

Kurzy DSPB OR č. 10 v oboru Farmakologie a toxikologie

Školní rok 2008/2009

Pokračování cyklu přednášek “**NOVINKY VE VÝZKUMU STRESU**”

vhodné pro všechny obory DSPB, pro postgraduální studenty v češtině a angličtině

přednášky se konají v posluchárně Psychiatrické kliniky 1. LF UK a VFN,
Ke Karlovu 11, Praha 2

1. prosince 2008 (pondělí) v 15.00 hod

Dr. Michal Lebl, PhD, DSc

Illumina, Inc, San Diego, CA, USA

Nejnovější technologie sekvenování DNA; kompletní lidský genom za \$1000

27. května 2009 (středa) v 15:30 hod

Prof. Dr. Rainer Landgraf

Max Planck Institute of Psychiatry, Mnichov, Německo

Vasopressin, oxytocin and psychiatric diseases - from clue to causality

DALŠÍ PŘIPRAVOVANÉ PŘEDNÁŠKY – termíny budou upřesněny

Prof. Dr. F. Perlík, DrSc.

- Aplikace farmakogenetiky ve farmakoterapii.

RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.

♦ Imunofarmakologie a imunoscreeing v experimentu a praxi (zorganizovat/podílet).

♦ Cytokiny a biologická léčba.(zorganizovat/podílet).

♦ „, Novinky“ z molekulární farmakologie (zorganizovat/podílet).

Prof. Dr. M. Kršiak, DrSc.

- Některé obecné principy vědecké metody (paradigma, vize, testovatelnost, celostnost, redukce)
- Zneužívání vědy (scientismus, antiscientismus, evolucionismus, kreacionismus, vědecký ateismus, apodizmy).

Školní rok 2009/2010

Zájemci o tyto kurzy mají možnost se již hlásit u garantů kurzů

MOLEKULÁRNÍ FARMAKOLOGIE

Zimní semestr 2009

předběžný termín 23. 11 až 4. 12. 2009; bude upřesněno

Kurz se skládá z cyklu přednášek a z praktických cvičení

Místo konání:

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 Praha 2, Přírodovědecká fakulta UK

Garant kurzu:

Doc. RNDr Petr Svoboda, DrSc, kontakt – elektronickou poštou na adresu:
svobodap@biomed.cas.cz

Zájemci o účast v kurzu, uveďte přesnou kontaktní adresu, telefon a email,
jméno školitele a pracoviště. Studenti 4. ročníku PřF UK mají přednost.

Přednášející + stručná anotace přednášek**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 adenylcyklasy (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_{α} podjednotek?

-efektory = adenylcyklázy, 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-resistentní 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 kapalné 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, β -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 synthasa 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 nitro-buněčných koncentracích vápenatých iontů s pomocí fluorescenčních sond, křivky dávka-odpověď pro stimulaci cílových buněk thyreoliberinem, 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 biologie.

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: tématické okruhy + stručná anotace

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, podbuněčné membránové preparáty, izolované buňky či buněčné (povrchové) membrány. Radioaktivní ligand vázaný na receptor oddělíme od volného, tj. nenvázaného 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 adenylcyklyasy, 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 α podjednotky G proteinu. Řada kvalitních protilátek je dnes komerčně dostupná = příkladně 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 zabarvení 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. Příkladně, 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) fúzní 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.

MOLECULAR PHARMACOLOGY

Laboratory of Membrane Receptors, Institute of Physiology, Videnska 1083,
142 20 Prague 4
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 gama- 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, 1st 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 & H, 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 až 7, Karolinum Praha, 1994-2002

Goodman & Gilman's „The pharmacological basis of therapeutics (10th 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. Vesmír, 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, 1981

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. Loffelholz, 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 [³H]CGP12177 binding, [³H]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_q/G₁₁ induced by agonist stimulation. *Biochem. J.* 340, 529-538

Novotný, J., Krušek, J., Drmotá, T. and Svoboda, P. (1999) Over-expression of G₁₁α protein prevents desensitization of Ca²⁺ 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., Košťrnová, 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., Košťrnová, 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_sα 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., Drmota, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., Stohr, J., Vokurková, A., Švandová, I. and Durchánková, 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_qα/G₁₁α protein. *J. Biochemistry (Jap)* 138, 111-125

Ostašov, P., Bouřova, L., Hejnova, 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_q/G₁₁α proteins. *J. of Receptors and Signal Transduction.* 27, 335-352

Ostašov, P., Krůšek, J., Durchánková, D., Hejnová, L., Svoboda, P. and Novotný, J. # (2008) Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G₁₁α protein over-expression on homologous and heterologous desensitization of hormone response. *Cell Biochemistry and Function* 26, 264-274