adipose tissue plasma membranes of cold-acclimated hamsters. *J. Mol. Endocrinol.* 22, 55-64

J. Novotný, L. Bouřová, O. Málková, Svoboda, P. and Kolář, F. (1999) G proteins, beta-adrenoceptors and beta-adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 761-772

**Drmotá, T., Novotný, J., Gold, G.W., Svoboda, P. and Milligan, G. (1999) Visualisation of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone receptor and G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> induced by agonist stimulation. Biochem. J. 340, 529-538**

Novotný, J., Krušek, J., Drmotá, T. and Svoboda, P. (1999) Over-expression of G<sub>11</sub>α protein prevents desensitization of Ca<sup>2+</sup> response to thyrotropin-releasing hormone. Life Sci. 65, 889-900

**Svoboda P. and Novotný, J. (2002) Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. CMLS (Cellular and Molecular Life Sciences), 59, 501-512**

Novotný, J., Bouřová, L., Kolář, F. and Svoboda P. (2001) Membrane-bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in immature and adult myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. J. Cell. Biochem. 82, 215-224

Ihnatovych, I., Hejnová, L., Kořtnová, A., Mareš, P., Svoboda, P. and Novotný, J. (2001) Maturation of rat brain is accompanied differential expression of the long and short splice variants of Gs alpha protein. Identification of cytosolic (soluble) forms of Gs alpha. J. Neurochem. 79, 1-11

Ihnatovych, I., Novotný, J., Haugvicová, R., Bouřová, L., Mareš, P. and Svoboda, P. (2002a) Opposing changes of trimeric G proteins during ontogenetic development of rat brain. Developmental Brain Res., 133, 57-67

Ihnatovych, I., Novotný, J., Haugvicová, R., Bouřová, L., Mareš, P. and Svoboda, P. (2002b) Ontogenetic development of the G-protein mediated adenylylcyclase signalling in rat brain. Developmental Brain Res., 69-75 IF=1,562

Hejnová, L., Ihnatovych, I., Novotny, J., Kubová, H., Mareš, P. and Svoboda, P. (2002) Modulation of adenylyl cyclase in developing rat brain. Difference between cortex, thalamus and hippocampus. Neurosci. Lett., 330, 9-12

Bouřová, L., Kořtnová, A., Hejnová, L., Pesánová, Z., Moon, H.-Y., Novotny, J., Graeme Milligan and Petr Svoboda (2003). δ-opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. J. Neurochem. 85, 34-49

Moravcová, Z., Rudajev, V., Novotný, J., Černý, J., Matoušek, P., Parenti, M., Milligan, G. and Svoboda, P. (2004) Long-term agonist stimulation of IP prostanoid receptor depletes the cognate G<sub>s</sub>α protein from membrane domains but does not affect the receptor level. Biochem. Biophys. Acta., 1691, 51-65

Svoboda, P., Teisinger, J., Novotný, J., Bouřová, L., Drmotá, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., Stohr, J., Vokurková, A., Švandová, I. and Dürchánková, D. (2004) Biochemistry of transmembrane signalling mediated by trimeric G proteins. Physiol. Res. 53 (Suppl. 1), S141-S152

Rudajev, V., Novotny, J., Hejnova, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005) Thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and G<sub>q</sub>α/G<sub>11</sub>α protein. J. Biochemistry (Jap) 138, 111-125

**Ostašov, P., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotny, J. and Petr Svoboda (2007) Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>α proteins. J. of Receptors and Signal Transduction. 27, 335-352**

Ostašov, P., Krušek, J., Dürchánková, D., Hejnová, L., Svoboda, P. and Novotný, J. # (2008) Ca<sup>2+</sup> responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G<sub>11</sub>α protein over-expression on homologous and heterologous desensitization of hormone response. Cell Biochemistry and Function 26, 264-274

## MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY BUNĚČNÉ DRÁŽDIVOSTI

Přednáška a laboratorní cvičení

**Přednášející:** Prof. RNDr. František Vyskočil, DrSc. a kol. (vyskocil@biomed.cas.cz)

**Místo a datum konání:** Fyziologický ústav AV ČR, Praha 4 - Krč, Vídeňská 1083,

1. posch., zasedací místnost,

Teorie buněčné dráždivosti a synaptického přenosu, intracelulární měření synaptických potenciálů a proudů, receptory pro neuropřenašeče a bolest, metoda terčíkového zámku, cílené mutace receptorů, exprese změněných receptorů v COS a HEK buňkách, fluorescenční měření vápníku, počítačové zpracování dat.

## **MOLECULAR BASIS OF THE CELL EXCITABILITY**

Lectures and Laboratory Courses

**Lecturer:** Professor František Vyskočil, RNDr, D.Sc. and Members of Molecular Neurobiology Department

**Place and Date:** Fyziologický ústav AV ČR, Praha 4 - Krč, Vídeňská 1083, Wing „D“, 2nd floor, Meeting Room.

Theory of the nerve and muscle conduction and synaptic transmission, intracellular recordings of the synaptic potentials and currents, neurotransmitter receptors, pain receptors, patch clamp method, site-directed receptor mutations and expressions in COS and HEK cells, fluorescence imaging and computer evaluation of the data.